

Artículo Original

Susceptibilidad antimicrobiana de aislamientos de *Neoscytalidium dimidiatum* provenientes de onicomicosis.

Mariana Villalobos-Vargas¹, Lic.; Stefany Lozada-Alvarado², MSc.; Ingrid Salas-Campos¹, MSc.; Allan Valverde-Vindas¹, Esp; Daniela Jaikel-Viquez¹, MSc.

¹Sección de Micología Médica, Departamento de Microbiología e Inmunología Clínica, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, Sede Rodrigo Facio Brenes, San Pedro, Costa Rica.

²Laboratorio Clínico y Banco de Sangre de la Universidad de Costa Rica, Universidad de Costa Rica, Sede Hospital del Trauma.

Autor correspondiente:

Dra. Daniela Jaikel Viquez

Universidad de Costa Rica, Sede Rodrigo Facio Brenes, San Pedro, Costa Rica.

Código postal: 2060, San José, Costa Rica

Teléfono (506) 8832-9008/ (506) 2511-8624

Correo: daniela.jaikelviquez@ucr.ac.cr

Resumen

Introducción y objetivos: *Neoscytalidium dimidiatum* es un hongo fuliginoso que se ha descrito como agente etiológico de distintos tipos de infecciones en el ser humano. Una de estas es la onicomicosis, que consiste en la infección de las uñas causada por hongos. En general, la frecuencia de aislamientos clínicos de *N. dimidiatum* es baja, sin embargo, se describe como una patología de respuesta pobre al tratamiento; al grado en que es considerada por algunos autores como una infección prácticamente incurable.

Materiales y métodos: Se realizó un estudio experimental para evaluar la susceptibilidad antimicrobiana y la concentración mínima inhibitoria (CMI) de 20 aislamientos clínicos de *N. dimidiatum* que fueron depositados en la Micoteca de la Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, entre los años 2009 y 2016. Para determinar la susceptibilidad *in vitro* se utilizó el método de microdilución en caldo, documento M38-A del *Clinical Laboratory and Standards Institute* (CLSI). Se analizaron cuatro antifúngicos y las concentraciones finales probadas fueron: 0.13 - 64 µg/mL para amorolfina y terbinafina, 0.06 - 32 µg/mL para ciclopirox y 0.03 - 16 µg/mL para itraconazol.

Resultados: La CMI₅₀ y CMI₉₀ para amorolfina fueron 0.50 y 0.75 µg/mL, para terbinafina 0.13 y 0.13 µg/mL, para ciclopirox 1.00 y 1.50 µg/mL y para itraconazol 0.75 y ≥ 16.00 µg/mL, respectivamente.

Conclusiones: El tratamiento *in vitro* más efectivo contra *N. dimidiatum* fue la terbinafina y el menos efectivo el itraconazol.

Palabras clave: Onicomicosis, *Neoscytalidium dimidiatum*, itraconazol, terbinafina, ciclopirox, amorolfina

Abstract

Introduction and aims: *N. dimidiatum* is a dematiaceous fungus that causes different types of infections in humans. One of these is the onychomycosis, which consists of nail infections caused by fungi. In general, the frequency of *N. dimidiatum* is low; but it is described as an infection that responds poorly to the treatments available; to the extent that some authors considered it to be a virtually incurable disease.

Materials and methods: The *in vitro* susceptibility of 20 clinical isolates of *N. dimidiatum* was determined using the microdilution method M38-A, as described by the Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI). The final concentrations were: 0.13 – 64 µg/mL for amorolfine and terbinafine, 0.06 – 32 µg/mL for ciclopirox and 0.03 – 16 µg/mL for itraconazole.

Results: The minimal inhibitory concentration (MIC)₅₀ and MIC₉₀ were 0.50 and 0.75 µg/mL for amorolfine, 0.13 and 0.13 µg/mL for terbinafine, 1.00 and 1.50 µg/mL for ciclopirox and 0.75 and ≥ 16.00 µg/mL for itraconazole, respectively.

Conclusions: The most effective treatment, *in vitro*, against *N. dimidiatum* was terbinafine and the least effective itraconazole.

