

# Influencia del tiempo de incubación en la determinación de la actividad antifúngica *in vitro* de la terbinafina frente a *Trichophyton rubrum*

Belkys Fernández-Torres<sup>1</sup>, Manuel Pereiro Jr.<sup>2</sup>, Jose Llovo<sup>1</sup>, Xose L. Otero<sup>3</sup> y Jaime Toribio<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Microbiología, Hospital de Conxo, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela; <sup>2</sup>Cátedra de Dermatología; <sup>3</sup>Departamento de Estadística, Facultad de Medicina, Universidad de Santiago de Compostela, España

## Resumen

Las pruebas de sensibilidad antifúngica son influenciadas por un gran número de factores como el tamaño del inóculo, temperatura, composición del medio y tiempo de incubación. En este estudio, hemos evaluado la sensibilidad *in vitro* de 20 cepas de *Trichophyton rubrum* frente a clotrimazol y terbinafina, y estudiamos la influencia del factor tiempo de incubación sobre las CMI de estos dos antifúngicos. El ensayo fue realizado mediante la técnica de dilución en agar, usando como medio agar glucosado de Sabouraud sin antibiótico. La CMI se determinó a los 15, 30 y 45 días de incubación. La CMI de la terbinafina a los 15 días de incubación estaba comprendida en un rango entre 0,02 y 0,0975 µg/ml, a los 30 días de 0,0975 a 0,39 µg/ml y a los 45 días de 0,195 a 0,39 µg/ml; para el clotrimazol a los 15, 30 y 45 días se obtuvo una CMI comprendida entre 3,125 y 50 µg/ml. *T. rubrum* mostró ser más sensible a la terbinafina que al clotrimazol ( $p < 0,001$ ). Además en esta experiencia observamos que las CMI de la terbinafina aumentan al prolongarse el tiempo de incubación ( $p < 0,001$ ), más no influye en las CMI del clotrimazol ( $p = 0,464$ ). En conclusión, la determinación de la CMI depende del tiempo de incubación y del tipo de antifúngico.

## Palabras clave

*Trichophyton rubrum*, Terbinafina, Clotrimazol, Sensibilidad *in vitro*

## Influence of incubation time in the *in vitro* antifungal activity of terbinafine against *Trichophyton rubrum*

## Summary

Antifungal susceptibility tests are influenced by a number of technical variables, including inoculum size, temperature, medium formulation and duration of incubation. In this study, we have compared the *in vitro* susceptibility of 20 strains of *Trichophyton rubrum* against clotrimazole and terbinafine, and studied the influence of incubation time on MICs of both drugs. The assay was performed by agar dilution, the medium used was Sabouraud glucose agar without an antibiotic. The MIC was evaluated at 15, 30 and 45 days' incubation. The MICs ranges of terbinafine were 0.002 to 0.0975 µg/ml, 0.0975 to 0.39 µg/ml and 0.195 to 0.39 µg/ml at 15, 30 and 45 days' incubation, respectively. The MICs ranges of clotrimazole at 15, 30 and 45 days' incubation were 3.125 to 50 µg/ml. *T. rubrum* was markedly more susceptible to terbinafine than to clotrimazole ( $p < 0.001$ ). In addition, we observed that an increase of incubation time causing an increase in the MIC value of terbinafine ( $p < 0.001$ ), but MIC values for clotrimazole remained constant with time ( $p = 0.464$ ). In conclusion, the MIC is dependent on reading time and the antifungal compound.

## Key words

*Trichophyton rubrum*, Terbinafine, Clotrimazole, *In vitro* susceptibility

## Dirección para correspondencia:

Dr. Manuel Pereiro Jr.  
Cátedra de Dermatología, Facultad de Medicina, San Francisco s/n, 15705 Santiago de Compostela, España.  
Tel.: +34 - 981 563100 /Ext. 12250; Fax +34 - 981 547094;  
E-mail: manuelpe@usc.es

Aceptado para publicación el 9 de octubre de 1998

Las dermatofitosis causadas por *Trichophyton rubrum*, han adquirido especial protagonismo ya que es el agente que se aísla con mayor frecuencia en dermatofitosis crónicas y onicomicosis, además es el responsable de muchos cuadros resistentes a la terapia [1-3].

