

## EFICACIA ANTIFÚNGICA IN VITRO DEL LUFENURON

Aicardi L<sup>1,2</sup>, Reinoso EH<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Cátedra de Micología Médica e Industrial “Prof. Dr. Pablo Negroni” – Carrera de Microbiología. Facultad de Ciencias Veterinarias – Universidad Nacional de La Plata.

<sup>2</sup> Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CICBA).

**Resumen:** Una de las patologías dérmicas con mayor prevalencia en la cunicultura de nuestra región es la dermatofitosis o tiñas del conejo. Esta enfermedad que involucra piel y pelos de ciertas regiones del cuerpo animal, es causada por eumycetos queratinofílicos, siendo *Trichophyton mentagrophytes* var *mentagrophytes* el más frecuentemente aislado en estos animales. Para determinar la eficacia antifúngica del Lufenuron -Benzoilfenilurea, inhibidor de la síntesis de quitina-, se evaluaron treinta cepas diferentes de *Trichophyton mentagrophytes* var *mentagrophytes*, aislados de conejos con lesiones clínicas, provenientes de establecimientos de La Plata y su zona de influencia. A partir de estos aislamientos se prepararon inóculos para realizar los estudios de sensibilidad a través del método de microdilución en medio líquido [RPMI 1640 y caldo glucosado-extracto de levadura] y el método de difusión en agar [Mueller Hinton modificado (MHm) y agar glucosado de Sabouraud (AGS)]. Las placas fueron incubadas a 28° C durante diez días. La inhibición del crecimiento fúngico frente a diferentes concentraciones de Lufenuron no fue observada en ninguna de las cepas ensayadas. Estos resultados demuestran que el Lufenuron no posee actividad antifúngica in vitro frente a estas especies de dermatofitos, pese a su actividad inhibidora de la síntesis de quitina en artrópodos.

**Palabras clave:** *Trichophyton mentagrophytes* - Dermatofitosis – Lufenuron – Sensibilidad in vitro.

## IN VITRO ANTIFUNGIC EFFICACY OF LUFENURON

**Abstract:** Dermatophytosis or rabbit's ringworms is one of the dermatological pathologies with a high prevalence at the rabbits breeding farms in our city. The skin and hair of specific areas of rabbit's body are involvement in this disease caused by keratinophilic dermatophytes, and the most frequent isolated in these animals is *Trichophyton mentagrophytes* var *mentagrophytes*. Thirty different *Trichophyton mentagrophytes* var *mentagrophytes* were isolated from rabbits with suspected lesions of superficial mycosis arising from breeding farms of La Plata city and surroundings areas, to determine the in vitro antifungal efficacy of Lufenuron [Benzoilphenilurea], a chitin synthase inhibitor. The spores suspensions were prepared from these isolates and used for the in vitro susceptibility testing by the broth microdilution method [RPMI 1640 medium and glucose-yeast extract broth] and agar diffusion method [modified Mueller-Hinton (MHm) and Sabouraud Glucose Agar (SGA)]. The plates were incubated at 28°C for ten days. No fungal growth inhibition to a different concentrations of Lufenuron was observed in any of the tested strains. In spite of the activity as a chitin synthase inhibitor in arthropods, the results showed that Lufenuron do not possess in vitro antifungal activity against these dermatophytes species.

**Key Words.:** *Trichophyton mentagrophytes* - Dermatophytosis – Lufenuron – In vitro susceptibility

Fecha de recepción: 28/02/07

Fecha de aprobación: 28/10/09

**Dirección para correspondencia:** Leandro Aicardi, Cátedra de Micología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. CC 296, (B1900AVW) La Plata. Argentina.

**E-mail:** micologia@fcv.unlp.edu.ar

## INTRODUCCIÓN

Los animales de peletería representan un nuevo objeto de producción animal (1). En la actualidad existe una creciente demanda a nivel mundial de pieles ecológicas, procedentes de animales como nutria, chinchilla, zorro o visón, intentando sustituir las de origen salvaje. También son ecológicas las pieles de conejo, que a pesar de ser un animal productor de carne, su piel es un subproducto alternativo, con un bajo costo de producción comparado con otras especies y de buena rentabilidad si es de calidad de exportación (2).

