

SUSCEPTIBILIDAD "IN VITRO" DE DERMATOFITOS FRENTE A GRISEOFULVINA Y TOLNAFTATO DE SODIO

Proyecto de Investigación RSE-80-40.
Financiado en parte por la Dirección de Investigación y Desarrollo.
Universidad Austral de Chile.

L. ZAROR - L. OTTH
Instituto de Microbiología Clínica, Facultad de Medicina
Universidad Austral de Chile, Casilla 567, Valdivia - Chile.

M. PINEDO
Escuela de Tecnología Médica, Facultad de Medicina.
Universidad Austral de Chile.

RESUMEN

Se ha informado acerca de una evolución de la susceptibilidad de Griseofulvina frente a Dermatófitos.

Por otra parte, desconociendo el comportamiento de las cepas de estos hongos aislados en nuestro medio, como también frente al Tolnaftato de Sodio se estudian las C.I.M. de estas drogas por el Método de Chmel Louria.

Se comparan estos dos antifúngicos, ya que muchas veces se utilizan como un tratamiento combinado. El 97,5% de las cepas estudiadas fue sensible a una concentración igual o inferior a 10 microgramos por ml. de Griseofulvina y el 96,6% a 0,16 microgramos por ml. de Tolnaftato de Sodio.

El 97,5% de las cepas estudiadas fue sensible a una concentración igual o inferior a 10 microgramos de Griseofulvina y el 96,6% lo es frente a 0,16 microgramos o menos de Tolnaftato de Sodio.

SUMMARY

An evolution of the susceptibility of Dermatophytes to Griseofulvina has been informed.

On the other hand, the behavior of these strains of fungi isolated in our medium is unknown, neither is the susceptibility of Tolnaftate of Sodio, reason for which the MIC's of these drugs were studied by the Chmel Louria Method.

These two antimicrotics were compared because many times they are used as a combined treatment.

The strains studies showed a 97,5% susceptibility to a concentration equal to or less than 10 microgramos for ml. of Griseofulvin and 96,6% susceptibility to Sodium Tolnaftate.

INTRODUCCION

En el tratamiento de una micosis debe tenerse presente su localización, el género y/o especie del hongo, la vía de administración, la respuesta del hongo, la farmacología y los efectos colaterales de la droga antimicótica. (7)

Para que un agente antifúngico sea útil en el tratamiento de una micosis sistémica, debe alcanzar un buen nivel de concentración en el sitio donde va a actuar. Para ello debe ser fácilmente soluble en agua; sin embargo, la mayoría de éstos son insolubles en ella, presentando diversos grados de solubilidad en algún solvente orgánico. (4) La mayor o menor solubilidad —la cual interfiere en la absorción y nivel sérico de la droga— determinará la vía de administración, la cual puede ser parenteral, intravenosa u oral. (4)

Otra característica que debe presentar un agente antimicótico es una baja toxicidad, ya que debe actuar sobre estructuras celulares eucarióticas

similares a los que posee el huésped. En el caso de los antimicóticos de uso tópico, además se necesita un buen nivel de tolerancia, no alterando el pH fisiológico de la epidermis ni sensibilizándola y debe tener una alta capacidad de penetración para poder sobrepasar la barrera del estrato córneo. (7)

Es común encontrar una droga tópica con una eficacia "in vitro" muy alta, pero "in vivo" esta misma es menos activa. Esto puede ser debido a que el estrato córneo actúa como barrera mecánica y además, a la acción de enzimas como esterasas, hidrolasas u otras que están en la epidermis. La penetración de la droga también es importante y depende de propiedades físico-químicas, tales como son lipofilia, unión a proteínas o hidrofilia de la sustancia. (7)

Hasta antes de 1950 no existía una terapia segura para las micosis sistémicas y sólo se utilizaban preparaciones tópicos como pomada de Whitfield o Ioduro de Potasio para dermatomycosis. En 1950 se introdujeron los polienos, siendo los

primeros la Nistatina y Pimaricina, usadas en el tratamiento de candidosis vaginal, intestinal y Anfotericina B para el tratamiento de las micosis sistémicas.

La segunda fase, unos veinte años más tarde, comenzó con la introducción de la 5-fluorocitosina y varios derivados de Imidazoles.

Se ha observado por diversos investigadores (2), (8) una disminución de la susceptibilidad de Dermatofitos frente a algunos antimicóticos, por lo que se estudian las Concentraciones Inhibitorias Mínimas (CIM) de Griseofulvina y Tolnaftato de Sodio.

La Griseofulvina es un antifúngico que fue aislado en 1939 del *Penicillium griseofulvum* Dierckx. Es prácticamente insoluble en agua, algo en etanol, metanol, acetona, benceno, cloroformo y ácido acético. Es soluble en dimetilsulfoxido y en dimetilformamida (12 - 14 gr./100 ml.). Es termoestable y puede ser autoclavada. (9)

El Tolnaftato de Sodio es un quimioterápico, el 0-2 Naftil mN-dimetilio carbonilato. (5) Es soluble en cloroformo, algo en éter y en alcohol e insoluble en agua. (9)

MATERIALES Y METODOS

Se estudiaron por el método de diluciones en agar, descrito por Chmel-Louria, (3) las Concentraciones Inhibitorias Mínimas (CIM) de los antifúngicos Griseofulvina y Tolnaftato de Sodio. Las cepas utilizadas fueron obtenidas a partir de muestras clínicas de pacientes que acudieron al Servicio de Microbiología Clínica del Hospital Regional de Valdivia.

