

Comparación *in vitro* de la acción antifúngica del oxiconazol y el econazol frente a levaduras

Manuel Pereiro Jr, Ana Iglesias Grobas y Jaime Toribio Pérez

Cátedra de Dermatología, Hospital General de Galicia-Gil Casares, Facultad de Medicina, Universidad de Santiago de Compostela, España.

Resumen

Se realiza un estudio *in vitro* comparando la eficacia del oxiconazol y el econazol con 400 cepas de levaduras. Las pruebas consistieron en la medición de la inhibición del crecimiento mediante pruebas de microdilución en caldo de Sabouraud y de difusión en agar de Shadomy. El porcentaje de resistencias/sensibilidad fue similar para los dos antifúngicos en las cepas de *Candida albicans*. El oxiconazol demostró ser más eficaz contra *Candida* sp. y levaduras no *Candida*.

Candida, Candidiasis, Oxiconazol, Econazol, Sensibilidad *in vitro*

In vitro comparison of antifungal activity of oxiconazole and econazole against yeast

Summary

Oxiconazole was compared *in vitro* with econazole in tests with 400 yeasts strains. Tests were performed by measurement of growth inhibition by both microdilution in Sabouraud broth and a Shadomy' agar diffusion systems. The sensitivity/resistance percentages were similar in *Candida albicans* strains. Oxiconazole showed a higher activity than that of econazole in *Candida* spp. and yeasts other than *Candida*.

Key words

Candida, Candidiasis, Oxiconazole, Econazole, *In vitro* sensitivity

Existen múltiples métodos para valorar la sensibilidad *in vitro* de hongos a antifúngicos, en el presente trabajo realizamos una comparación entre un método de microdilución en caldo y un método de difusión de tabletas en agar, comparando la sensibilidad de las levaduras a dos antifúngicos: oxiconazol y econazol. En la actualidad la determinación de sensibilidades para hongos levaduriformes esta en un avanzado grado de estandarización, habiéndose fijado hace tiempo los medios y procedimientos a utilizar. Los sistemas basados en la microdilución son prácticamente irrealizables cuando se trata de estudiar un hongo filamentosos con poca capacidad de esporulación como puede ser *Trichophyton rubrum*. En el presente trabajo comparamos los resultados obtenidos con un procedimiento estandarizado de difusión en agar, con los obtenidos mediante un procedimiento de microdilución en caldo glucosado, con el fin de obtener datos que permitan su posterior comparación con los procedimientos empleados con dermatofitos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas a estudio. Se estudian 400 cepas de nuestro cepario, aisladas de patógenos humanos de pacientes de la consulta de Dermatología del Hospital General de Galicia-Gil Casares de Santiago de Compostela. Los especímenes clínicos correspondían a muestras de patología cutánea (intértrigos candidiásicos de pequeños y grandes pliegues, onicolisis candidiásica y perionixis).

De forma retrospectiva se revisan las historias clínicas de estos pacientes consignando los tratamientos empleados y los resultados obtenidos.

El aislamiento primario se realizó en agar de Sabouraud con antibiótico (gentamicina-cloranfenicol), identificando hasta especie por la formación de clamidosporos según la técnica de Dalmau, test de la ureasa y auxonograma de hidratos de carbono API20AUX (bioMérieux, France). Para este estudio agrupamos las especies identificadas en los siguientes grupos: *Candida albicans* (CA), *Candida* sp. (CSP) y levaduras no *Candida* (LNC). Las cepas se conservaron en agua destilada estéril a temperatura ambiente y en G25N (Pronadisa, Madrid, España) a -80°C entre 6 y 30 meses.

Antifúngicos. Teniendo en cuenta los datos obtenidos de la revisión de las historias de los pacientes se seleccionan dos antifúngicos cuyos porcentajes de utilización, similar en los grupos de pacientes con recidiva y sin recidiva, se sitúa en torno al 25%. Utilizamos los antifúngicos en polvo, extracto puro: oxiconazol (Madaus

Dirección para correspondencia:

Dr. Manuel Pereiro Jr.
Cátedra de Dermatología, Facultad de Medicina,
San Francisco s/n, 15705 Santiago de Compostela,
A Coruña, España
Fax : +34-981 547 094, E-mail: manuelle@usc.es

Aceptado para publicación el 5 de marzo de 1998

Cerafarm, S.A., Barcelona, España) y econazol (Sigma Química, Alcobendas, España) y los mismos antifúngicos en tabletas (Rosco Diagnostica, Taastrup, Denmark). Tests de sensibilidad a antifúngicos: Se utilizan dos métodos para determinar la sensibilidad de las levaduras a ambos antifúngicos.