Keywords: Onychomycosis, *Neoscytalidium dimidiatum*, itraconazole, terbinafine, ciclopirox, amorolfine.

Introducción

Neoscytalidium dimidiatum es un hongo endémico de áreas tropicales y subtropicales, como África, América del Sur, América Central y Asia.^{1,2} Por lo general, causa infecciones cutáneas y raramente se asocia a infecciones invasivas.³ Las infecciones de localización cutánea presentan manifestaciones clínicas muy similares a las producidas por los dermatofitos; este hongo invade, por lo general, las uñas de los pies, los espacios interdigitales y las plantas (aproximadamente el 90% de los casos) y, con menor frecuencia, las palmas y las uñas de las manos.⁴

La afección de las uñas de los pies es predominantemente de tipo subungueal distal y lateral. Además, puede cursar con onicólisis y en ocasiones puede haber distrofia total. Casi siempre estas lesiones están asociadas a lesiones interdigitales o plantares.^{1,4} En las plantas de los pies se observa descamación, hiperqueratosis o ambas y en los espacios interdigitales de los dedos de los pies descamación.¹ Las lesiones son muy similares a la tiña pedis, en particular la forma “en mocasín” producida por *Trichophyton rubrum*.^{1,5} Por otro lado, las infecciones en las manos se presentan en un 9% de los casos, principalmente las palmas, con lesión unilateral de tipo descamativo en la mayoría de los casos; la hiperqueratosis es menos frecuente. La infección conjunta de pies y manos se reporta en casi el 8% de los pacientes. Los cambios en las uñas de las manos son idénticos a los de las uñas de los pies, pero puede cursar con melanoniquia.¹ A diferencia de otros hongos ambientales, *N. dimidiatum* no requiere que la uña esté dañada para comenzar la infección, ya que posee queratinasas.⁶ En Costa Rica, *N. dimidiatum* ha sido reportado como causante de onicomycosis de difícil tratamiento. En un estudio realizado sobre agentes etiológicos de

onicomycosis de muestras procesadas en la Sección de Micología Médica de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica, entre los años 2007 y el 2010, se reportó la presencia de *N. dimidiatum* como agente causante de onicomycosis en un 2.8% ($n=4$) de las uñas de pies y en 4.8% ($n=1$) de las uñas de manos.⁷ Apesar de no ser de los principales agentes etiológicos, su difícil abordaje terapéutico requiere de su adecuada identificación.⁸ Por lo tanto, este estudio tiene como objetivo el analizar la actividad antifúngica de la amorolfina, ciclopirox, itraconazol y terbinafina contra aislamientos clínicos de *N. dimidiatum* obtenidos de onicomycosis.

Materiales y métodos

Aislamientos de *N. dimidiatum*. Se analizaron 20 aislamientos de *N. dimidiatum*, provenientes de pacientes con onicomycosis, depositados en la Micoteca de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica entre los años 2009 y 2016. Estos aislamientos se mantuvieron en agar papa dextrosa (APD) a temperatura ambiente (20 – 30 °C). Como controles para los estudios de susceptibilidad se utilizaron cepas de la *American Type Culture Collection* de *Candida krusei* ATCC 6258 y *Candida parapsilosis* ATCC 22019. Se utilizaron estas cepas ya que poseen una concentración mínima inhibitoria (CMI) conocida, y, por lo tanto, se garantiza que la concentración de antifúngico que hay en cada pocillo sea la correcta.⁹

Pruebas de susceptibilidad *in vitro* a los antifúngicos: La CMI se determinó según el “Método de Microdilución en Caldo del documento M38-A para hongos filamentosos” del *Clinical Laboratory and Standard Institute* (CLSI).¹⁰ Las concentraciones finales para los antifúngicos fueron: 0.13 – 64 µg/mL para amorolfina y terbinafina (Royal Pharm,

