

Sensibilidad de hongos miceliares dematiáceos a diez antifúngicos empleando un método de difusión en agar

Julman Rosiris Cermeño Vivas¹ y Josep M^a Torres -Rodríguez²

¹Departamento de Parasitología y Microbiología, Escuela de Medicina, Universidad de Oriente, Ciudad Bolívar, Venezuela; ²Grup de Micologia Experimental i Clínica (GREMEC), Institut Municipal d' Investigació Mèdica /IMAS, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España

Resumen

Se ha evaluado la utilidad del método de difusión en agar *NeoSensitabs*® para determinar la sensibilidad *in vitro* de 52 aislamientos de hongos filamentosos dematiáceos a diez antifúngicos: anfotericina B, 5-fluorocitosina, ketoconazol, fluconazol, itraconazol, terbinafina, bifonazol, miconazol, clotrimazol, y griseofulvina. Para la preparación del inóculo se utilizó un método espectrofotométrico empleándose los medios de Shadomy y Casitone agar (CAS), simultáneamente. Todos los aislamientos fueron sensibles al itraconazol, terbinafina y bifonazol. Al ketoconazol el 90,4% resultaron sensibles, al miconazol el 71% y al clotrimazol el 46%. El 63% de las cepas fueron sensibles a la anfotericina B y el 28,8% resistente. Por el contrario, el 94,2% de los aislamientos resultaron resistentes a la griseofulvina y el 96% al fluconazol. El 100% de las cepas fueron resistentes a la 5-fluorocitosina.

Las zonas de inhibición no mostraron variaciones en cuanto a la sensibilidad dependiendo del medio; sin embargo, hubo un mejor desarrollo fúngico en el medio CAS.

Las variaciones en la sensibilidad observadas con especies como *Exophiala spinifera* y *Fonsecaea pedrosoi* justificarían el estudio de la sensibilidad *in vitro* para valorar el tratamiento clínico con antifúngicos.

Estos resultados demuestran que el método de difusión en agar *NeoSensitabs*® es fácil de realizar, rápido y económico por lo que está al alcance de muchos laboratorios clínicos para el estudio de la sensibilidad *in vitro* en mohos dematiáceos.

Palabras clave

Hongos dematiáceos, Antifúngicos, Sensibilidad *in vitro*, Difusión en agar, *NeoSensitabs*®

In vitro susceptibility of dematiaceous fungi to ten antifungal drugs using an agar diffusion test

Summary

We assessed the usefulness of an agar diffusion method, *NeoSensitabs*™, to determine *in vitro* sensitivity of 52 isolates of dematiaceous filamentous fungi against ten antifungal agents: amphotericin B, 5-fluorocytosine, ketoconazole, fluconazole, itraconazole, terbinafine, bifonazole, miconazole, clotrimazole, and griseofulvin. For the preparation of the inoculum, a spectrophotometric method including both Shadomy and Casitone agar (CAS) culture media was used. Dematiaceous filamentous fungi were sensitive to itraconazole, terbinafine and bifonazole. Ketoconazole (90.4%), miconazole (71%), and clotrimazole (46%) showed a variable susceptibility pattern. Most species were resistant to griseofulvin and fluconazole (96%). All isolates were resistant to 5-fluorocytosine. Sixty-three percent of strains were susceptible to amphotericin B and 28.8% resistant. Inhibition zones in the antifungal susceptibility testing did not vary according to culture medium, although fungal growth was better in CAS. Variations in antifungal sensitivity in *Exophiala spinifera* and *Fonsecaea pedrosoi* spp. would justify an *in vitro* susceptibility study when indicating antifungal therapy. These results show that *NeoSensitabs*™ agar diffusion method is simple, rapid, and low-cost and can be available to many clinical laboratories for the study of *in vitro* sensitivity of dematiaceous moulds.

Key words

Dematiaceous fungi, Antifungal drugs, *In vitro* susceptibility, Agar diffusion, *NeoSensitabs*™

Dirección para correspondencia:

Dr. Josep M Torres-Rodríguez
GREMEC /IMAS
C/ Dr. Aiguader, 80
08003 Barcelona, España
Tel.: +34 93 221 1009
Email: jmtorres@imim.es

Aceptado para publicación el 4 de Julio de 2001

La creciente incidencia y diversidad de las infecciones fúngicas oportunistas en pacientes inmunodeprimidos, ha favorecido el mejor conocimiento de las micosis, y el desarrollo de nuevos antifúngicos que ofrecen nuevas alternativas al tratamiento clásico de estas infecciones [1,2].

