

Actividad *in vitro* de voriconazol y otros tres antifúngicos frente a dermatofitos

María del Carmen Serrano-Martino^a, Mónica Chávez-Caballero^a, Anastasio Valverde-Conde^a, Rosa María Claro^a, Javier Pemán^b y Estrella Martín-Mazuelos^a

Servicios de Microbiología. ^aHospital Universitario de Valme. Sevilla. ^bHospital Universitario de La Fe. Valencia. España.

INTRODUCCIÓN. En los últimos años se ha observado un incremento en las infecciones por hongos dermatofitos, lo que ha llevado a la investigación de nuevas preparaciones antifúngicas que sean eficaces frente a estos hongos.

MÉTODOS. Hemos comparado la actividad *in vitro* de un nuevo antifúngico, voriconazol, con otros tres antifúngicos, itraconazol, fluconazol y terbinafina, frente a 120 dermatofitos pertenecientes a cuatro especies (*Trichophyton mentagrophytes* [n = 61]; *Microsporum canis* [n = 34]; *M. gypseum* [n = 13], y *T. rubrum* [n = 12]). El método utilizado fue el de microdilución en medio líquido siguiendo las recomendaciones del documento M38-P propuesto por el National Committee Laboratory Standards con algunas modificaciones.

RESULTADOS. En general, terbinafina fue el antifúngico más activo (CIM₉₀ ≤ 0,03 µg/ml) seguido por voriconazol (CIM₉₀, 0,25 µg/ml) y por itraconazol (CIM₉₀, 0,5 µg/ml).

Fluconazol fue el agente menos activo. Voriconazol e itraconazol mostraron las CIM más bajas frente a *M. canis*, 0,12 y 0,25 µg/ml, respectivamente.

CONCLUSIONES. En función de estos resultados puede decirse que voriconazol es un antifúngico con una excelente actividad frente a dermatofitos.

Palabras clave: Voriconazol. Microdilución. Dermatofitos.

In vitro activity of voriconazole and three other antifungal agents against dermatophytes

INTRODUCTION. The increase in infections due to dermatophytes in recent years led us to study the effectiveness of new antifungal formulations against these microorganisms.

METHODS. The *in vitro* activity of a new antifungal agent, voriconazole, was compared with three other antifungal agents, itraconazole, fluconazole and terbinafina, against 120 dermatophytes belonging to four species (61 *Trichophyton mentagrophytes*,

34 *Microsporum canis*, 13 *M. gypseum* and 12 *T. rubrum*). A broth microdilution method was used following the recommendations of the NCCLS document M38-P with some modifications.

RESULTS. Terbinafina was the most active agent against the dermatophytes studied (MIC₉₀ ≤ 0.03 µg/ml), followed by voriconazole (MIC₉₀, 0.25 µg/ml) and itraconazole (MIC₉₀, 0.5 µg/ml). Fluconazole was the least active antifungal agent. The most susceptible species was *M. canis*.

CONCLUSIONS. Voriconazole was found to have effective activity against dermatophytes.

Key words: Voriconazole. Microdilution. Dermatophytes.

Introducción

Los dermatofitos son un grupo de hongos que se caracterizan por su capacidad para invadir los tejidos queratinizados (piel, pelo, uñas), tanto en el hombre como en los animales¹⁻⁴, causando infecciones superficiales que, por lo general, responden bien con tratamiento antifúngico local. En las últimas décadas, se ha observado un aumento de pacientes inmunodeprimidos en los que la dermatofitosis se manifiesta de forma más grave y con sintomatología atípica, necesitando para su tratamiento el empleo de antifúngicos sistémicos^{5,6}.

Los agentes antifúngicos más utilizados en el tratamiento de estas infecciones son la terbinafina y el itraconazol^{7,8}. En los últimos años han aparecido nuevos agentes antifúngicos con buena actividad frente a gran variedad de hongos, uno de ellos es el voriconazol, que se caracteriza por ser un triazol con estructura similar al fluconazol y excelente actividad frente a levaduras, hongos dimórficos y hongos filamentosos oportunistas⁹⁻¹³.