El clotrimazol es uno de los primeros azólicos empleados extensamente como antifúngico en clínica humana, que usado como solución o crema al 1%, es efectivo frente a varias micosis superficiales como pitiriasis versicolor, candidiasis cutáneas y dermatofitosis [4-6]. La terbinafina es una alilamina activa frente a un gran

número de hongos patógenos, especialmente los dermatofitos [7]. Ambos compuestos actúan inhibiendo la síntesis del ergosterol fúngico; la terbinafina es un inhibidor específico de la epoxidación del escualeno [8], lo que conduce a una acumulación del escualeno provocando la muerte celular; el clotrimazol actúa en un paso posterior, es decir, es un inhibidor de 14-dimetil lanosterol. El objetivo de éste estudio es evaluar la eficacia *in vitro* de dos antifúngicos: clotrimazol y terbinafina frente a *T. rubrum* y por otro lado, determinar si el tiempo de incubación es un factor influyente en los resultados de sus concentraciones mínimas inhibitorias.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Cepas a estudio.** Se utilizaron un total de 20 cepas de *T. rubrum* aisladas de pacientes con dermatofitosis. El diagnóstico fue confirmado por examen directo del material con blanco de calcoflúor (fluorescent brightener 28; Sigma-Aldrich, EEUU). La identificación de género y especie fue realizada observando las características macro y microscópicas del cultivo en agar glucosado de Sabouraud con cloranfenicol. Se sembraron en medio de Borelli aquellas cepas que esporulaban con dificultad, y por último se realizó el test de perforación de pelo "*in vitro*" y test de la ureasa los cuales fueron negativos. Las cepas fueron subcultivadas en agar glucosado de Sabouraud sin antibiótico por 15 días a 28°C.

**Antifúngicos utilizados.** Utilizamos clotrimazol (Química Farmacéutica Bayer, España) con una pureza de 99,7% y terbinafina (Novartis Farmacéutica, España) sustancia pura valorada.

**Concentración mínima inhibitoria (CMI).** La CMI se determinó usando la técnica de dilución en agar. Los antifúngicos se suspendieron 1:1 p/v en N,N-dimetilformamida (Sigma-Aldrich), luego fueron resuspendidos en 10 ml de agar glucosado de Sabouraud sin antibiótico, ajustando las concentraciones finales en un rango comprendido entre 1,56 a 150 µg/ml para el clotrimazol y de 0,006 a 0,78 µg/ml para la terbinafina. Se utilizaron placas de Petri de 5 cm que fueron sembradas con inóculos de las cepas con un crecimiento de 15 días y mantenidas a una temperatura de 28°C; finalmente las placas fueron incubadas a esa misma temperatura. La experiencia fue ensayada por triplicado con cada cepa a estudiar, para obtener una mayor reproducibilidad de los resultados. La CMI se determinó a los 15, 30 y 45 días de incubación y correspondía a la menor concentración de antifúngico expresada en µg/ml que inhibe totalmente el crecimiento del hongo, mediante una lectura del diámetro de crecimiento de las colonias comparativa con el control de crecimiento libre de antifúngico.

**Análisis de datos.** Para el estudio comparativo de las variables diámetros, concentraciones, y tiempo de incubación los datos fueron sometidos a un proceso estadístico usando un análisis de la varianza (Anova de SPSS para Windows, EEUU).

## RESULTADOS

**Comparación entre el desarrollo del inóculo, concentración y tiempo de incubación.** En las figuras 1 y 2, correspondiente al clotrimazol y a la terbinafina respectivamente, observamos que cada curva representa los diámetros alcanzados del desarrollo de los inóculos a las diferentes concentraciones utilizadas y a los 15, 30 y 45 días de incubación. La mayoría de las lecturas realizadas

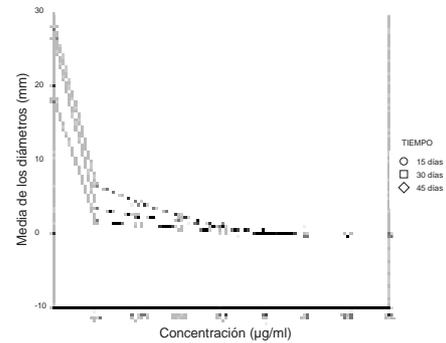


Figura 1. Cinética del desarrollo de los inóculos de 20 cepas de *T. rubrum* en función de las concentraciones del clotrimazol y del tiempo de incubación. Cada punto representa la media geométrica  $\pm$  DS de los diámetros alcanzados de las colonias para cada concentración y tiempo de incubación. La diferencia de las tres curvas son significativas ( $p < 0,001$ ).