Test de difusión en agar. Se utilizó agar de Shadomy modificado (Pronadisa SA, España), dispensando las tabletas sobre el agar y realizando inoculación inmediata siguiendo las instrucciones del fabricante de las tabletas antifúngicas y realizando la lectura a las 48 horas. De acuerdo con las instrucciones del fabricante y los resultados obtenidos de la clínica de nuestros pacientes, tomamos como sensibles (S) las cepas cuyo halo inhibitorio tenga un diámetro superior a 25 mm, como sensibilidad intermedia (SI) entre 20 y 25 mm de diámetro, y como resistentes (R) menos de 20 mm de diámetro.

Test de microdilución en caldo. Para el cálculo de la concentración mínima inhibitoria (CMI), utilizamos una técnica basada en la microdilución en caldo de Sabouraud. Se prepararon soluciones antifúngicas suspendiendo los antifúngicos a estudio a una concentración inicial 1:1 en N, N-dimetilformamida. Se resuspendieron en caldo de Sabouraud a concentración final de 0 (testigo), 20, 40, 60, 80, 100, 120 y 140 µg por ml, para lo cual se tuvo en cuenta la riqueza del antifúngico. Realizamos la lectura a las 48 horas mediante contado en la cámara de Neubauer.

Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

RESULTADOS

De la identificación de las cepas aisladas se obtuvieron los siguientes resultados: Se identificaron 193 cepas (48,3%) como *C. albicans*. Las 185 cepas (46,3%) agrupadas como *Candida* sp. incluyen: 15 cepas de *Candida famata*, una cepa de *Candida glabrata*, dos cepas de *Candida rugosa*, 13 cepas de *Candida guilliermondii*, 19 cepas de *Candida humicola*, 27 cepas de *Candida inconspicua*, cuatro cepas de *Candida tropicalis*, dos cepas de *Candida krusei*, una cepa de *Candida lipolytica*, 47 cepas de *Candida parapsilosis* y 44 cepas de *Candida* sp. Finalmente las 22 cepas agrupadas (5,5%) como LNC incluyen: un *Cryptococcus laurentii*, 7 *Rhodotorula* sp, un *Sporobolomyces salmonicolor*, seis *Trichosporon beigeli*, cinco *Trichosporon capitatum* y dos *Trichosporon penicillatum*.

En 67 (16,8%) casos los pacientes reciben tratamiento oral y tópico y 240 (60%) sólo tópico. En 93 (23,3%) casos los datos son insuficientes o el paciente no acude a revisión. De los 240 casos en que se utiliza tratamiento tópico solamente, se registran 84 (35%) de recidivas. De estos últimos, en 28 (33,4%) no se detalla si hay cambios en el tratamiento, y en 56 (66,6%) se cambia el antifúngico. En 17 de estos casos se detalla en la historia que el paciente cumple correctamente el tratamiento, por lo que se interpretan como cepas resistentes, en los 17 casos la levadura identificada es *C. albicans*. Los 39 restantes se interpretan como incumplimiento del tratamiento por parte del paciente.

Test de difusión en agar. Los resultados obtenidos en el test de difusión de tabletas en agar de Shadomy, quedan expuestos en las tablas 1 y 2.

El mayor número de resistencias se presentan en el econazol para todas las especies de levaduras con un 31,5% de cepas resistentes, mientras que sólo el 22% son resistentes al oxiconazol. *C. albicans* tiene un mayor

Tabla 1. Sensibilidad al oxiconazol.

Especie	S	SI	R
<i>C. albicans</i>	36 (9 %)	128 (32 %)	29 (7,25 %)
<i>Candida</i> sp	66 (16,5 %)	65 (16,5 %)	54 (13,5 %)
Lev. no <i>Candida</i>	11 (2,75 %)	6 (1,5 %)	5 (1,25 %)

Tabla 2. Sensibilidad al econazol.