El objetivo de este estudio fue comparar la actividad *in vitro* de este nuevo antifúngico, voriconazol, frente a otros tres antifúngicos de actividad ya conocida, fluconazol, itraconazol y terbinafina utilizando el método de microdilución en caldo propuesto por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (M38-P) con algunas modificaciones¹⁴.

Métodos

Aislamientos

Estudiamos un total de 120 dermatofitos, que pertenecían a especies que comúnmente causan infecciones en la práctica clínica. Estas especies fueron: *Trichophyton mentagrophytes* (n = 61), *Microsporum canis* (n = 34), *M. gypseum* (n = 13) y *T. rubrum*

Correspondencia: Dra. E. Martín-Mazuelos.
Servicio de Microbiología. Hospital Universitario de Cádiz.
Ctra. de Cádiz, s/n. 41014 Sevilla. España.
Correo electrónico: emartin@valme.sas.junta-andalucia.es

Manuscrito recibido el 16-07-2002; aceptado el 07-02-2003.

(n = 12). Las cepas procedían de aislamientos clínicos obtenidos tanto en el Hospital Universitario de Valme de Sevilla como en el Hospital Universitario de La Fe de Valencia. La identificación de las especies se realizó siguiendo las características tanto microscópicas como macroscópicas de los hongos.

Medio

El medio utilizado fue el RPMI-1640 (GIBCO BRL, Barcelona) con L-glutamina y sin bicarbonato sódico tamponado con 0,165 MOPS (Sigma, Madrid).

Antifúngicos

Los antifúngicos se obtuvieron a través de los fabricantes: fluconazol y voriconazol (Pfizer, Central Research Foundation, Beersel, Belgium), itraconazol (Janssen Research Foundation Beersel, Bélgica) y terbinafina (Novartis, Basel, Suecia). Las soluciones madres de todos los antifúngicos se prepararon en dimetil sulfoxido al 100% a la concentración de 1.600 µg/ml exceptuando el fluconazol, que se diluyó en agua destilada estéril a una concentración inicial de 6.400 µg/ml. Estas soluciones madres se congelaron a -20 °C hasta que fueran necesarias. Como describe el documento M38-P del NCCLS¹⁴, la solución madre se prepara a una concentración 100 veces superior a la concentración final deseada y seguida de una dilución 1:50 en medio RPMI para que la concentración del antifúngico en los tubos sea dos veces mayor que a la concentración final en el pocillo.

Método

El método utilizado fue el de la microdilución en caldo según las normas del documento M38-P del NCCLS¹⁴, siguiendo algunas modificaciones propuestas por otros autores¹⁵⁻¹⁷.

Preparación del inóculo

El inóculo inicial se realizó a partir de cultivos puros, provenientes en placas de agar patata dextrosa (APD), incubadas durante 7 a 15 días y a 28 °C (todas las cepas estudiadas presentaron esporulación en este medio). Las colonias maduras fueron cubiertas con aproximadamente 10 ml de solución salina estéril (0,85%), raspando la superficie con la punta de una pipeta Pasteur. La mezcla resultante de conidias e hifas, se transfirió a tubos estériles dejándolos reposar a temperatura

ambiente durante 15 a 20 min. El sobrenadante resultante se mezcló en vórtex durante unos 15 s, midiendo su turbidez con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 530 nm y a una transmitancia ajustada al 65-70%. Cada suspensión se diluyó 1:50 en RPMI obteniendo dos veces el inóculo final en cada pocillo. El inóculo correspondiente a las 120 cepas (cuatro especies) (tabla 1) se cuantificó tomando 0,01 ml de una dilución 1:100 del inóculo previamente ajustado sobre una placa de APD. Las placas fueron incubadas a 28 °C y observadas diariamente. Cuando el crecimiento era evidente, las colonias se contaron expresándose como unidades formadoras de colonias (UFC)/ml.