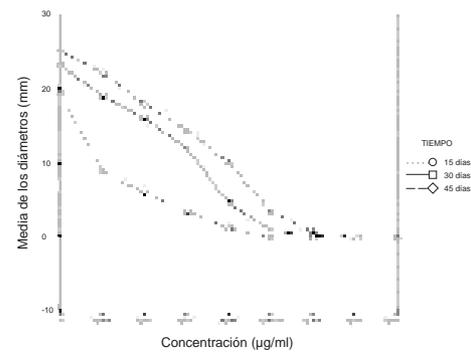


Figura 2. Cinética del crecimiento de los inóculos de 20 cepas de *T. rubrum* en función de las concentraciones de la terbinafina y del tiempo de incubación. Cada punto representa la media geométrica  $\pm$  DS de los diámetros alcanzados de las colonias para cada concentración. La diferencia de cada una de las curvas es significativa ( $p < 0,001$ ).

se concentran en un punto en el cual la mayoría del desarrollo de los inóculos quedan inhibidos. El tamaño de las colonias disminuyen al aumentar las concentraciones de los antifúngicos, ésta relación es estadísticamente significativa ( $P < 0,001$ ). Comparando cada una de las curvas apreciamos que al incrementar el tiempo de incubación el tamaño de las colonias aumentan ligeramente ( $p < 0,001$ ).

**CMIs y número de cepas inhibidas.** La media de las CMIs de la terbinafina para un tiempo de incubación de 15 días, están comprendidas en un rango entre 0,02 µg/ml y 0,0975 µg/ml con una media de 0,06 µg/ml, para un tiempo de 30 días la CMI comprende un rango de 0,0975 µg/ml a 0,39 µg/ml, representando una media de 0,16 µg/ml, y para un tiempo de 45 días la CMI está en un intervalo entre 0,195 µg/ml y 0,39 µg/ml, con una media de 0,23 µg/ml, mientras que las CMI obtenidas para el clotrimazol para un tiempo de 15, 30 y 45 días están comprendidas en un rango entre 3,125 µg/ml y 50 µg/ml, para un tiempo de 15 días la media de CMI es de 13,4 µg/ml, para 30 días la media de la CMI es de 15,2 µg/ml y a los 45 días de incubación la media de las CMI es de 17,96 µg/ml. En las tablas 1 y 2, observamos el número de cepas inhibidas pero acumuladas, a las diferentes concentraciones de los dos antifúngicos y para un tiempo de incubación de 15, 30 y 45 días.

**Tabla 1.** Número de cepas inhibidas por la terbinafina a un tiempo de incubación de 15, 30 y 45 días.

Concentración (µg/ml)	Tiempo (días)		
	15	30	45
0,02	1	-	-
0,048	10	-	-
0,0975	20	11	-
0,195	-	17	16
0,39	-	20	20

**Tabla 2.** Número de cepas inhibidas por el clotrimazol a un tiempo de incubación de 15, 30 y 45 días.

Concentración (µg/ml)	Tiempo (días)		
	15	30	45
3,125	4	1	1
6,25	7	5	4
12,5	16	15	13
25	19	19	18
50	20	20	20

**Efecto del incremento del tiempo de incubación sobre las CMI.** En la figura 3, podemos apreciar que las medianas observadas representan valores constantes al comparar la media de las CMI del clotrimazol con cada tiempo de incubación, estadísticamente no hubo una variación significativa ( $p=0,464$ ). Sin embargo, en la figura 4, podemos expresar que las CMI de la terbinafina aumentan al prolongarse el tiempo de incubación, ya que los valores de la mediana que resulta de comparar las medias de la CMI con los tiempos de incubación, no permanecen constantes ( $p<0,001$ ).

## DISCUSIÓN

Las pruebas de sensibilidad antifúngica para hongos filamentosos, se encuentran en proceso de estandarización. La determinación de sus CMI ofrecen dificultades para ser interpretadas [9-13]. Algunas cepas de dermatofitos tienden a formar una gran extensión de hifas aéreas y cuyas bases no quedan totalmente insertadas en el agar, no entrando en contacto con el antifúngico y por lo tanto quedando libres de inhibición; además algunas cepas de dermatofitos, especialmente de *T. rubrum* var. *villosa* esporulan con mucha dificultad, comportándose *in vitro* como un dermatofito de lento metabolismo que condiciona a una lenta asimilación de nutrientes y por lo tanto de antifúngico. Otros factores como el tamaño del inóculo, temperatura y tiempo de incubación, son parámetros que pueden influir en la determinación de la CMI para hongos filamentosos.