Al mismo tiempo, se ha evidenciado un interés creciente por las pruebas de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos para levaduras y hongos filamentosos. La aparición de cepas resistentes es un factor que puede condicionar la terapéutica. [3,4]. En el caso de las levaduras, se realizó un gran esfuerzo para el establecimiento de una técnica adecuada de referencia habiéndose aceptado por la gran mayoría de los investigadores el Documento M 27-A publicado en 1997; por el National Committee for Clinical Laboratories Standards de Estados Unidos de Norteamérica.

Basado en este documento se han propuesto los primeros criterios de estandarización para determinar concentraciones inhibitorias mínimas (CMI) en hongos filamentosos, pero todavía no están suficientemente optimizadas [5] en estos métodos no se menciona en particular a los hongos dematiáceos.

Existe una diversidad de métodos comerciales alternativos a los de referencia basados en las pruebas de difusión y dilución en agar, con los que se puede estudiar la sensibilidad a antifúngicos que se encuentran, bien a una concentración fija o en concentraciones diferentes, determinando cualitativamente si el hongo es sensible, resistente o moderadamente sensible; o bien se puede conocer cuantitativamente utilizando una serie de diluciones seriadas que nos permiten determinar las CMI [6-14].

Los métodos de difusión en agar son comunes en un laboratorio clínico de bacteriología, económicos y fáciles de realizar como rutina en un laboratorio clínico [15].

El método *NeoSensitabs*, se basa en la adaptación de la técnica de difusión en agar, en la que el antifúngico se encuentra en forma de tabletas con concentraciones fijas. Es una técnica sencilla y rápida que consiste en sembrar el inóculo estandarizado sobre un medio de cultivo sólido y posteriormente se colocan las tabletas con antifúngicos, en concentraciones fijas y predeterminadas. La difusión radial del antifúngico en el agar crea halos de inhibición concéntrica, como consecuencia del gradiente de concentración formado [15-18].

El objetivo de este trabajo fue determinar la sensibilidad *in vitro* de 52 aislamientos de hongos filamentosos dematiáceos a diez antifúngicos: anfotericina B, 5-fluorocitosina, ketoconazol, fluconazol, itraconazol, terbinafina, bifonazol, miconazol, clotrimazol y griseofulvina mediante la difusión en agar cualitativa utilizando tabletas *NeoSensitabs*®.

MATERIALES Y MÉTODOS

Antifúngicos. En la realización de este método se emplearon diez antifúngicos (comercializados por Rosco Diagnóstica, Dinamarca) anfotericina B (tabletas de 20 µg), ketoconazol (15 µg), fluconazol (15 µg), itraconazol (10 µg), 5-fluorocitosina (10 µg), clotrimazol (10 µg), miconazol (10 µg), bifonazol (10 µg), terbinafina (30 µg) y griseofulvina (25 µg).

Cepas. Se estudiaron 17 especies de hongos filamentosos dematiáceos, con un total de 52 cepas, de las cuales 22 fueron aislamientos de pacientes con micetomas, feohifomicosis y cromomicosis de Venezuela y Brasil. Estas cepas fueron aportadas por la Universidad Experimental Nacional Franciscas de Miranda, Coro, Venezuela; la Cátedra de Micología de la Universidad

Central de Venezuela y del Hospital de Clínicas de la Universidad Federal Do Paraná (Brasil). Las treinta restantes fueron aisladas de la naturaleza y proporcionadas por el Laboratorio de Micología del Instituto Municipal de Investigación Médica (IMIM) (Barcelona) y por la Sección de Micología del Instituto de Higiene, Facultad de Medicina (Montevideo, Uruguay).