Procedimiento

El ensayo se realizó en placas estériles de microtitulación con pocillos en forma de "U" (Soria-Greiner, Madrid). Se tomaron alícuotas de 100 µl del antifúngico, diluido dos veces y se inoculó en la microplaca mediante una pipeta multicanal. A continuación se añadieron 100 µl del inóculo diluido en cada uno de los pocillos para obtener la concentración final de los antifúngicos. Los intervalos de concentraciones finales de los antifúngicos fueron de 0,12-64 µg/ml para fluconazol y de 0,03-16 µg/ml para el resto. En cada aislamiento se incluyó un control de crecimiento y un control de esterilidad. Las microplacas fueron incubadas a 28 °C y leídas visualmente con la ayuda de un espejo a los 4 días de incubación. Para los azoles, la concentración inhibitoria mínima (CIM) fue la concentración más baja del antifúngico que mostró una inhibición evidente del crecimiento (aproximadamente una inhibición del crecimiento del 50% comparada con el control de crecimiento). Para la terbinafina la CIM fue la concentración más baja que mostró una inhibición del 100% del crecimiento.

Resultados

Todas las especies estudiadas presentaron un crecimiento evidente a los 4 días de incubación.

En la tabla 1 se muestra el rango del tamaño del inóculo obtenido para las cuatro especies de dermatofitos ajustado a un 65-70% de transmitancia.

En la tabla 2 está representada la actividad *in vitro* de los cuatro antifúngicos estudiados frente a 120 cepas de dermatofitos. Para todos los aislamientos, los rangos de las CIM oscilaron entre 0,06-2 µg/ml para voriconazol, 0,25-≥ 64 µg/ml para fluconazol, 0,06-2 µg/ml para itraconazol y de ≤ 0,03 µg/ml para la terbinafina. En general, la terbinafina fue el agente antifúngico más activo, con CIM₅₀/CIM₉₀ ≤ 0,03/≤ 0,03 µg/ml, seguida por el voriconazol, con CIM₅₀/CIM₉₀ de 0,06/0,25 µg/ml y por el itraconazol, con CIM₅₀/CIM₉₀ de 0,25/0,5 µg/ml. El antifúngico que presentó menor actividad fue fluconazol, con CIM₅₀/CIM₉₀ 16/≥ 64 µg/ml.

TABLA 1. Tamaño del inóculo para 120 cepas de dermatofitos ajustado al 65-70% de transmitancia

Especies (n.º de cepas)	Tamaño del inóculo (UFC/ml)	
	Rango	
<i>T. mentagrophytes</i> (61)	4,0 × 10 ⁵ -2,0 × 10 ⁶	
<i>M. canis</i> (34)	2,0 × 10 ⁴ -1,5 × 10 ⁶	
<i>M. gypseum</i> (13)	5,3 × 10 ⁵ -2,0 × 10 ⁶	
<i>T. rubrum</i> (12)	1,6 × 10 ⁵ -2,5 × 10 ⁶	

TABLA 2. Actividad *in vitro* de voriconazol, fluconazol, itraconazol y terbinafina frente a las distintas especies de dermatofitos

Especies (n.º de cepas)	Antifúngicos CIM (µg/ml)											
	Voriconazol			Fluconazol			Itraconazol			Terbinafina		
	Rango	CIM ₅₀	CIM ₉₀	Rango	CIM ₅₀	CIM ₉₀	Rango	CIM ₅₀	CIM ₉₀	Rango	CIM ₅₀	CIM ₉₀
<i>T. mentagrophytes</i> (n = 61)	0,06-1	0,12	0,5	1- ≥ 64	16	≥ 64	0,06-2	0,25	1	≤ 0,03	≤ 0,03	≤ 0,03
<i>M. canis</i> (n = 34)	0,06-2	0,06	0,12	0,25- ≥ 64	8	32	0,06-0,5	0,12	0,25	≤ 0,03	≤ 0,03	≤ 0,03
<i>M. gypseum</i> (n = 13)	0,12-1	0,25	0,5	16- ≥ 64	32	≥ 64	0,25-1	0,5	1	≤ 0,03	≤ 0,03	≤ 0,03
<i>T. rubrum</i> (n = 12)	0,06-2	0,12	0,25	2- ≥ 64	8	32	0,12-1	0,25	0,5	≤ 0,03	≤ 0,03	≤ 0,03
Total (n = 120)	0,06-2	0,06	0,25	0,25- ≥ 64	16	≥ 64	0,06-2	0,25	0,5	≤ 0,03	≤ 0,03	≤ 0,03