La terbinafina es un potente fungicida *in vivo* contra dermatofitos [14]. Evans y cols. [15] y Smith [16], compararon la eficacia *in vivo* del clotrimazol y la terbinafina en pacientes afectados de *Tinea pedis*. Estos autores demuestran que esta nueva alilamina es capaz de producir respuestas de eficacia más rápida en períodos más cortos de tratamiento, comparándola con el clotrimazol.

En la literatura encontramos varios estudios sobre la susceptibilidad *in vitro* del clotrimazol y la terbinafina frente a *T. rubrum* [17-19]; la mayoría de los autores coinciden en que éste antifúngico presenta valores de CMI mucho más bajas que el clotrimazol, éste hecho demuestra la efectividad *in vitro* de esta sustancia. Sin embargo, para hongos levaduriformes, la eficacia de la terbinafina tanto *in vivo* como *in vitro* es cuestionable [7].

Los resultados obtenidos en nuestro estudio también revelan una clara superioridad de la terbinafina frente al clotrimazol. Sin embargo, comparando las CMI

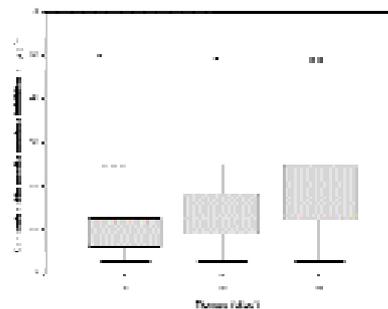


Figura 3. Efecto del incremento del tiempo de incubación sobre las CMI del clotrimazol. Para  $n=20$ ; la mediana — representa la media geométrica  $\pm$  DS de las CMI, para un tiempo de 15, 30 y 45 días. Los valores de las CMI permanecen constantes ( $p=0,464$ ); ■ = N° de cepas con una CMI de 50 µg/ml; □ = N° de cepas con una CMI de 25 µg/ml.

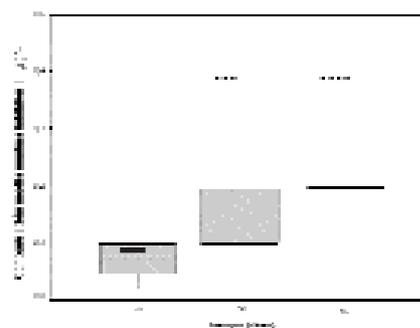


Figura 4. Efecto del incremento del tiempo de incubación sobre las CMI de la terbinafina. Para  $n=20$ ; la mediana — representa la media geométrica  $\pm$  DS de las CMI, para un tiempo de 15, 30 y 45 días. Estadísticamente, hay incremento significativo ( $p=0,001$ ); □ = N° de cepas con una CMI de 0,39 µg/ml.

obtenidas en nuestro trabajo con las CMI obtenidas en otros [19,20], observamos algunas discrepancias, claro está que las condiciones del ensayo, el método empleado y los parámetros que se tomaron en cuenta para la determinación de las CMI son diferentes, y el tiempo de incubación no se prolongó más allá de 15 días.

El tiempo de incubación es un factor importante en la determinación de la CMI para bacterias y levaduras [21]; sin embargo, para hongos filamentosos, se observan en la literatura muy pocos trabajos que cuestionen éste hecho. Gehrt [22], estudiando la sensibilidad *in vitro* en hongos filamentosos, observó que un período de incubación prolongado afecta notablemente los valores de la CMI en ciertos antifúngicos. En nuestro estudio, éste parámetro no afectó la CMI del clotrimazol que permaneció constante al paso del tiempo; sin embargo, notamos que los valores de la CMI de la terbinafina aumentan significativamente al incrementar el período de incubación de las cepas. Este hecho es debido quizá a que las bajas concentraciones utilizadas de éste antifúngico son muy inferiores a la concentración antifúngica efectiva.