Los 52 aislamientos estudiados consistieron en: *Fonsecaea pedrosoi* (n=14), *Cladophialophora carrionii* (n=9), *Exophiala spinifera* (n=6), *Exophiala dermatitidis* (n=3), *Exophiala jeanselmei* (n=3), *Cladosporium sphaerospermum* (n=3), *Madurella grisea* (n=2), *Madurella mycetomatis* (n=2), *Phialophora verrucosa* (n=2), *Cladophialophora trichoides* (n=1), *Cladosporium cladosporioides* (n=1), *Cladosporium herbarum* (n=1), *Exophiala castellanii* (n=1), *Exophiala moniliae* (n=1), *Fonsecaea compacta* (n=1), *Pyrenochaeta romeroi* (n=1), *Rinocladiella aquaspersa* (n=1).

Cepas controles. Se utilizaron *Paecilomyces variotii* ATCC 36257 y *Candida krusei* ATCC 6258. Todas las cepas se conservaron en medio de agar glucosado de Sabouraud y se sembraron en medio de agar de Sabouraud diluido, a 25 °C durante 5-7 días para obtener el máximo de conidios para la preparación del inóculo.

Preparación del inóculo fúngico. El inóculo fue estandarizado mediante espectrofotometría, a 530 nm de longitud de onda a 40-50% de transmitancia y se obtuvo un inóculo de 1-5 x 10⁶ UFC/ml, como se describió previamente [19].

Medios de cultivo. Se empleó el medio modificado de Shadomy, tal como lo recomienda Rosco Diagnóstica y el medio Casitone (Difco, France) agar con 2% de glucosa.

Procedimiento. Luego de agitar la suspensión estandarizada de conidios se depositaron 100 µl sobre la superficie del agar de ambos medios. Con un asa bacteriológica estéril se procedió a extender la suspensión en el medio mediante la técnica de agotamiento hasta que el inóculo quedó distribuido de modo homogéneo. Luego se inclinó la placa, para descartar el exceso, si era necesario, y se secó a 30°C durante 15-20 min. A continuación se procedió a colocar las diferentes tabletas antifúngicas sobre la superficie del medio, con una pinza estéril. Las placas se incubaron a 30°C durante 96 a 144 h, aunque fueron observadas diariamente hasta 14 días.

Lectura de resultados. Se efectuó por la medición de los halos de inhibición, en milímetros, dada por la difusión concéntrica del antifúngico en torno a las tabletas. No se consideraron las franjas de colonias semiinhibidas, en el caso de los antifúngicos azólicos.

Interpretación de resultados. Las colonias ubicadas dentro de las zonas de inhibición fueron consideradas como resistentes a esos antibióticos.

Los valores de las CMI de los antifúngicos anfotericina B, ketoconazol, fluconazol, itraconazol y 5-fluorocitosina fueron interpretados siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Dado que en el Manual de las Pruebas de Sensibilidad Antifúngica de *NeoSensitabs*® no se incluye la terbinafina, que generalmente ocasiona un gran halo de inhibición con los aislamientos sensibles, se consideraron como resistentes las cepas con halos inferiores a los 22 mm de diámetro. Arbitrariamente se consideraron de sensibilidad intermedia las que presentaban entre 23 y 29 mm, y sensibles un diámetro igual o superior a los 30 mm.

Análisis estadístico. Se calculó la media geométrica y desviación estándar de las CMI para cada antifúngico. El tratamiento estadístico de los datos se realizó mediante el paquete SPSS/PC + versión 6.1 (Statistical Package for Social Sciences) para IBM.

RESULTADOS

Se obtuvieron 1.080 valores de medidas del tamaño de zona de inhibición del total de cepas y antifúngicos analizados. La cepa control de *C. krusei* resultó resistente al fluconazol y 5 fluorocitosina y sensible a la anfotericina B. *P. variottii* mostró un halo amplio para el itraconazol y anfotericina, y resultó resistente para la 5-fluorocitosina y fluconazol. No se dispone de información sobre estas cepas de referencia a otros antifúngicos.

El crecimiento de los hongos dematiáceos fue visible a las 96 h de incubación aunque con algunas cepas (*E. jeanselmei*, *M. mycetomatis* y *M. grisea*) fue necesario aguardar hasta las 144 h para que el desarrollo del hongos fuera adecuado para la lectura.

No hubo variación en los valores de las medidas del tamaño de zona de inhibición durante los 14 días en que fueron observadas las placas.