CIM_{50/90}: valores de concentración inhibitoria mínima necesarios para inhibir el 50/90% de los aislamientos estudiados.

Frente a todas las especies ensayadas terbinafina presentó la misma CIM₉₀ ($\leq 0,03 \mu\text{g/ml}$). Voriconazol presentó las CIM₉₀ más elevadas para las especies *T. mentagrophytes* y *M. gypseum*. La CIM₉₀ para voriconazol ($1 \mu\text{g/ml}$), itraconazol ($0,5 \mu\text{g/ml}$) y fluconazol ($\geq 64 \mu\text{g/ml}$) fue igual para ambas especies. Las CIM₉₀ para voriconazol y fluconazol frente a *T. rubrum* fueron un poco más bajas ($0,25$ y $32 \mu\text{g/ml}$, respectivamente) e igual para itraconazol ($0,5 \mu\text{g/ml}$). *M. canis* fue la especie que se mostró más sensible con CIM₉₀ de $0,12 \mu\text{g/ml}$ para voriconazol y de $0,25 \mu\text{g/ml}$ para itraconazol.

Discusión

El tratamiento de las infecciones causadas por dermatofitos ha ido evolucionando en las últimas décadas. Ello se debe, no sólo a la aparición de posibles resistencias frente a alguno de los antifúngicos ya conocidos¹⁸, lo cual conllevaría secundariamente al aumento en la incidencia de estas infecciones, sino también a la aparición de procesos más graves y con manifestaciones clínicas atípicas en pacientes sometidos a alguna inmunodepresión. Para estos casos es necesario el empleo de antifúngicos más potentes. Terbinafina e itraconazol han demostrado una excelente actividad en aquellos procesos en los que por su gravedad necesitaron ser tratados de forma más agresiva^{7,8}. En los últimos años se han realizado numerosos estudios en los que se observa la excelente actividad de voriconazol; sin embargo, pocos son los estudios en los que se ha probado su actividad *in vitro* frente a hongos dermatofitos^{15,19,20}.

Actualmente, no existe método estandarizado para determinar la sensibilidad antifúngica frente a dermatofitos. Nosotros hemos tomado como base el documento del NCCLS¹⁴ para los hongos filamentosos, introduciendo una serie de modificaciones propuestas por otros autores en previos estudios de sensibilidad de estos hongos estos mismos antifúngicos^{15,16}. Estas modificaciones consisten en la disminución de la temperatura de incubación, de 35 a 28°C , así como la prolongación en el tiempo de incubación, de $24-72$ h de 3 a 4 días, dependiendo de la especie. Norris et al¹⁷ y Jessup et al²¹ han empleado similares condiciones de tiempo y temperatura. El medio empleado para la preparación del inóculo ha sido APD, siguiendo las publicaciones de otros investigadores^{15,16}, a diferencia de Norris et al¹⁷ y Jessup et al²¹ que recomiendan para la óptima formación de conidias el medio agar *outmeal ceral* y agar RPMI-1640, respectivamente. La preparación del inóculo se realizó, al igual que otros autores²², siguiendo las indicaciones del documento M38-P propuesto por el NCCLS, ajustándolo a una transmitancia del $65-70\%$ ^{15,16} a diferencia de otros autores en los que se ajustó a una transmitancia del 95% ¹⁹. Utilizando esta transmitancia se han obtenido inóculos comprendidos entre 3×10^4 y 2×10^6 UFC/ml para todas las especies estudiadas, coincidiendo con los resultados de concordancia y recuento de colonias de Fernández-Torres et al^{15,16}. El inóculo estaba compuesto por una mezcla de conidias y fragmentos de hifas siguiendo el trabajo de Fernández-Torres et al^{15,16}, así como el de Manavathu et al²³ que demostró que el tipo de inóculo para *Aspergillus*