La Griseofulvina y el Tolnaftato de Sodio fueron disueltos en dimetilsulfoxido. Se utilizó drogas de potencia conocida (Schering). Las CIM estudiadas fluctuaron entre 10 ucg. y 0,15 microgramos (ucg.) por ml. de medio para Griseofulvina y 0,16 ucg. y 0,005 ucg/ml. en el caso de Tolnaftato de Sodio.

Se preparó una solución madre de Griseofulvina de 1000 ucg./ml. en dimetil sulfoxido y una solución madre de Tolnaftato de Sodio de 16 ucg/ml. en el mismo disolvente. A partir de éstas se preparan las soluciones de trabajo, las que son incluidas en el Agar Sabouraud dextrosado.

Preparación del Inóculo

Para preparar el inóculo de células fúngicas, los hongos fueron cultivados en Agar Sabouraud y una vez desarrollados se les agregó como agente humectante Tween 80 al 1% en agua destilada estéril, para soltar y remover los cultivos. La suspensión obtenida se filtra por una gasa estéril de cuatro dobleces y se ajusta su turbidez al tubo número 3 del Nefelómetro de MacFarland según Negroni (6), con agua destilada estéril. Con estos inóculos se procede a sembrar con 0,05 ml. los medios con las diferentes concentraciones de la droga. Posteriormente se incuban a 28° C. y la lectura de la Concentración Inhibitoria Mínima (tubo de menor concentración de droga que no permite el crecimiento del hongo) se lee al primer esbozo de crecimiento en el tubo control que es dentro de 2-4 días.

RESULTADOS

En la Tabla N° 1 se presenta la C.I.M. de Griseofulvina y en la tabla N° 2, la C.I.M. de Tolnaftato de Sodio frente a Dermatofitos.

En el caso de la Griseofulvina, 40 (97,5%) de las 41 cepas estudiadas son inhibidas por 10 microgramos por ml. o menos, demostrándose una cepa que lo hace sobre esta concentración.

De las 59 cepas estudiadas, 57 son inhibidas por 0,16 microgramos por ml. o menos de Tolnaftato de Sodio (96,6%); las dos cepas restantes, lo cual representa el 3,4% son resistentes a una concentración superior a 0,16 microgramos por ml. de medio.

Tabla N° 1: Distribución según C.I.M. de Griseofulvina frente a Dermatofitos

HONGO	0,15	0,3	0,6	1,25	2,5	5	10	> 10	TOTAL
Microsporium N° canis Bodin %			1 12,5	3 50	2 75	2 100			8
Trichophyton mentagrophytes (Robin) Blanchard N° %					1 7,1	6 50	7 100		14
Trichophyton rubrum (Castellani) Sabouraud N° %			1 8,3	2 25	3 50	4 83,3	2 100		12
Otros Dermatofitos N° %			1 14,3	1 28,6		2 57,1	2 85,7	1 100	7
									41

Tabla Nº 2: Distribución según C.I.M. de Tolnaftato de Sodio frente a Dermatófitos

HONGO		0,005	0,01	0,02	0,04	0,08	0,16	> 0,16	TOTAL
Microsporium canis Bodin	Nº %				3 37,5	2 62,5	3 100		8
Trichophyton mentagrophytes (Robini) Blanchard	Nº %			3 13,6	12 68,9	4 86,4	3 100		22
Trichophyton rubrum (Castellani) Sabouraud	Nº %		2 10,5	7 47,4	8 89,5	1 94,7	1 100		19
Otros Dermatófitos	Nº %				4 40	2 60	2 80	2 100	10
									59

DISCUSION

El Tolnaftato de Sodio (Tinaderm ®) es un quimioterápico que actúa a muy bajas concentraciones. Rippon (9) comunica C.I.M. del orden de 0,0075 - 0,075 microgramos por ml. como promedio para *Trichophyton mentagrophytes*. En nuestras cepas el 96,6% de ellas fueron muy susceptibles a C.I.M. igual o inferior a 0,16 $\mu\text{g/ml}$. de medio. Se observa en este caso una disminución de la susceptibilidad, la que no invalida el uso del antimicótico.

Artis (2) y colaboradores describen una disminución de la susceptibilidad de los Dermatófitos frente a Griseofulvina, y aunque muchos investigadores han notado que este antimicótico no es hoy tan activo como lo descrito por Anderson (1), no se han realizado ensayos de su efectividad hace unos quince años y desconocemos información publicada al respecto en Chile.