Tanto en el medio CAS como en el agar modificado de Shadomy se determinaron los diámetros de inhibición de forma fácil y rápida. Las zonas de inhibición no mostraron variaciones en la sensibilidad dependientes de los medios, sin embargo, hubo un mejor desarrollo fúngico en el medio CAS.

No se observaron franjas de colonias parcialmente inhibidas, ni halos múltiples, para los azoles. Con la 5-fluorocitosina y la anfotericina B no se observaron colonias en el interior del halo de inhibición. En los aislamientos resistentes no se apreciaron zonas de inhibición, evidenciándose el crecimiento del hongo alrededor de la tableta de antifúngico.

Como muestra la tabla 1, de los 52 aislamientos, el 63,5% fueron sensibles a la anfotericina B (n=33), el 7,7% mostró una sensibilidad intermedia (n=4) y el 28,8% fueron resistentes (n=15)

Todos los aislamientos fueron sensibles al itraconazol, bifonazol y terbinafina mientras que resultaron resistentes a la 5-fluorocitosina. La gran mayoría de los aislamientos fueron resistentes a la griseofulvina (94,2 %), solamente tres cepas de origen clínico (una de *C. carrionii*, una de *E. castellanii* y una de *F. pedrosoi*) resultaron sensibles a este antifúngico.

Tabla 1. Sensibilidad de aislamientos clínicos y ambientales de hongos miceliares dematiáceos a la anfotericina B mediante el método de difusión en agar con tabletas antifúngicas.

| Especies | Nº de cepas | Sensible (%) | Intermedia (%) | Resistente (%) |
|--------------------------|-------------|------------------|----------------|------------------|
| Origen clínico | | | | |
| <i>C. carrionii</i> | 6 | 3 (50) | - | 3 (50) |
| <i>E. castellanii</i> | 1 | - | 1 (100) | - |
| <i>E. jeanselmei</i> | 2 | 2 (100) | - | - |
| <i>E. moniliae</i> | 1 | 1 (100) | - | - |
| <i>F. compacta</i> | 1 | 1 (100) | - | - |
| <i>F. pedrosoi</i> | 6 | 4 (66,6) | 1 (16,6) | 1 (16,6) |
| <i>M. grisea</i> | 1 | - | - | 1 (100) |
| <i>M. mycetomatis</i> | 1 | 1 (100) | - | - |
| <i>P. romeroi</i> | 1 | 1 (100) | - | - |
| <i>P. verrucosa</i> | 1 | 1 (100) | - | - |
| <i>R. aquaspersa</i> | 1 | 1 (100) | - | - |
| Origen ambiental | | | | |
| <i>C. carrionii</i> | 3 | 1 (33,3) | 1 (33,3) | 1 (33,3) |
| <i>C. cladosporoides</i> | 1 | 1 (100) | - | - |
| <i>C. herbarum</i> | 1 | 1 (100) | - | - |
| <i>C. sphaerospermum</i> | 3 | 1 (33,3) | - | 2 (66,7) |
| <i>C. trichoides</i> | 1 | - | - | 1 (100) |
| <i>E. dermatitidis</i> | 3 | 3 (100) | - | - |
| <i>E. jeanselmei</i> | 1 | 1 (100) | - | - |
| <i>E. spinifera</i> | 6 | 6 (100) | - | - |
| <i>F. pedrosoi</i> | 8 | 2 (25) | 1 (12,5) | 5 (62,5) |
| <i>M. grisea</i> | 1 | 1 (100) | - | - |
| <i>M. mycetomatis</i> | 1 | 1 (100) | - | - |
| <i>P. verrucosa</i> | 1 | - | - | 1 (100) |
| Total | | 33 (63,5) | 4 (7,7) | 15 (28,8) |

Excepto dos aislamientos ambientales de *E. spinifera*, que resultaron sensible y de sensibilidad intermedia, el resto fueron resistentes al fluconazol. El 90,4 % de cepas fueron sensibles al ketoconazol, seguido del micotrimazol (71,2 %) y de clotrimazol (46,2 %) (Tabla 2).

Estos hallazgos los podemos resumir de la siguiente manera: ITR = TB = BFZ > KTZ > MCZ > AMB > CTZ > GF > FLZ > 5FC.