fumigatus no tenía especial influencia sobre las CIM. En este sentido, serían necesarios nuevos estudios para evaluar la influencia del tipo de inóculo en el estudio de la sensibilidad de hongos dermatofitos. Estas diferencias en la metodología utilizada hace difícil el poder comparar nuestros resultados con otros estudios realizados por otros autores. A pesar de esto, todos coinciden^{16,19} en que la terbinafina es el antifúngico más activo frente a los dermatofitos, con CIM inferiores a $0,06 \mu\text{g/ml}$. En nuestro estudio, voriconazol ha demostrado una excelente actividad *in vitro* con CIM₉₀ de $0,25 \mu\text{g/ml}$, siendo más activo que itraconazol con CIM₉₀ de $0,5 \mu\text{g/ml}$. Estos resultados difieren un poco de los observados por Perea et al¹⁹ y Wildfeuer et al²⁰ donde el itraconazol mostró ser más activo que el voriconazol. Fluconazol, por el contrario, mostró una baja actividad frente a todas las especies estudiadas con CIM₉₀ $\geq 64 \mu\text{g/ml}$ en coincidencia con lo publicado por otros investigadores¹⁹.

Los resultados de los distintos estudios realizados varían dependiendo de la especie estudiada. Nosotros observamos que *M. canis* fue la especie más sensible tanto para el voriconazol (CIM₉₀ $0,12 \mu\text{g/ml}$) como para itraconazol (CIM₉₀ $0,25 \mu\text{g/ml}$) mientras que Wildfeuer et al²⁰ demuestran que *M. canis* fue la especie más resistente. En el caso de *T. mentagrophytes* también se observaron discrepancias con lo mostrado por otros autores. La CIM₉₀ de itraconazol fue de $1 \mu\text{g/ml}$, mientras que Perea et al¹⁹ y Wildfeuer et al²⁰ mostraron una CIM₉₀ de $0,12 \mu\text{g/ml}$.

Aunque existan en la literatura especializada pocos estudios que valoren la actividad antifúngica del voriconazol frente a los dermatofitos, todos coinciden en que este antifúngico presenta una excelente actividad tanto *in vitro* como *in vivo*, por lo que podría ser el mejor antifúngico en el tratamiento de las infecciones producidas por estos hongos, sobre todo en el caso de cuadros graves donde es necesario administrar el antifúngico por vía sistémica. Aun así, estos resultados deben tomarse con cautela, siendo necesario obtener más datos clínicos que confirmen si esta buena actividad *in vitro* del voriconazol es predictivo de una buena respuesta clínica.

Bibliografía

1. Larone DH. Culture and identification of dermatophytes. Clin Microbiol News 1996;18:33-8.
2. Weitzman I, Summerbell RC. The dermatophytes. Clin Microbiol Rev 1995;8:240-59.
3. Macura A. Dermatophytes, pathogens or saprophytes. Int J Dermatol 1995; 34:529-30.
4. Cabañes J. Identificación de hongos dermatofitos. En: Pemán J, Martín-Mazuelos E, Rubio C, editores. Guía práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica. Bilbao: Rev Iberoam Micología 2001;12:1-11.
5. Berger AR. Common superficial fungal infections in patient with AIDS. Clin Infect Dis 1996;22:128-32.
6. Ray MC, Gately LE. Dermatology manifestation of HIV infection in AIDS. Infect Dis Clin North Am 1994;94:583-605.
7. Roberts DT. Oral terbinafine (Lamisil) in the treatment of fungal infections of the skin and nails. Dermatology 1997;194:37-9.
8. Saul A, Bonifaz A, Arias I. Itraconazole in the treatment of superficial mycoses: An open trial of 40 cases. Rev Infect Dis 1987;9:S100-S3.