Especie	S	SI	R
<i>C. albicans</i>	51 (12,75%)	110 (27,5%)	32 (8%)
<i>Candida</i> sp.	58 (14,5%)	44 (11%)	83 (20,75%)
Lev. no <i>Candida</i>	8 (2%)	3 (0,75%)	11 (2,75%)

número de cepas con gran sensibilidad frente al econazol (26,4%) que al oxiconazol (18,6%), pero tiene el mismo número de cepas resistentes frente a ambos antifúngicos. Las 17 cepas de *C. albicans* aisladas de pacientes cuya historia clínica permite suponer una resistencia, muestran poca sensibilidad excepto en tres casos.

El resto de las levaduras del género *Candida* y las levaduras de otros géneros presentan una mayor sensibilidad al oxiconazol que al econazol, tanto si se consideran las cepas sensibles (oxiconazol: 37,25%, econazol: 31,8%), las sensibilidades intermedias (oxiconazol: 72,5%, econazol: 54,5%) como las resistencias.

Test de microdilución en caldo glucosado. Se seleccionan las 17 cepas de *C. albicans* en las cuales el resultado clínico permite suponer una resistencia. La CMI, realizada a estas 17 cepas de *C. albicans*, queda reflejada en la tabla 3 y las figuras 1 y 2. El oxiconazol con una concentración de 20 µg/ml consigue una inhibición del crecimiento del 88%, mientras que el econazol solo consigue a esta concentración una inhibición del crecimiento del 49,2%. A partir de concentraciones de 80 µg/ml el poder inhibitorio del oxiconazol se sitúa por encima del 99%, mientras el del econazol es siempre inferior. No se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de cepas.

Tabla 3. Comparación de la CMI oxiconazol-econazol.

Concentración	Oxiconazol		Econazol	
	Cuentas	Tasa de crecimiento	Cuentas	Tasa de crecimiento
(TESTIGO)	4780960		3448000	
20 µg/ml	612391	12	1753294	50,80
40 µg/ml	194234	4,06	180588	5,23
60 µg/ml	64125	1,34	59706	1,73
80 µg/ml	33391	0,69	48765	1,41
100 µg/ml	15842	0,33	42235	1,22
120 µg/ml	17509	0,36	41176	1,19
140 µg/ml	15058	0,31	38294	1,11

DISCUSIÓN

En la actualidad es necesario realizar de forma rutinaria pruebas de sensibilidad antifúngica "in vitro" debido a la creciente aparición de resistencias a los derivados azólicos [1]. El hecho de considerar una cepa sensible o resistente a un antifúngico es problemático debido a la difícil correlación entre los resultados obtenidos "in vitro" y en la práctica clínica [2]. Muchos autores cuestionan la utilidad de estas pruebas de forma rutinaria [3]. Estas difi-

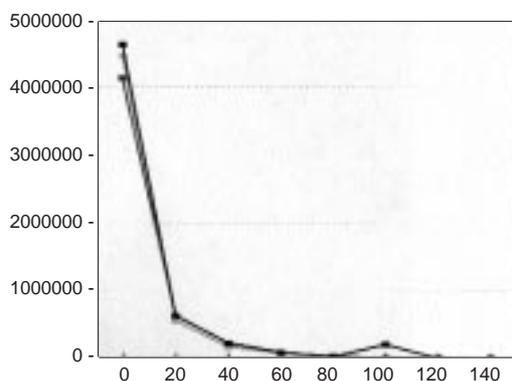


Figura 1. CMI del oxiconazol.

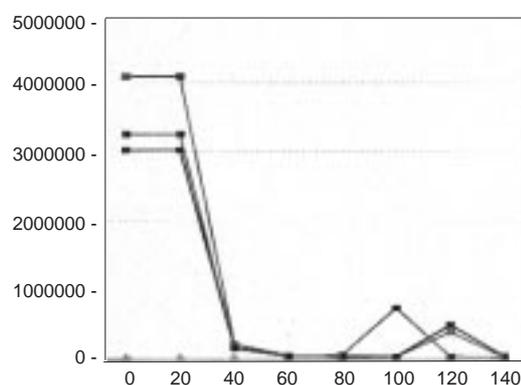


Figura 2. CMI del econazol.

cultades son mayores cuando se trata de resolver problemas con hongos filamentosos. Muchos autores están de acuerdo en su gran utilidad en la profilaxis del VIH, procesos de inmunosupresión (quimioterapia, trasplante), cáncer, etc. En los últimos 50 años las micosis invasivas en los enfermos con leucemias han aumentado hasta un 30% con la aparición de cepas de *Candida* que dan una patología clínica atípica y una sensibilidad reducida frente a los antifúngicos [4], de ahí que una adecuada valoración de la actividad "*in vitro*" de los antifúngicos frente a levaduras patógenas sirva para predecir cual debiera ser la respuesta clínica ante dicho antifúngico [5].