Hangzhou, China), 0.06 - 32 µg/mL para ciclopirox (Royal Pharm, Hangzhou, China) y 0.03 - 16 µg/mL para itraconazol (Royal Pharm, Hangzhou, China). Para la preparación del inóculo de los aislamientos *N. dimidiatum* se partió de un subcultivo en APD de siete días incubado a temperatura ambiente (20 - 30 °C). Se realizó una suspensión de artrosporas en solución salina estéril 0.85 %. La concentración de artrosporas se determinó utilizando una cámara Bürker (Poly-Optik GmbH, Blankenburg, Alemania) y se estandarizó a $(1-5) \times 10^6$ artrosporas/mL. Posteriormente, se realizó una dilución 1/50 en RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) (concentración 2×10^4 - 1×10^5 artrosporas/mL). Para la preparación del inóculo de las cepas control se hizo una suspensión de levaduras ajustada a una densidad óptica 0.5 McFarland, en solución salina estéril 0.85 %. Las cepas utilizadas para preparar el inóculo fueron subcultivadas 24 horas antes de su uso, en medio Sabouraud glucosado. Se obtuvo una suspensión de $(1-5) \times 10^6$ blastosporas/mL. Finalmente, se realizó una dilución 1:1000 con RPMI (concentración $(1-5) \times 10^3$ UFC/mL). Esta última dilución se inoculó en las placas de antifúngico preparadas previamente. La concentración final de levaduras obtenida en las placas fue de $(0.5-2.5) \times 10^3$ blastosporas/mL. La lectura se realizó mediante espectrofotometría a 450 nm utilizando el equipo Synergy HT (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, Estados Unidos). Para *N. dimidiatum* la CMI fue la concentración más baja que produjo una inhibición del 80 % del crecimiento, al compararla contra el control de crecimiento y para los controles levaduriformes, la CMI fue la concentración más baja que produjo la inhibición del 50 % de crecimiento.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos se utilizó el programa SPSS para Windows, versión 20 (SPSS Inc., Chicago, Ill, EEUU). Se calculó la media geométrica y el rango de las CMIs, así como la CMI₅₀ y la CMI₉₀ (percentiles 50 y 90) para cada antifúngico probado. También se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con el fin de comparar los valores de las CMIs entre los antifúngicos, junto con un análisis de Tukey.

Resultados

Se analizaron 20 aislamientos de *N. dimidiatum* provenientes de pacientes con onicomicosis. En el Cuadro 1 y en la Figura 1 se muestra la distribución de las CMIs de los aislamientos estudiados. Los antifúngicos que se probaron fueron amorolfina, ciclopirox, itraconazol y terbinafina. Se encontró que la terbinafina presentó la mayor actividad antifúngica (menor CMI) ya que el 85.0 % ($n = 17$) de los aislamientos analizados tuvieron CMIs de 0.13 µg/mL, seguido por la amorolfina con CMIs ≤ 0.50 µg/mL en el 80.0 % ($n = 16$) de los aislamientos. El itraconazol fue el tratamiento que presentó la menor actividad antifúngica ya que el 50.0% ($n=10$) de los hongos fueron catalogados como resistentes a este tratamiento (la resistencia al itraconazol está descrita como una CMI ≥ 1.00 µg/mL).

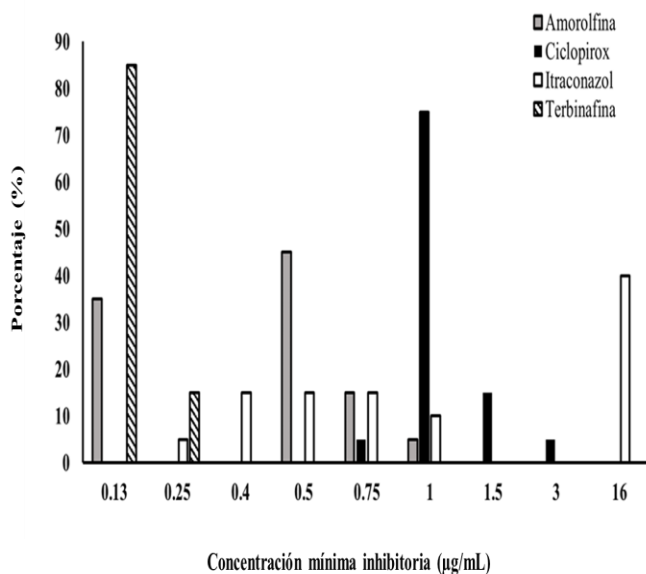
Tabla 1. Patrones de susceptibilidad *in vitro* de aislamientos clínicos de *Neoscytalidium dimidiatum* ($n=20$) provenientes de onicomicosis