Las especies que mostraron más variabilidad fueron *E. spinifera* y *F. pedrosoi*, el insuficiente número de aislamientos de otras especies impide considerar su posible variabilidad en las pruebas de sensibilidad. No se encontraron diferencias significativas en cuanto al origen clínico o ambiental de las cepas (p = 0,5).

Tabla 2. Sensibilidad al miconazol, ketoconazol y clotrimazol de hongos dematiáceos mediante el método de de difusión en agar (Expresado en porcentajes).

| Especies (n) | Miconazol | | | Ketoconazol | | | Clotrimazol | | |
|------------------------------|-------------|------------|-------------|-------------|------------|------------|-------------|------------|-------------|
| | Sensible | Intermedia | Resistente | Sensible | Intermedia | Resistente | Sensible | Intermedia | Resistente |
| Clínicas | | | | | | | | | |
| <i>C. carrionii</i> (6) | 83,3 | - | 16,7 | 100 | - | - | 66,7 | - | 33,3 |
| <i>E. castellanii</i> (1) | 100 | - | - | 100 | - | - | 100 | - | - |
| <i>E. jeanselmei</i> (2) | 100 | - | - | 100 | - | - | 100 | - | - |
| <i>E. moniliae</i> (1) | 100 | - | - | 100 | - | - | 100 | - | - |
| <i>F. compacta</i> (1) | 100 | - | - | 100 | - | - | 100 | - | - |
| <i>F. pedrosoi</i> (6) | 66,6 | - | 33,3 | 100 | - | - | 66,6 | - | 33,3 |
| <i>M. grisea</i> (1) | 100 | - | - | - | 100 | - | - | - | 100 |
| <i>M. mycetomatis</i> (1) | 100 | - | - | 100 | - | - | - | - | 100 |
| <i>P. romeroi</i> (1) | 100 | - | - | 100 | - | - | - | - | 100 |
| <i>P. verrucosa</i> (1) | 100 | - | - | 100 | - | - | 100 | - | - |
| <i>R. aquaspersa</i> (1) | 100 | - | - | 100 | - | - | - | 100 | - |
| Ambientales | | | | | | | | | |
| <i>C. carrionii</i> (3) | 100 | - | - | 100 | - | - | - | - | 100 |
| <i>C. cladosporoides</i> (1) | - | - | 100 | - | - | 100 | - | - | 100 |
| <i>C. herbarum</i> (1) | 100 | - | - | 100 | - | - | - | - | 100 |
| <i>C. sphaerospermum</i> (3) | 100 | - | - | 100 | - | - | 100 | - | - |
| <i>C. trichoides</i> (1) | - | - | 100 | 100 | - | - | - | - | 100 |
| <i>E. dermatitidis</i> (3) | 33,3 | 33,3 | 33,3 | 100 | - | - | - | - | 100 |
| <i>E. jeanselmei</i> (1) | 100 | - | - | 100 | - | - | 100 | - | - |
| <i>E. spinifera</i> (6) | 33,3 | 33,3 | 33,3 | 66,7 | 16,7 | 16,7 | 33,3 | 16,7 | 50 |
| <i>F. pedrosoi</i> (8) | 62,5 | - | 37,5 | 87,5 | - | 12,5 | 37,5 | 12,5 | 50 |
| <i>M. grisea</i> (1) | 100 | - | - | 100 | - | - | 100 | - | - |
| <i>M. mycetomatis</i> (1) | 100 | - | - | 100 | - | - | - | - | 100 |
| <i>P. verrucosa</i> (1) | - | - | 100 | 100 | - | - | - | - | 100 |
| Total | 71,2 | 5,8 | 23,1 | 90,4 | 3,8 | 5,8 | 46,2 | 5,8 | 48,1 |

DISCUSIÓN

El método de difusión en agar utilizando discos o tabletas impregnadas de antibióticos está muy difundido y aceptado por su fácil realización, especialmente en laboratorios bacteriológicos donde se utiliza como un método de rutina.

En micología este método no ha conseguido su aceptación por parte de numerosos autores, se argumenta que los antifúngicos polienos son inestables en los discos y que es difícil conseguir una buena solubilidad de los azoles [14,16].

La ventaja de esta técnica es que se ha comercializado tabletas con una gran variedad de antifúngicos tópicos y sistémicos (21 antifúngicos diferentes) [16].