Las estadísticas de los últimos años, destacan a la Argentina como un país exportador de pieles de conejo. Esta situación internacional, impulsa a que este animal pueda producir pieles de valor peletero, con un destino final hacia países asiáticos y Europa (2, 3).

Claro que, este tipo de actividades, también trae aparejado algunos problemas, como las enfermedades infecto-contagiosas, entre las que se pueden citar a las micosis superficiales, que van en detrimento de la calidad de las pieles y de la propia producción.

Con el nombre de micosis, se agrupan una serie de enfermedades causadas por eumycetos - hongos - (4). Las micosis superficiales, las más importantes en animales, incluyen a las dermatofitosis o "tiñas", cuyos agentes etiológicos son eumycetos queratinofílicos, que tienen la capacidad de invadir tejidos queratinizados como las uñas, los pelos y el estrato córneo (5). Los dermatofitos se agrupan dentro de tres géneros: *Epidermophyton*, *Microsporium* y *Trichophyton*. Y acorde a su principal hospedador o hábitat, son considerados antropófilos (hombre), zoófilos (animales) y geófilos (suelo). Los animales actúan como reservorio (animales enfermos o portadores sanos) de *Trichophyton mentagrophytes var mentagrophytes*, *T. verrucosum*, *Microsporium canis*, entre otros; con un importante potencial zoonótico. *Trichophyton mentagrophytes*, es el principal agente causal de tiñas en conejos; y también *Microsporium canis*, ha sido informado por otros autores [Fig.1] (6, 7).

Las zoonosis son enfermedades que afectan al hombre y a uno o más vertebrados animales, y revelan que un animal infectado puede ser indicador de la situación epidemiológica del plantel o de la aparición de la infección humana. Por lo tanto, la exposición a estos animales afectados de dermatofitosis, constituyen un riesgo para la Salud Pública, tanto de los operarios como de los profesionales relacionados (1, 8). Esto demanda la realización de un diagnóstico preciso, y así poder establecer un tratamiento adecuado. Para lo cual, existe un número reducido de antimicóticos de uso veterinario; que tienen por objeto eliminar el hongo, disminuyendo al mínimo los efectos en el paciente. Las propiedades fungistáticas

o fungicidas de algunas drogas se basan en su capacidad de alterar, debilitar o destruir la pared celular constituida por varios polisacáridos como quitina, celulosa y mananos (4).

La síntesis de quitina es el sitio primario de ataque de los antibióticos nucleopéptidos [nicomicinas] y las benzoilfenilureas [lufenuron] (9).

El Lufenuron inhibiría la síntesis y depósito de quitina, interfiriendo con la formación de la pared de la célula micótica (10). Teniendo en cuenta este mecanismo de acción y la particular composición química de la pared de los hongos, el objetivo del presente trabajo es realizar estudios de sensibilidad *in vitro* de *Trichophyton mentagrophytes var mentagrophytes* aislados de conejos, con la finalidad de determinar la eficacia antifúngica del Lufenuron.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1 - DROGAS ENSAYADAS

Para la realización de este trabajo se empleó Lufenuron [PROGRAM®]-Suspensión inyectable para gatos - NOVARTIS S.A., Basilea, (Suiza).

De acuerdo a los niveles mínimos eficaces requeridos en sangre para el control de pulgas [50 ng a 100 ng/ml] (11), se realizaron sucesivas diluciones en tres disolventes: Agua Destilada Estéril [ADE], DMSO [Dimetilsulfóxido] y PEG [Polietilenglicol]; hasta lograr concentraciones finales de 500 ng, 250 ng, 125 ng y 62,5 ng. Por lo que se evaluó una concentración inferior de 62,5 ng que abarca ese nivel de actividad eficaz, hasta un punto superior de 500ng.

Como control positivo de inhibición, se utilizó Anfotericina B en solución de Desoxicolato de sodio [Concentración final 0,05 mg/ml].

### 2 - CEPAS

Los aislamientos de *Trichophyton mentagrophytes var mentagrophytes*, se llevaron a cabo en el laboratorio de la Cátedra de Micología Médica, a partir de las muestras de pelos y escamas de conejos, provenientes de establecimientos criadores de la región de la ciudad de La Plata y alrededores; con lesiones dérmicas compatibles con dermatofitosis o "tiñas".