Antifúngico	CMI* (µg/mL)			
	Promedio CMI	Rango	CMI ₅₀	CMI ₉₀
Amorolfina	0.43 (± 0.26)	0.13 - 1.00	0.50	0.75
Ciclopirox	1.16 (± 0.46)	0.75 - 3.00	1.00	1.50
Itraconazol	6.76 (± 7.55)	0.25 - ≥ 16.00	0.75	≥ 16.00
Terbinafina	0.15 (± 0.04)	0.13 - 0.25	0.13	0.13

*CMI: Concentración mínima inhibitoria

**NA: No aplica

Además, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las CMIs de los antifúngicos ($F=12.917$; $gl = 3$; $p < 0.0001$). El análisis Post hoc Tukey agrupó a los tratamientos en dos: en el primer grupo se encuentran la terbinafina, la amorolfina y el ciclopirox y en el segundo grupo el itraconazol, ya que inclusive el 40.0 % de los aislamientos presentaron CMIs mayores a 16 µg/mL.



% de aislamientos de *N. dimidiatum*

Figura 1. Distribución de susceptibilidad *in vitro* de los aislamientos clínicos de *Neoscytalidium dimidiatum* (n = 20)

Discusión

En el presente estudio, se analizaron los patrones de susceptibilidad *in vitro* a dos tratamientos tópicos (amorolfina y ciclopirox) y dos orales (itraconazol y terbinafina) de aislamientos de *N. dimidiatum* obtenidos de onicomicosis, porque se considera que es un hongo de difícil tratamiento.¹¹ Los resultados obtenidos mostraron que la amorolfina tiene una CMI baja (0.43µg/mL), lo cual es comparable con los resultados reportados en otros estudios.^{12,13} Sin embargo, al no existir puntos de corte para las morfolininas, no se puede definir si el hongo es sensible o resistente a este medicamento, pero se puede concluir que presenta valores bajos de CMIs *in vitro*, lo que concuerda con reportes de buena respuesta terapéutica *in vivo*. En un estudio llevado a cabo en Tailandia con 53 pacientes, empleando amorolfina al 5% en presentación de laca, los investigadores reportaron un 90% de cura micológica (examen directo y cultivos negativos) y un 50% de cura clínica.¹⁴ Con esta información se puede afirmar que la amorolfina representa un antimicótico prometedor para el tratamiento de las onicomicosis causadas por *N.*

dimidiatum, ya sea como monoterapia o en terapias combinadas con queratolíticos como la urea tópica. Por otro lado, el ciclopirox mostró CMIs entre 0.75 µg/mL y 3.00 µg/mL, lo cual es ligeramente mayor a las presentados en el estudio de Gupta y Kohli en el 2003, sin embargo, siguen siendo valores relativamente bajos, por lo que se puede afirmar que este antifúngico posee una moderada actividad antifúngica. Es importante destacar que el mecanismo de acción de este antifúngico depende de la quelación de metales pesados; por lo tanto, Gupta y Kohli consideran que la composición y el pH de los medios de cultivo utilizados durante las pruebas de susceptibilidad podrían afectar su actividad,¹⁵ dando variaciones en las CMI de las cepas estudiadas; lo cual es importante considerar al comparar los resultados obtenidos con los encontrados en la literatura.

