

Alfonso Javier Carrillo-Muñoz¹
Cristina Tur-Tur²
Dèlia Cárdenes¹
Florencia Rojas³
Gustavo Giusiano³

Perfil de sensibilidad antifúngica *in vitro* de *Scopulariopsis brevicaulis* aislados de onicomiosis

¹Departamento Microbiología. ACIAM, Barcelona, ESPAÑA. SDPI.

²Cap Manso, Barcelona ESPAÑA.

³Departamento Micología. Instituto de Medicina Regional. Universidad Nacional del Nordeste, Resistencia, ARGENTINA

RESUMEN

Se ha estudiado el perfil de actividad antifúngica *in vitro* de amorolfina (AMR), bifonazol (BFZ), clotrimazol (CLZ), econazol (ECZ), fluconazol (FNZ), itraconazol (ITZ), ketoconazol (KTZ), miconazol (MNZ), oxiconazol (OXZ), tioconazol (TCZ) y terbinafina (TRB) frente a 26 aislamientos clínicos de *Scopulariopsis brevicaulis* obtenidos de muestras clínicas de pacientes con onicomiosis, por medio de un método estandarizado de microdilución. A pesar de que este hongo filamentoso ha sido descrito como resistente frente a un amplio espectro de antifúngicos, los datos obtenidos muestran una mejor actividad fungistática *in vitro* de AMR, OXZ y TRB (0,08; 0,3 y 0,35 mg/L, respectivamente) en comparación con la de CLZ (0,47 mg/L), ECZ (1,48 mg/L), MNZ (1,56 mg/L), BFZ (2,8 mg/L), TCZ (3,33 mg/L), KTZ (3,73 mg/L). FNZ (178,47 mg/L) e ITZ (4,7 mg/L) mostraron una reducida actividad antifúngica *in vitro*. Las CMI's obtenidas muestran la reducida sensibilidad *in vitro* en general de *S. brevicaulis* a los antifúngicos utilizados y que son de posible uso para el tratamiento de las onicomiosis con la excepción de AMR, OXZ y TRB.

PALABRAS CLAVE: *Scopulariopsis brevicaulis*, sensibilidad antifúngica, onicomiosis

In vitro antifungal susceptibility profile of *Scopulariopsis brevicaulis* isolated from onychomycosis

ABSTRACT

We studied the *in vitro* antifungal activity profile of amorolfine (AMR), bifonazole (BFZ), clotrimazole (CLZ), econazole (ECZ), fluconazole (FNZ), itraconazole (ITZ), ketoconazole (KTZ),

miconazole (MNZ), oxiconazole (OXZ), tioconazole (TCZ) and terbinafine (TRB) against 26 clinical isolates of *Scopulariopsis brevicaulis* from patients with onychomycosis by means of a standardized microdilution method. Although this opportunistic filamentous fungi was reported as resistant to several broad-spectrum antifungals agents, obtained data shows a better fungistatic *in vitro* activity of AMR, OXZ and TRB (0.08, 0.3, and 0.35 mg/L, respectively) in comparison to that of CLZ (0.47 mg/L), ECZ (1.48 mg/L), MNZ (1.56 mg/L), BFZ (2.8 mg/L), TCZ (3.33 mg/L), KTZ (3.73 mg/L). FNZ (178.47 mg/L) and ITZ (4.7 mg/L) showed a reduced *in vitro* antifungal activity against *S. brevicaulis*. Obtained MICs show the low *in vitro* antifungal susceptibility of *S. brevicaulis* to topical drugs for onychomycosis management, with exceptions (AMR, OZX and TRB).

KEY WORDS: *Scopulariopsis brevicaulis*, antifungal susceptibility, onychomycosis.

INTRODUCCIÓN

Scopulariopsis brevicaulis es un hongo filamentoso capaz de utilizar la queratina y de sobrevivir de forma experimental en condiciones extremas durante largos períodos de tiempo^{1,2}. Debido a su capacidad queratinolítica, también se comporta como patógeno oportunista y puede ser aislado como agente etiológico de infecciones del estrato córneo, más frecuentemente en casos de onicomiosis^{3,9}. *S. brevicaulis* también está considerado como patógeno secundario en onicomiosis causadas por otros agentes y en uñas que han sufrido diversos tipos de traumatismos previos, en los que aparece con una frecuencia entre el 1 y el 11,5%¹⁰⁻¹⁴. Las infecciones por *S. brevicaulis* se caracterizan por presentar una elevada tasa de fracaso terapéutico¹⁵⁻¹⁷. Las causas pueden deberse a una combinación de factores relacionados con el tratamiento, como ser, la utilización de un antifúngico con poca o nula actividad frente al patógeno, la vía de administración inadecuada y la mala distribución o penetración del fármaco en la uña. Pero también es importante considerar el incumplimiento por parte del paciente frente a terapias de larga duración carentes de efectos manifiestamente visibles a corto plazo^{16,18}. Se estima que la tasa de cumplimiento de los tratamientos de onicomiosis es aproximadamente del 51%¹⁵.