Como conclusión en nuestro estudio podemos decir que la terbinafina ofrece una mayor eficacia *in vitro* que el clotrimazol y que los valores de las CMI dependen del tiempo de incubación y del tipo de antifúngico, por lo tanto es necesario realizar determinaciones seriadas en el tiempo.

**Bibliografía**

1. Zaias MD, Gerbert-Rebell MS. Chronic dermatophytosis syndrome due to *Trichophyton rubrum*. *Int J Dermatol* 1996; 35: 614-618.
2. Hay RJ, Clayton YM. Itraconazole in the management of chronic dermatophytosis. *J Am Acad Dermatol* 1990; 23: 561-564.
3. Hay RJ, Brostoff J. Immune responses in patients with chronic *Trichophyton rubrum* infections. *Clin Exp Dermatol* 1977; 3: 373-380.
4. Torres-Rodríguez JM. Antifúngicos empleados en el tratamiento de las micosis humanas. En: Torres-Rodríguez JM, del Palacio-Hernanz A, Negroni-Briz R, Pereiro-Miguens M (Eds.) *Micología Médica*. Barcelona, Masson, 1994: 29-41.
5. Sawyer P, Brogolen R, Pinder R. Clotrimazole: a review of its antifungal activity and therapeutic efficacy. *Drugs* 1975; 9: 424-497.
6. Zaias BF. Superficial mycoses: Treatment whit a new, broad-spectrum antifungal agent: 1% clotrimazole solution. *Arch Dermatol* 1977; 307-308.
7. Abdel-Rahman JM, Nahata MC. Oral terbinafina: a new antifungal agent. *Ann Pharmacother* 1997; 31: 445-456.
8. Favre B, Ryder N. Differential inhibition of fungal and mammalian squalene epoxidases by the benzilamine SDZ SBA 586 in comparison with the allylamine terbinafina. *Arch Biochem-Biophys* 1997; 340: 265-269.
9. Rubio-Calvo C, Gil-Tomás J, Ruesca R, Quindós G. Sistemas de valoración *in vitro* de los antifúngicos. En: Casal-Román M (Ed.) *Métodos de estudio de la actividad de los antimicrobianos*. Córdoba, Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba, 1995: 345-388.
10. Chee-leok G. *In vitro* evaluation of griseofulvina, ketoconazole and itraconazole against dermatophytes en Singapore. *Int J Dermatol* 1994; 33: 733-737.
11. Rodríguez-Tudela JL. ¿Son útiles las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos? *Bol Contr CAL* 1996; 8: 19-23.
12. Aletta G. Antifungal susceptibility testing with dermatophytes. *Mycoses* 1991; 34: 193-199.
13. Pemán-García J, Cantón-Lacasa E. Las pruebas de susceptibilidad antifúngica en un laboratorio de microbiología clínica. *Rev Esp Quimioter* 1996; 9: 17-20.
14. Zaias N, Glick B. Diagnosing and treating onychomycosis. *J Fam Pract* 1996; 42: 513-518.
15. Evans EG, Dodman B, Williamson D. Comparison of terbinafina and clotrimazole in treating tinea pedis. *Brit Med J* 1993; 307: 645-647.
16. Smith EB. Topical antifungal drugs in the treatment of tinea pedis, tinea cruris and tinea corporis. *J Am Acad Dermatol* 1993; 28: 24-28.
17. Korting HC, Ollert M, Abeck D *et al.* Results of German multicenter study of antimicrobial susceptibilities of *T. rubrum* and *T. mentagrophytes* strain causing tinea unguis. German collaborative dermatophyte drug susceptibility study group. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1206-8.
18. Venugopal PV, Venugopal TV. Disk diffusion susceptibility testing of dermatophytes with allylamines. *Int J Dermatol* 1994; 33: 730-2.
19. Butty P, Lebecq J, Mallié M. Evaluation of the susceptibility of dermatophytes to antifungal drugs: a new technique. *J Med Vet Mycol* 1995; 33: 403-409.
20. Macura A. *In vitro* susceptibility of dermatophytes to antifungal drugs: a comparison of two methods. *Int J Dermatol* 1993; 32: 533-536.
21. Galgiani J. Standardization of antifungal susceptibility testing. *J Med Vet Mycol* 1992; 30: 213-224.
22. Gehrt A, Peter J, Pizzo P. Effect of increasing inoculum sizes of pathogenic filamentous fungi on MICs of antifungal agents by broth microdilution method. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1302-1307.