Entre los antimicóticos de uso sistémico, el itraconazol presentó la menor actividad contra *N. dimidiatum*, con una CMI media de 6.76 µg/mL. Los resultados obtenidos coinciden con estudios realizados por otros autores, en los cuales las CMI tienen valores de hasta ≥ 64.00 µg/mL.^{11-13,16-18} Apesar de que este compuesto tiene buena capacidad de penetración de la uña, se fija a la queratina adecuadamente y alcanza altos valores en los distintos sitios de acción, no es uno de los tratamientos de elección para las onicomicosis debido a la alta resistencia *in vitro* de este y otros azoles como el fluconazol.^{19,20} Se ha observado que el itraconazol presenta porcentajes de cura bajos contra onicomicosis causadas por dermatofitos, además, el tratamiento es de mayor duración y la dosis requerida es mayor, sumado a esto es importante considerar que es un antifúngico con diversos efectos adversos y presenta muchas interacciones con otros medicamentos, por lo cual suele ser contraindicado para personas mayores, que coincidentemente, es la población de mayor prevalencia para esta patología.¹⁹⁻²³ Por otro lado, la terbinafina presentó la mayor actividad antifúngica contra *N. dimidiatum*, con una CMI media de 0.15 µg/mL, lo cual se considera un valor bajo. Estos valores son bastante similares a los encontrados en la literatura, donde las CMIs rondan entre los 0.06 µg/mL y los 4.00 µg/mL.^{11-13,15,24} Apesar de tener la mayor actividad *in vitro* frente a los hongos filamentosos no dermatofitos, en comparación a otros antifúngicos estudiados como fluconazol, itraconazol y griseofulvina,²⁵ se ha reportado

que esta no se correlaciona con su actividad *in vivo*, que suele ser poco efectiva tanto para este grupo como para el tratamiento de las infecciones superficiales por *Neoscytalidium* sp. Por ende, los resultados de las pruebas de susceptibilidad no necesariamente aportan un buen valor predictivo a nivel clínico.^{11,22,26} A pesar de esto, la terbinafina se considera un antimicótico seguro debido a que presenta menor interacción con otros medicamentos, una menor cantidad de efectos adversos,²² tiene una buena penetración de la uña, buena persistencia en zonas distales de esta y logra alcanzar las concentraciones inhibitorias efectivas.¹⁹

Finalmente, se concluye que el tratamiento con la mayor efectividad *in vitro* contra *N. dimidiatum* fue la terbinafina y el tratamiento con la menor efectividad *in vitro* fue el itraconazol. Además, es de gran importancia actualizar los estudios epidemiológicos con el fin de monitorear el comportamiento de las cepas presentes en la región, así como obtener datos estadísticos que puedan servir de respaldo para el personal médico a la hora de decidir el abordaje terapéutico de las infecciones causadas por este agente.

Créditos

Agradecemos al Sr. Juan Diego Castro por su inmensa colaboración en el mantenimiento de los aislamientos clínicos analizados y a la Sección de Servicios de Laboratorio de la Facultad de Microbiología por preparar los medios de cultivo.

Conflictos de interés

Ninguno de los autores declara conflictos de interés.

Fuentes de financiamiento

El estudio fue financiado por los proyectos N° 430-B6-127 y 430-B7-732 de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica.