La mayoría de los ensayos que se han publicado se refieren a la sensibilidad en levaduras, de esta forma en un estudio multicéntrico se concluyó con estos microorganismos se conseguía una aceptable reproducibilidad del método intra e interlaboratorio [21], otra situación es la relación que existe entre los resultados que proporciona una difusión cualitativa en agar con un método de referencia internacionalmente aceptado.

Como los datos referidos a la aplicación del sistema Neosensitabs en hongos miceliares dematiáceos, es prácticamente nula, se decidió efectuar el presente estudio.

Para la técnica se empleó el inóculo estandarizado de 1 a 5×10^6 UFC/ml en vez de 1×10^5 UFC/ml recomendado para levaduras, que asegurara un mejor desarrollo de las colonias de especies que tienen un lento crecimiento. Asimismo se consideró de interés valorar los resultados con dos medios de cultivo diferentes (agar modificado de Shadomy y CAS).

La medición de los diámetros de las zonas de inhibición fueron idénticos en ambos medios empleados, con una reproducibilidad del 99,9%, demostrándose que podrían ser empleados indistintamente en hongos filamentosos dematiáceos. No obstante se verificó que el medio CAS es más eficaz ya que permitió un mayor desarrollo fúngico que contrasta mejor visualizándose muy bien los halos de inhibición, este hecho posiblemente sea atribuible al alto contenido de sales en su composición. El medio de CAS ha sido utilizado previamente en las pruebas de difusión en agar en levaduras y otros hongos filamentosos con buenos resultados [6].

Una vez alcanzado el desarrollo de las colonias, como máximo a las 144 h, los valores de los diámetros de inhibición no se incrementaron durante los 14 días de incubación en que fueron observados, demostrándose la estabilidad de las concentraciones de las tabletas antifúngicas. Estos hallazgos difieren de los observados en levaduras, para los métodos de dilución en medio líquido, en las cuales las CMI incrementan cuando se prolonga el tiempo de incubación [4,22,23].

La reproducibilidad obtenida en el presente estudio fue del 99,9%, superior a la reproducibilidad media global del 96,4% encontrada con levaduras [21].

En hongos miceliares se estudiaron 23 aislamientos clínicos de *Fusarium* comparando la difusión en agar con el método de dilución en agar, hallándose resultados de sensibilidad y resistencia con el fluconazol, itraconazol, ketoconazol y miconazol erróneos, cuando se consideró como técnica de referencia el método cuantitativo de dilución en agar [24].

Por el contrario Schmalreck *et al.* [14] en 145 aislamientos clínicos de diferentes levaduras, demostraron una buena correlación, para el fluconazol, con el método de microdilución, el de difusión en agar (>95% de concor-

dancia) y el E-test (78% de concordancia).

Asimismo, Krajewska-Kulak *et al.* [25], compararon el método de dilución en medio líquido y de difusión para el ketoconazol, en 144 aislamientos de *Candida albicans* y 29 *Candida* spp., encontrando una buena correlación (95,7%).

Estos datos sugieren que los resultados obtenidos con diferentes métodos de valorar la sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos, son fuertemente influidos, por el tipo de hongos que se estudia.

Para el clotrimazol los resultados fueron variables, sin embargo se ha descrito en un caso de feohifomicosis, causada por *Phialophora* spp. cuya cepa era sensible al clotrimazol utilizado terapéuticamente [26].

Se ha comunicado que cuatro aislamientos de hongos dematiáceos (*C. carrioni*, *P. verrucosa*, *F. pedrosoi* y *R. aquaspersa*) eran sensibles en grado variable a ocho derivados azólicos: bifonazol, clotrimazol, econazol, flucanazol, itraconazol, ketoconazol, miconazol y tioconazol, siendo *R. aquaspersa* la más resistente, estas pruebas se realizaron depositando el antifúngico en pocillos labrados en el agar. En ese estudio todas los aislamientos dematiáceos fueron sensibles al bifonazol, similares resultados se han encontrado para las mismas especies en el estudio presente a pesar de la diferencia en los métodos [26].