9. Chávez M, Bernal S, Valverde A, Gutiérrez MJ, Quindós G, Martín Mazuelos E. *In vitro* activity of voriconazole (UK-109,496), LY303366 and other antifungal agents against oral *Candida* spp isolates from HIV infected patients. *J Antimicrob Chemother* 1999;44:697-700.
10. Uzun O, Arikan S, Kocagoz S, Sancak B, Unal S. Susceptibility testing of voriconazole, fluconazole, itraconazole and amphotericin B against yeast isolates in a Turkish University Hospital and effect of time of reading. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000;38:101-7.
11. Marco F, Pfaller MA, Messer S, Jones RN. *In vitro* activities of voriconazole (UK-109,496) and four other antifungal agents against 394 clinical isolates of *Candida* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:161-3.
12. Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ, Jones R, the Sensitivity Participants Group. Antifungal activities of posaconazole, ravuconazole and voriconazole compared to those of itraconazole and amphotericin B against 239 clinical isolates of *Aspergillus* spp. and other filamentous fungi program 2000. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:1032-7.
13. Cuenca Estrella M, Rodríguez Tudela JL, Mellado E, Martínez-Suárez JV, Monzón A. Comparison of the *in vitro* activity of voriconazole (UK-109,496), itraconazole and amphotericin B against clinical isolates of *Aspergillus fumigatus*. *J Antimicrob Chemother* 1998;42:531-3.
14. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi 1998 National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
15. Fernández-Torres B, Carrillo AJ, Martín E, Del Palacio A, Moore MK, Valverde A, et al. *In vitro* activities of 10 antifungal drugs against 508 dermatophyte strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:2524-8.
16. Fernández-Torres B, Vázquez-Veiga H, Llovo X, Pereiro M, Guarro J. *In vitro* susceptibility of itraconazole, clotrimazole, ketoconazole and terbinafina of 100 isolates of *Trichophyton rubrum*. *Chemotherapy* 2000;46: 390-4.
17. Norris HA, Elewski BE, Ghannoum MA. Optimal growth conditions for the determination of the antifungal susceptibility of three species of dematophytes with the use of a microdilution method. *J Am Acad Dermatol* 1999;40(6, part 2):S9-S13.
18. Artis WM, Odle BM, Jones HE. Griseofulvin-resistant dermatophytosis correlates with *in vivo* resistance. *Arch Dermatol* 1981;117:16-9.
19. Perea S, Fothergill AW, Sutton DA, Rinaldi MG. Comparison of *in vitro* activities of voriconazole and five established antifungal agents against different species of dermatophytes using a broth macrodilution method. *J Clin Microbiol* 2001;39:385-8.
20. Wildfeuer A, Seidl HP, Haberreiter A. *In vitro* evaluation of voriconazole against clinical isolates of yeasts, moulds and dermatophytes in comparison

with itraconazole, ketoconazole, amphotericin B and griseofulvin. *Mycoses* 1998;41:309-19.

21. Jessup CJ, Warner J, Isham N, Hasan I, Ghannoum MA. Antifungal susceptibility testing of dermatophytes. Establishing a medium for inducing conidial growth and evaluation of susceptibility of clinical isolates. *J Clin Microbiol* 2000;38:341-4.
22. Espinel-Ingroff A. *In vitro* activity of the new triazole (UK-109,496) against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and common and emerging yeast pathogens. *J Clin Microbiol* 1998;36:198-202.
23. Manavathu EK, Cutright J, Chandrasekar PH. Comparative study of susceptibility of *Aspergillus fumigatus* to various antifungal agents. *J Clin Microbiol* 1999;37:858-61.