Referencias

- Vázquez H, Mendoza C, Arenas R. Onicomicosis por *Scytalidium* sp. Revisión de infecciones por *Scytalidium* (*scytalidiosis*) a propósito de un caso de melanoniquia. *Dermatol Rev Mex* 2005; 49:168-173.
- Machouart M, Menir P, Helenon R, et al. *Scytalidium* and scytalidiosis: what's new in 2012? *J Mycol Med* 2013; 23(1): 40-46.
- Salcedo N, Cabrera S. *Scytalidium* spp. en piel y uñas. Reporte de casos en Santo Domingo, República Dominicana, 2010-2014. *VITAE* 2015; 61.
- Crespo-Erchiga V, Martínez-García S, Martínez-Pilar L. Dermatomicosis por *Scytalidium*. *Piel* 2005; 20(10): 498-503.
- de Magalhaes K, Machado C, Fonseca I, et al. Hongos filamentosos no dermatofitos: onicomicosis en cuatro pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana. *Rev Iberoam Micol* 2008; 25:45-49.
- Salas-Campos I, Gross-Martínez N. Agentes etiológicos de onicomicosis diagnosticadas en el laboratorio de micología médica de la Universidad de Costa Rica. *Acta Med Costarric* 2012; 54(2):114-118.
- Salas-Campos I, Gross-Martínez N, Carrillo-Dover P. Onicomicosis por hongos fuliginosos. *Acta Med Costarric* 2009; 57(4): 241-244.
- Carrillo-Muñoz AJ, Giusiano G, Cárdenas D et al., Terbinafine susceptibility patterns for onychomycosis-causative dermatophytes and *Scopulariopsis brevicaulis*. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 31: 540-543.
- Cantón E, Martín E, Espinel-Ingroff A. Capítulo 15, Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-Ay M44-A). En: Pemán J, Martín-Mazuelos E, Rubio-Calvo MC, editores. *Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica*. Bilbao, 2007; ISBN:978-84-611-8776-8. Disponible en: <http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo15.pdf>
- Lacroix C, de Chauvin M. *In vitro* activity of amphotericin B, itraconazole, voriconazole, posaconazole, caspofungin and terbinafine against *Scytalidium dimidiatum* and *Scytalidium hyalinum* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61:835-837.
- Clayton YM. Relevance of broad-spectrum and fungicidal activity of antifungals in the treatment of dermatomycoses. *Br J Dermatol* 1994; 130(43):7-8.
- Harman S, Ashbee H, Evans, E. Testing of antifungal combinations against yeasts and dermatophytes. *J Dermatolog Treat* 2004; 15:104-107.
- Bunyaratavej S, Leeyaphan C, Rujitharanawong C, et al., Efficacy of 5% amorolfine nail lacquer in *Neoscytalidium dimidiatum* onychomycosis. *J Dermatolog Treat* 2015; 27(4):1-22.
- Gupta A, Kohli Y. *In vitro* susceptibility testing of ciclopirox, terbinafine, ketoconazole and itraconazole against dermatophytes and nondermatophytes, and *in vitro* evaluation of combination antifungal activity. *Br J Dermatol* 2003; 149(2):296-305).
- Guarro J, Pujol I, Aguilar C, et al. *In vitro* antifungal susceptibility of nondermatophytic keratinophilic fungi. *Rev Iberoam Micol* 2000; 17:142-147.
- Rudramurthy S, Jatana M, Singh R, et al. *In vitro* antifungal activity of Indian liposomal amphotericin B against clinical isolates of emerging species of yeast and moulds, and its comparison with

- amphotericin B deoxycholate, voriconazole, itraconazole and fluconazole. *Mycoses* 2012; 56(1):39-46.
18. James J, Santhanam J, Lee MC, et al. *In Vitro* Antifungal Susceptibility of *Neoscytalidium dimidiatum* Clinical Isolates from Malaysia. *Mycopathologia* 2017; 182(3-4):305-313.
 19. Carrillo-Muñoz A, Tur-Tur C, Hernández-Molina J, et al. Antifúngicos disponibles para el tratamiento de las micosis ungueales. *Rev Iberoam Micol* 2010; 27(2):49-56
 20. Rosen T, Stein L. Antifungal drugs for onychomycosis: efficacy, safety, and mechanisms of action. *Semin Cutan Med Surg* 2016; 35(3S):S51-S55.
 21. Cursi Í, Neves M, Orofino-Costa R, et al. Onychomycosis due to *Scytalidium* spp. A clinical and epidemiologic study at a University Hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Ann Bras Dermatol*. 2011; 86(4):689-693.
 22. Cursi Í, Teixeira R, Brasil I, et al. Onychomycosis due to *Neoscytalidium* treated with oral terbinafine, ciclopirox nail lacquer and nail abrasion: A Pilot Study of 25 Patients. *Mycopathologia* 2013; 175: 75-82.
 23. Bunyaratavej S, Prasertworonun N, Leevaphan C, et al. Distinct characteristics of *Scytalidium dimidiatum* and non-dermatophyte onychomycosis as compared with dermatophyte onychomycosis. *J Dermatol* 2015; 42:1-5.
 24. Madrid H, Ruíz-Cendoya M, Cano J, et al. Genotyping and *in vitro* antifungal susceptibility of *Neoscytalidium dimidiatum* isolates from different origins. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 34:351-354.
 25. Farwa U, Abbasi A, Ali I, et al. Non-Dermatophyte moulds as pathogens of onychomycosis. *J Coll Physicians Surg Pak* 2011; 21(10):597-600.
 26. Bueno J, Martínez C, Zapata B, et al. *In vitro* activity of fluconazole, itraconazole, voriconazole and terbinafine against fungi causing onychomycosis. *Clin Exp Dermatol* 2009; 35:658-663