Existen pocos estudios donde se haya determinado la sensibilidad de hongos dematiáceos a la terbinafina y se haya evaluado su eficacia en pacientes [27]. Wong *et al.* [2], describieron el primer caso de infección sistémica causada por *Phialophora parasitica* y su tratamiento con terbinafina. La sensibilidad de esta especie fue analizada para la 5-fluorocitosina, anfotericina B, ketoconazol, miconazol, itraconazol y terbinafina, mostrando las CMI más bajas para miconazol, ketoconazol y terbinafina. Las CMI para el resto de los antifúngicos fueron elevadas, aunque finalmente se tuvo que suspender la terapia con la terbinafina por intolerancia, no pudiéndose valorar la eficacia de este antifúngico.

Speelveld *et al.* [24], consideraron una buena actividad de la terbinafina para aislamientos de *Fusarium moniliforme* (4/4) cuando la zona de inhibición fue de 20-25 mm y para especies de *Fusarium oxysporum* (10/10) cuando la zona de inhibición fue 20-28 mm, estos autores consideraron sensibles a las especies de hongos dematiáceos con diámetros de zonas mayores a 25 mm, que son inferiores a los asumidos en este estudio para la terbinafina.

Datos preliminares sobre la terapéutica de la cromomomicosis en Madagascar [24] sugieren que la terbinafina podría ser útil en las causadas por *F. pedrosoi*,

En el escaso número de publicaciones que consideran a la griseofulvina, se han encontrado que esta es inefectiva [28]; en este estudio sólo el 5,8% de los aislamientos resultaron sensibles a este antifúngico.

Para la anfotericina B posiblemente sea necesario determinar con mejor precisión el medio de cultivo óptimo, ya que casi el 29 de los aislamientos resultaron resistentes.

No se dispone de información suficiente sobre otros fármacos como la ciclopiroxolamina, sertaconazol, oxiconazol, amorolfina, flutrimazol y eberconazol así como en los nuevos antifúngicos aun no comercializados como el voriconazol y caspofungina, entre otros.

Aún quedan problemas por resolver en relación a las pruebas de sensibilidad antifúngica en hongos filamentosos, sin embargo se ha demostrado que éstas pueden ser estandarizadas adecuadamente. Entre las alternativas debe considerarse a la difusión en agar. El presente estudio demuestra que las tabletas comercializadas *NeoSensitabs* muestran una gran estabilidad de los antifúngicos.

Aunque es necesario disponer de otros datos como la relación entre los valores cualitativos proporcionados por esta técnica como los cuantitativos de las pruebas de referencia, los resultados obtenidos sugieren que puede ser empleado en el estudio de sensibilidad *in vitro* en hongos filamentosos dematiáceos, incluyendo los de crecimiento lento.