Existen autores que encuentran similar sensibilidad de las levaduras frente al oxiconazol y al econazol [6]. En nuestros datos ello es cierto para las cepas de *C. albicans*, pero encontramos un menor número de resistencias al oxiconazol que al econazol en *Candida* sp. y en las levaduras no *Candida*. En nuestros datos los resultados del test de difusión en Shadomy se correlacionan con las resistencias observadas en la clínica frente a estos antifúngicos.

El uso del oxiconazol frente a las candidiasis en la clínica no está claro, mientras que hay autores que demuestran su eficacia frente a las candidiasis cutáneas [3], otros, a pesar de reconocer su actividad Merck *in vitro* frente a las levaduras patógenas no recomiendan su uso en la práctica clínica [7]. Asimismo hay trabajos encuentran un mayor número de cepas sensibles al econazol, que las encontradas por nosotros, así como un menor número de resistencias [8].

En el estudio de CMI realizado a las cepas con resistencias en la clínica se seleccionaron unas concentraciones finales de antifúngicos similares a las utilizadas en otros trabajos realizados con dermatofitos frente al sertaconazol en agar glucosado [9]. Las curvas obtenidas con *C. albicans* en el presente trabajo con las técnicas de microdilución en caldo glucosado son comparables a las obtenidas con dermatofitos.

En resumen, creemos que se puede concluir por un lado que si bien la aplicación a casos particulares de los resultados obtenidos mediante estudios de difusión en agar es cuestionable, estos permiten la valoración de la eficacia de un antifúngico en series mucho más grandes que otras técnicas más laboriosas. Por otra parte, según nuestros datos concluimos que el número de resistencias frente al econazol y al oxiconazol, es similar para *C. albicans*, y mayor para *Candida* sp. y levaduras no *Candida* frente al econazol. Por lo tanto el oxiconazol podría ser el antifúngico de elección frente a una candidiasis cuando no se identifica *C. albicans* como agente etiológico.

Bibliografía

- Odds FC. Resistance of yeasts to azole-derivate antifungals. J Antimicrob Chemoter 1993; 31: 463-471.
- Rodero L, Boutureira M, Vivot W, Canteros C, Perrota D, Davel G. Candidiasis orofaríngeas en pacientes HIV positivos: perfil de resistencia a antifúngicos. Rev Iberoam Micol 1996; 13: 64-67.
- Rodriguez Tudela JL. ¿Son útiles las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos? Bol Contr Cal; Vol 8 (3).
- Martino P, Girmenia G. Treatment of fungal infection in neutropenic patients. Rev Iberoam Micol 1996;13 (Supl. 1):S78-S81.
- Carrillo JA, Abarca L, Quindós G. Comité para la Estandarización de los Antifúngicos (CEA-AEM). Aportaciones del comité de la AEM para la estandarización de pruebas de estudio de la sensibilidad "*in vitro*" a los antifúngicos: Método de difusión en disco. Rev Iberoam Micol 1996; 13 /Supl. 2): S101-S104.
- Shadomy S, Wang H, Shadomy HJ. Further *in vitro* studies with oxiconazole nitrate. Diagn Microbiol Infect Dis 1988; 9: 231-237.
- Jegasothy BV, Pakes GE. Oxiconazole nitrate: Pharmacology, efficacy, and safety of a new imidazole antifungal agents. Clin Ther 1991; 13(1).
- Carrillo-Muñoz AJ, Tur C, Torres JM. *In vitro* activity of sertaconazole, bifonazole, ketoconazole and miconazole against yeasts of the *Candida* genus. J Antimicrobial Chemoter 1996; 37: 815-819.
- Pereiro Miguens M, Pereiro M Jr, Pereiro M. Estudio de la actividad fungistática del sertaconazol "*in vitro*" frente a *Trichophyton rubrum*. Rev Iberoam Micol 1992; 9:12-16.