El ensayo de Lufenuron se realizó sobre 30 cepas diferentes de *Trichophyton mentagrophytes var mentagrophytes*.

Se creó una micoteca con los hongos aislados, que fueron conservados en tubos en pico de flauta con Agar Glucosado de Sabouraud (AGS) hasta el momento de realizar los estudios.

Con el fin de lograr una óptima formación de conidios, las cepas de dermatofitos se repicaron en Agar papa glucosado (APG) [Glucosa 2% - extracto de levadura], con una incubación a 25 - 28 °C durante 10 días, para la posterior preparación de inóculos.

### 3a - Preparación del inóculo

Cada cepa se cubrió con 1 a 2 ml de agua destilada estéril, raspando suavemente la superficie de las colonias para extraer las formas conidiales. Se dejó decantar unos minutos para la precipitación de las partículas más groseras, y el sobrenadante se extravesó a otro tubo para obtener las diluciones correspondientes, a las que se ajustó su concentración final mediante espectrofotometría a 530nm [Espectrofotómetro UV Visible Wayers 7000], con alrededor de 68-70% de transmitancia. Este inóculo es equivalente a  $0,5 - 4 \times 10^6$  UFC/ml (12); y para su homogenización se agitó en un Vortex durante 3-5 segundos.

### 3b - Cuantificación del inóculo

Se realizó en placas de AGS para verificar el número de viables (UFC/ml). La suspensión ajustada por espectrofotómetro se diluyó 1:100 con agua destilada estéril (aprox.  $10^4$  UFC/ml). Se tomó una alícuota de 10  $\mu$ l y se sembró por diseminación en forma uniforme en toda la superficie de la placa con medio de cultivo. Éstas, se incubaron a 28-30° C. Se revisaron a diario hasta su óptimo crecimiento (colonias visibles), para comprobar el tamaño real del inóculo. Las UFC/ml se obtuvieron multiplicando el número de colonias contadas por el factor de dilución (13).

## 4 - MEDIOS DE CULTIVO PARA PRUEBAS DE SENSIBILIDAD

Se emplearon los medios de cultivo estándares recomendados por el CLSI (12, 14): Mueller-Hinton modificado (MHm), medio sólido suplementado con 2% de glucosa y 0,5  $\mu$ g/ml de azul de metileno para mejor lectura de los halos; y RPMI 1640 Buffer MOPS [0,165M], como medio líquido. Los medios complementarios fueron: Sabouraud Dextrosa Agar-extracto de levadura (sólido) y caldo glucosado- extracto de levadura (líquido).

## 5 - PROCEDIMIENTO

### 5a - Método de difusión en agar:

Luego de homogenizar los inóculos de cada cepa, se humedecieron una serie de hisopos con cada suspensión, y se estrió por agotamiento hasta distribución homogénea en toda la superficie de las placas de Petri, conteniendo los medios de cultivo con un espesor de 4mm. Luego con un sacabocados se procedió a realizar hoyuelos, en el cual se depositaron 100  $\mu$ l de cada una de las concentraciones a evaluar de Lufenuron, además del control positivo de inhibición Anfotericina B [Fig.2].

### 5b - Método de dilución en caldo:

Caldo RPMI 1640: a partir de la solución madre o stock de Lufenuron diluido en DMSO, se

prepararon en cuatro tubos las concentraciones a evaluar (100x), y se diluyeron 1:50 en RPMI 1640, como así también la droga control. Luego, se distribuyó 100  $\mu$ l de cada una de las concentraciones de Lufenuron por duplicado en una serie de tubos, más un tubo control de crecimiento de cada cepa con RPMI 1640 sin antifúngico. Del inóculo estandarizado, se realizó una dilución 1:50 y se inoculó 100  $\mu$ l a cada tubo. Por lo tanto, con los 100  $\mu$ l que se añadieron a los 100  $\mu$ l existentes ya en el tubo, se produjo una dilución 1:2 de todos los componentes, obteniendo la concentración adecuada a evaluar.