Bibliografía

1. Hohl PE, Holley P Jr, Prevost E, Ajello L, Padhye AA. Infections due *Wangiella dermatitidis* in humans: report of the firsts documented case from the United States and review of literature. *Rev Infect Dis* 1983; 5: 854-864.
2. Wong PK, Ching WTW, Kwon-Chung KJ, Meyer RD. Disseminated *Phialophora parasitica* infection in humans. *Rev Infect Dis* 1989; 11: 770-775.
3. Espinel-Ingroff A. La estandarización de las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos y métodos alternativos. *Rev Esp Quimioterap* 1994; 7: 20-31.
4. Espinel-Ingroff A. Standardization of antifungal susceptibility testing: Review update. *Rev Iberoam Micol* 1996; 13 (Suppl): S64-S68.
5. National Committee for Clinical Laboratories Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi; proposed standard. NCCLS document M38-P. Villanova, Pa. National Committee for Clinical Laboratories Standards, 1998.
6. Drouhet E, Dupont B, Improvisi L, Viviani MA, Tortorano AM. Disc agar diffusion and microplate automatized techniques for *in vitro* evaluation of antifungal agents on yeasts and sporulated pathogenic fungi. In Iwata K, Vanden Bossche H (Eds). *In vitro and in vivo* evaluation of antifungal agents. Amsterdam. Elsevier Sci Publ BV. 1986: 31-49.
7. Gari-Toussaint M, Delpech D, Pagliardini G, Le Fichoux Y. Adaptation de L'ATB-FUNGUS® à la détermination de la sensibilité des levures au fluconazole. Comparaison avec les concentrations minimales inhibitrices et les résultats thérapeutiques. *J Mycol Méd* 1996; 6: 72-75.
8. Ghannoum MA, Fu Y, Ibrahim AS, et al. *In vitro* determination of optimal antifungal combinations against *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 2459-2465.
9. Pontón J, Torres-Rodríguez JM, Salesa R, et al. Evaluación del Candifast, un nuevo método para la identificación y estudio de la sensibilidad antifúngica de levaduras de interés médico. *Rev Iberoam Micol* 1994; 11: 64-67.
10. Quindós G, Salesa R, Carillo-Muñoz A, et al. Multicenter evaluation of ATB fungus: a standardized micromethod for yeast susceptibility testing. *Chemotherapy* 1994; 40: 245-251.
11. Rex JH, Cooper CR Jr, Merz WG, Galgiani JN, Anaissie EJ. Detection of amphotericin B-resistant *Candida* isolates in a broth-based system. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 906-909.
12. Rubio MC, Gil TJ, Ruesca BR. Valoración *in vitro* de la sensibilidad a los antifúngicos. *Rev Iberoam Micol* 1996; 13 (Suppl): S60-63.
13. Saubolle MA, Hoepflich PD. Disk agar diffusion susceptibility testing of yeasts. *Antimicrob Agents Chemother* 1978; 14: 517-530.
14. Schmalreck AF, Kottmann I, Reiser A, Ruffer U, Scharr E, Vanca E. An evaluation of seven methods of testing *in vitro* susceptibility of clinical yeast isolates to fluconazole. *Mycoses* 1995; 38: 359-368.
15. Casals JB, Pringler N. Antibacterial / Antifungal sensibility testing using *NeoSensitabs*. 9th ed. Traastrup, Denmark, Rosco Diagnostica, 1991.
16. Casals JB. Tablet sensitivity testing of pathogenic fungi. *J Clin Pathol* 1979; 32: 719-22.
17. Scheven M, Scheven C. Quantitative screening for fluconazole-amphotericin B antagonism in several *Candida albicans* strains by a comparative agar diffusion assay. *Mycoses* 1995; 39: 111-114.
18. Utz CJ, Shadomy S. Antifungal activity of 5-fluorocytosine as measured by disk diffusion susceptibility testing. *J Infect Dis* 1977; 135: 970-974.
19. Cermeño-Vivas JR, Torres-Rodríguez JM. Método espectrofotométrico en la preparación del inóculo de hongos dematiáceos. *Rev Iberoam Micol* 1996; 15: 1555-1557.
20. Barry AL, Brown SD. Fluconazole disk diffusion procedure for determining susceptibility of *Candida* species. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2154-57.
21. Carrillo-Muñoz AJ, 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 (Suppl): S101-104.
22. To W-K, Fothergill AW, Rinaldi MG. Comparative evaluation of macrodilution and Alamar colorimetric microdilution broth methods for antifungal susceptibility testing of yeast isolates. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2660-2664.
23. López-Jodra O, Torres-Rodríguez JM, Mendez-Vasquez R, et al. *In vitro* susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates to five antifungal drugs using a colorimetric system and the reference microbroth method. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45: 645-649.
24. Speeleveld E, Gordts B, Van Landuyt HW, De Vroey C, Raes-Wuytack C. Susceptibility of clinical isolates of *Fusarium* to antifungal drugs. *Mycoses* 1996; 39: 37-40.
25. Krajewska-Kulak E, Niczyporuk W, Winter W. Comparison of broth dilution test and disk-diffusion test in the assessment of susceptibility of the yeast-like fungi to ketoconazole. *Mikol Lek* 1996; 3: 87-91.
26. Camero T, Magaldi S, Romero H. Susceptibilidad antifúngica de los principales agentes productores de cromomycosis, mediante el método de pozos de difusión. XXII Jornadas de Microbiología "José Antonio Serrano" Sociedad Venezolana de Microbiología Caracas, 1994: 148.
27. Esterre P, Andriantsahavandy A, Ramanantsoa E, Pecarrere JL. Forty years of chromoblastomycosis in Madagascar: A Review. *Am Trop Med Hyg* 1996; 55: 45-47.
28. Maruta H, Minami K. The course of a case of chromomycosis treated with 5-fluorocytosine. *Niscinih J Dermatol* 1975; 37: 391-395.