El promedio de CIM encontrado por Artis (2), fluctúa entre 1-2 $\mu\text{g/ml}$. Esta CIM es muy baja comparada con los valores encontrados en nuestro estudio, los cuales fluctuaron entre 2,5 - 10 $\mu\text{g/ml}$. Este autor establece a su vez el criterio de "resistencia relativa" para Griseofulvina, para aquellas cepas que son inhibidas por 3 mcgrs./ml. o más de este antimicótico.

Nuestros resultados a la vez, no concuerdan con lo reportado por Roth (10), que establece que la CIM de Dermatófitos es menor a 1 $\mu\text{g/ml}$.

Por otra parte, en trabajos más recientes de Otcenasek y Dvorak (1971), (8), estos hongos son inhibidos por la Griseofulvina entre 0 - 20 $\mu\text{g/ml}$. En nuestro estudio, el 97,5% de los hongos son inhibidos a concentraciones iguales o inferiores a 10 $\mu\text{g/ml}$. y el 70,6% son susceptibles a una concentración igual o inferior a 5 $\mu\text{g/ml}$. relacionán-

dose con lo informado por estos autores. Sin considerar una cepa de *Keratinomyces ajelloi* Vandr., aisladas de suelo, la cual ha sido informada en la literatura en forma muy ocasional y cuestionable como agente de micosis, el 100% de los Dermatófitos provenientes de micosis, serían inhibidos por 10 $\mu\text{g/ml}$. de droga o menos.

La susceptibilidad disminuida de Dermatófitos frente a Griseofulvina podría ser un fenómeno comparable al de la susceptibilidad disminuida por *Neisseria gonorrhoeae* frente a Penicilina, descrita por diversos autores.

El amplio uso de Griseofulvina durante los últimos veinte años, teóricamente limita la prevalencia de Dermatófitos nunca antes expuestos al antifúngico.

De acuerdo con Artis (2), sería necesario realizar test de sensibilidad frente a Griseofulvina en cepas de Dermatófitos provenientes de cuadros clínicos que no responden a las dosis indicadas.

La resistencia descrita en la literatura estaría relacionada a fracasos terapéuticos y no a criterios límites de susceptibilidad o resistencia. Podría ser debido a una muy baja dosis del antimicótico, mala absorción de la droga en el tracto gastrointestinal, inactivación de la droga por enzimas microsomales, actividad disminuida en el sitio de infección o en último caso, infección con un Dermatófito que no es sensible a la Griseofulvina a las dosis habituales.

Otcenasek y col. (8), describen la utilización de Agar Sabouraud con Griseofulvina a una concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$. como medio de aislamiento inicial de *Trichophyton rubrum*. Considerando este trabajo y los resultados obtenidos por nosotros, no sería adecuada esta técnica en nuestro medio.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- ANDERSON, D.W. (1974) Griseofulvina: Biology and Clinical Usefulness, a review. *Ann. Allergy* 23: 103-110.
- 2.- ARTIS, W.; ODLE, B.; JONES, H. (1981) Griseofulvin Resistent Dermatophytosis correlates with "in vitro" Resistance. *Arch. Dermatol.* Vol 117: 16-19.
- 3.- CHMEL, H. and LOURIA, D. Antifungal Antibiotics: Mechanism of Action, Resistance, Susceptibility Testing, and Assay of Activity in Biological Fluids. In: Lorian, V. (1980) *Antibiotic in Laboratory Medicine*: 170-192, Ed. Williams and Wilkins Co. Baltimore, U.S.A.
- 4.- DROUHET, E.; HAY, R. J.; JONES, H. E.; RESTREPO, A. (1982) Ketoconazole in Management of Fungal Disease. *Adis Press Australia*.
- 5.- KAMINSKY, A.; CHOVELA, A.; CATALDO, J.; KAPLAN, J. (1963) Ensayo Terapéutico: "Tolnaftato. Nuevo agente para el tratamiento de Micosis cutáneas". Reunión de la Asociación Argentina de Dermatología. Págs. 3-6.
- 6.- NEGRONI, P. y RODRIGUEZ, Z.J. (1973) Ensayos sobre la acción fungistática y fungicida del Miconazol. *Bol. A.N/ de Medicina*. 1-2: 123-130.
- 7.- OBERSTE LEHM, H. (1974) Ideal properties of a Modern antifungal Agent. The therapy of Mycoses with Clotrimazol. *Postgraduate Medical Journal (Suppl.)*: 51-53.
- 8.- OTCENASEK, M. and DVORAK, J. (1971) Griseofulvin Sensitivitätstest in vitro als Hilfsmethode Zur Unterscheidung Von *Trichophyton metagrophytes* und *Trichophyton rubrum*. *Zbl. Bakt. I Abt. Orig.* 217: 96-103.
- 9.- RIPPON, J.W. *Medical Mycology. The pathogenic fungi and the pathogenic Actinomyces.* (1974). W.B. Saunders Co. Philadelphia, U.S.A.
- 10.- ROTH, F.; SALUMAN, J.B. (1959) In vitro studies of the Antifungal Antibiotic Griseofulvin. *J. Invest. Dermatology* 33: 403-418.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Schering Cía. Ltda. por habernos proporcionado la Griseofulvina y el Tolnaftato de Sodio.