Caldo Glucosado: de igual modo, con la solución stock y la droga control, se realizaron una serie de diluciones en caldo obteniendo el rango de concentraciones a evaluar (10X), más un testigo de crecimiento positivo. Todos los tubos se inocularon con 10  $\mu$ l de la suspensión estandarizada de conidios.

## 6 - LECTURA DE RESULTADOS

Se realizó por observación simple de las placas y tubos, utilizando solo en casos dudosos una lupa estereoscópica para mejor resolución [Iroscope YZ-6].

## RESULTADOS

Todos los ensayos se realizaron por duplicado, repitiendo algunas pruebas también por duplicado, cuando resultaron dudosas.

Las diluciones de la droga se realizaron en diferentes solventes desde una concentración de 500 ng hasta 62,5 ng, considerando el nivel mínimo eficaz en sangre para el control de artrópodos [50 a 100 ng]. Los resultados demuestran que las cepas ensayadas resistieron las cuatro concentraciones de Lufenuron comparado con la Anfotericina B (0,05 mg), a la que todas fueron sensibles desde las primeras horas de contacto.

## DISCUSIÓN

Las primeras propuestas acerca del posible uso de Lufenuron en el tratamiento de la dermatofitosis, fueron realizadas por *Ben-Ziony Yy Arzi B* (15) en Israel, a través de un estudio clínico en perros y gatos, donde sus resultados indican que los animales que son tratados con Lufenuron remiten los signos clínicos más rápidamente, mientras que sin tratamiento la enfermedad persiste de dos a tres meses, concluyendo que la administración oral de Lufenuron parece ser efectiva para el tratamiento de ciertas infecciones fúngicas cutáneas en caninos y felinos.

Algunos estudios clínicos llevados a cabo en pequeños animales y realizados por diferentes autores, señalaron obtener una mejoría clínica en la evolución de la dermatofitosis en los animales que recibieron Lufenuron (16, 17). Sin embargo, estos mismos autores, negaron la eficacia de este

Tabla 1. Estudio de sensibilidad in vitro.

Table 1. In vitro susceptibility test.

LUFENURON	CONCENTRACION INHIBITORIA											
	62,5ng			125ng			250ng			500ng		
Solvente	ADE	DMSO	PEG	ADE	DMSO	PEG	ADE	DMSO	PEG	ADE	DMSO	PEG
Resultados	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

Referencias: ng: nanogramos. ADE: Agua destilada estéril. DMSO: Dimetilsulfóxido. PEG: Polietilenglicol. R: Resistente. En todos los casos se utilizó Anfotericina B como droga control de inhibición positiva.

Tabla 2: Curvas de muerte.

Table 2. Death curves.

DROGA	TIEMPO DE CONTACTO CULTIVO			
	48 h	96 h	192 h	5 Días
<b>LUFENURON</b> 62,5 ng	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
125 ng	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
250 ng	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
500 ng	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
<b>ANFOTERICINA B</b> 0,05 mg	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Referencias: ng: nanogramos. En todos los casos se utilizó una cepa de *Trichophyton mentagrophytes* como control de crecimiento positivo.

fármaco en el tratamiento de la dermatofitosis en trabajos posteriores (18, 19).

Destacamos la sugerencia del uso de Lufenuron para el tratamiento de la Coccidioidomycosis Pulmonar Primaria en caninos con buenos resultados en un periodo de cuatro meses, Bartsch y Greene (9); pero al no incluir estos autores un grupo control de animales sin tratamiento, y teniendo en cuenta que es una entidad autolimitante, dudamos de su efectividad. Duda esta, que confirma Johnson *et al.* (20), evaluando la sensibilidad in vitro de *Coccidioides immitis* a Lufenuron, con resultados negativos sobre este agente etiológico.

Zur G y Elad D (21), realizaron estudios de sensibilidad in vitro de dermatofitos de origen animal frente a Lufenuron, desarrollando métodos alternativos como la aplicación directa de la droga sobre el medio de cultivo, sangre y tejido celular subcutáneo de animales tratados, pero

sin resultados satisfactorios.

Por otro lado, los estudios de sensibilidad in vitro multicéntricos sirvieron para establecer los métodos de referencia, dentro de los cuales se destacan los recomendados por el CLSI y también los del EUCAST (22).

Entre las principales características que incluyen las técnicas de referencia se preconiza el uso de RPMI 1640 como medio de cultivo estándar, aunque al ser considerado un medio pobre para el crecimiento óptimo de algunos hongos, también se han evaluado técnicas que incluyen medios de cultivos como YNB, Medio Casitone (23), AM3 y Sabouraud (24); y hasta el propio CLSI propone en el documento M44-A para estudios de sensibilidad de *Cándida spp.*, el uso de Mueller-Hinton modificado (MHm) como medio de cultivo (14).

De todas maneras estos estándares no son una herramienta práctica para la rutina del

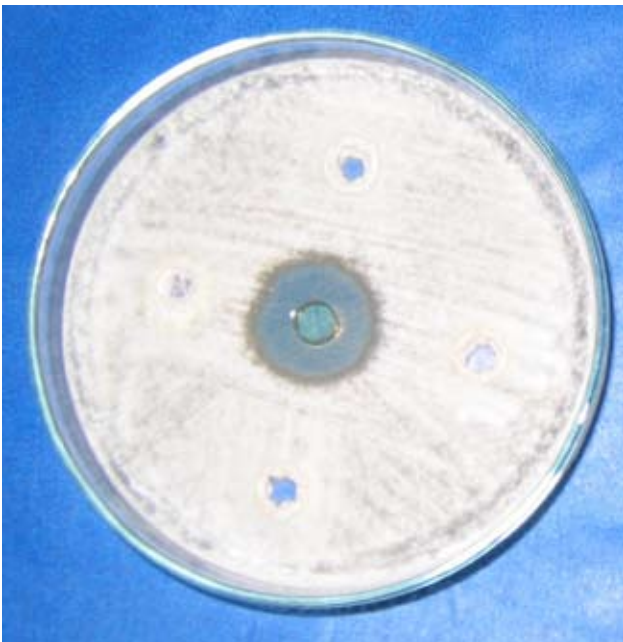
Fig. 1. Dermatofitosis. Lesión típica de "tiña" con alopecia y costras sobre el miembro anterior de un conejo.

Fig. 1. Dermatophytosis. Typical lesion of ringworm with alopecia and scabs on the rabbit's anterior leg.



Fig. 2. Método de Difusión en agar. Ensayo de las cuatro concentraciones de Lufenuron en comparación con la Anfotericina B como control positivo de inhibición.

Agar Diffusion Method. Four concentrations of Lufenuron test in comparison with Amphotericin B as inhibition positive control.



laboratorio de Microbiología clínica, por lo que sólo algunos centros especializados hacen uso de ellos (22).

Por lo expuesto podemos afirmar que la actividad antifúngica del Lufenuron sobre *Trichophyton mentagrophytes* de origen animal no es eficaz.

Esta afirmación estaría apoyada por los estudios de Zur G y Elad D (21), que confirma la falta de actividad antifúngica de esta droga en

sangre y tejido celular subcutáneo de animales tratados.

Por otra parte, la versión de posible acción inmunoreguladora (21), no nos parece coherente, toda vez que el Lufenuron actúa sobre la síntesis de quitina del exoesqueleto de las pulgas (25), para los que la acción inmunológica del huésped tendría escasa o nula implicancia en la recuperación del paciente.

Si se puede aceptar como lógica la propuesta de Johnson SM, et al (20), donde menciona la diferencia que existe en relación a la estructura química del Lufenuron, comparado con Nicomicina Z, otro inhibidor de la síntesis de quitina con actividad antifúngica. Asociando esta diferencia bioquímica a la posibilidad que el Lufenuron no sea activo en la inhibición de la síntesis de quitina fúngica, en contraste a esta función demostrada en artrópodos.

## BIBLIOGRAFÍA.

- Martino PE, Stanchi N, Arias D, Gatti E. Riesgo de la Salud Pública por exposición a animales de peletería. *Analecta Veterinaria* 2000; 20(1): 14-19.
- Losada A. Piel de conejo de criadero controlado. Defendiendo a la ecología. *Rev. Cabaña Lagunita* 2006; (17): 23-26.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (SAGPyA). Conejos: Estadísticas de Exportaciones Enero - Agosto de 2007.
- Reinoso HE, et al. Hongos o Eumycetes. En: Stanchi NO. *Microbiología Veterinaria*. 1° Ed. Ed. Sur. La Plata (Argentina), 2005; p. 627-634.
- Scott, Miller, Griffin. Muller & Kirk's. *Dermatología en pequeños animales*. 6° Ed. Ed. Inter-médica. Buenos Aires (Argentina), 2002; p.353-441.
- Cabañes FJ. Dermatophytes in domestic animals. *Rev. Iberoam Micol.* 2000; (17): S8-S12.
- Scialfa E, Ruiz G. Tiña de conejos. Una zoonosis a tener en cuenta. *Rev. Colegio de Veterinarios de la Pcia de Buenos Aires* 2004; 9(30): 53-55.
- Vázquez JR. Algunos aspectos sobre zoonosis y salud pública. *Revisión. Med Vet.* 2001; 18 (3): 316-326.
- Bartsch RC, Greene RT. New treatment of coccidiodomycosis. *Vet Forum* 1997; 4: 50-52.
- Respaldiza E. En: Botana López LM. y cols. *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*. 1° Ed. Ed. McGraw-Hill/Interamericana. Madrid (España), 2002; p.573-585.
- Franc M, et al. Pharmacokinetics of a new long-acting formulation of lufenuron and dose-activity relationship using experimental infestation by *Ctenocephalides felis*. *J.vet Pharmacol.Therap.* 1997; 20(1): 21-86.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (Ex- NCCLS) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium forming filamentous fungi, Approved standard M38-A. (2002). Wayne, PA.

13. Cermeño Vivas JR., Torres Rodríguez JM. Método espectrofotométrico en la preparación del inóculo de hongos dematiáceos. *Rev. Iberoam Micol.* 1998; (15): 155-157.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (Ex- NCCLS) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, Approved standard M27-A. (1997). Villanova, Pennsylvania.
15. Ben-Ziony Y., Arzi B. Use of Lufenuron for treating fungal infections of dogs and cats: 297 cases (1997-1999). *JAVMA.* 2000; 217(10):1510-1513.
16. Schenker R., Bucci V., Strehlau G. Use Of Lufenuron for the Treatment of Dermatophytosis in Italy. *WSAVA* 2002.
17. Guillot J., *et al.* Evaluation of the efficacy of oral lufenuron combined with topical enilconazole for the management of dermatophytosis in catteries. *Vet Rec* 2002; 150(23): 714-718.
18. Moriello KA., DeBoer DJ., Schenker R., *et al.* Efficacy of pre-treatment with lufenuron for the prevention of *Microsporum canis* infection in a feline direct topical challenge model. *Vet Dermatol* 2004; 15(6): 357-362.
19. DeBoer DJ., *et al.* Effects of lufenuron treatment in cats on the establishment and course of *Microsporum canis* infection following exposure to infected cats. *JAVMA* 2003; (222):1216-1220.
20. Johnson SM., *et al.* Evaluation of the susceptibility of *Coccidioides immitis* to lufenuron, a chitin synthase inhibitor. *Medical mycology* 1999; (37): 441 – 444.
21. Zur G., Elad D. In vitro and in vivo effects of Lufenuron on dermatophytes isolated from cases of canine and feline dermatophytoses. *J Vet Med B.* 2006; 53(3):122-125.
22. Cuenca-Estrella M., Rodríguez-Tudela JL. ¿Pueden basarse las indicaciones de los antifúngicos en los estudios de sensibilidad? *Rev. Iberoam Micol* 2002; (19): 133-138.
23. Pfaller MA., *et al.* In vitro susceptibility testing of filamentous fungi: Comparison of Etest and Reference Micodilution Methods for determining Itraconazole MICs. *J Clin Microbiology* 2000; 38(9): 3359-3361.
24. Meletiadis J., *et al.* Analysis of growth characteristics of filamentous fungi in different nutrient media. *J Clin Microbiology* 2001; 39(2): 478-484.
25. Byron L., *et al.* Dose titration of an injectable formulation of lufenuron in cats experimentally infested with fleas. *AJVR* 1999; 60(12):1513-1515.