Correspondencia:
Alfonso-Javier Carrillo-Muñoz.
Departamento Microbiología-Micología. ACIAM. Apdo Postal 10178. 08080 Barcelona. España.
E-mail: acarrillo@aciam.es

Teniendo en cuenta que los hongos filamentosos no dermatofitos tienen patrones de sensibilidad *in vitro* diferentes a los hongos dermatofitos y que algunos antifúngicos no presentan actividad frente muchos de los éstos hongos productores de onicomicosis, la identificación del agente etiológico y el conocimiento del perfil de sensibilidad antifúngica *in vitro* resulta importante para establecer una estrategia terapéutica que pueda resultar efectiva.

El objetivo de este trabajo ha sido determinar el perfil de sensibilidad *in vitro* de aislamientos de *S. brevicaulis* obtenidos de pacientes con onicomicosis, frente a 11 antifúngicos de uso clínico frecuente en este tipo de infección.

MATERIAL Y MÉTODOS

La actividad antifúngica *in vitro* de amorolfina (AMR), bifonazol (BFZ), clotrimazol (CLZ), econazol (ECZ), fluconazol (FNZ), itraconazol (ITZ), ketoconazol (KTZ), miconazol (MNZ), oxiconazol (OXZ), tioconazol (TCZ) y terbinafina (TRB) fue determinada frente a 26 aislamientos de *S. brevicaulis* obtenidos de pacientes con onicomicosis.

Para la valoración se utilizó el método de microdilución en caldo basado en los protocolos estandarizados por el Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) para hongos filamentosos, aplicando algunas modificaciones¹⁹. Se utilizó RPMI 1640 como medio base de cultivo con L-glutamina y tamponado a pH 7 con MOPS (Sigma Aldrich Química). Los inóculos fueron preparados en solución de Tween 20 al 1% (Sigma-Aldrich Química) a partir de cultivos puros en Agar Patata Glucosado e incubados hasta 5 días a 35°C. Tras dilución en el medio de cultivo, el tamaño final del inóculo alcanzado fue de 0,4-5 x 10⁴ UFC/mL. Las diluciones de los antifúngicos se prepararon a partir de drogas puras (Sigma Aldrich Química) y el rango de concentraciones utilizado fue de 0,25-256 mg/L para FNZ y de 0,015-16 mg/L para el resto de los antifúngicos ampliando los rangos de concentración especificados por el documento M38-A2¹⁹. Las placas se incubaron a 35°C con lecturas periódicas a los 2 días, ampliándose éstas en caso de no detectarse crecimiento valorable a los 3 y 5 días. Las CMI se establecieron por comparación con los pocillos control de crecimiento, correspondiendo a las que produjeron el 50% de la inhibición respecto a éstos para FNZ y KTZ; el 100% para ITZ. Para el resto de sustancias se aplicó el mismo criterio que figura en el documento M38-A2 para TRB que es el del 80% de la inhibición respecto de los pocillos control de crecimiento.

En el ensayo se incluyeron las cepas de referencia *Aspergillus fumigatus* NCPF 7100 y *Aspergillus fumigatus* NCPF 7099. Para cada antifúngico se calculó la media geométrica de las CMI, a fin de comparar la actividad de los mismos.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la tabla 1 se muestran las medias geométricas de las CMI obtenidas frente a los 26 aislamientos clínicos de *S. brevicaulis* que fueron tomadas a los 3 y 5 días de incubación

debido a que a las 48 h no se observó crecimiento valorable en los pocillos control de crecimiento. Se observó la reducción de la actividad antifúngica *in vitro* de todas las sustancias ensayadas al incrementar el tiempo de incubación.

TRB es un antifúngico de uso oral ampliamente utilizado para el tratamiento de la onicomicosis por dermatofitos y hongos filamentosos no dermatofitos, incluso en terapia combinada²⁰. En este estudio TRB presentó una elevada actividad antifúngica *in vitro*. Los derivados triazólicos ITZ y FNZ, por el contrario, mostraron las CMI más elevadas, en especial FNZ, que fue el antifúngico menos activo *in vitro* de todos los ensayados. Los hongos filamentosos son, en general, resistentes a FNZ con valores CMI ≥ 64 mg/L y > 8 mg/L para ITZ²¹. CMI superiores a esos puntos de corte están asociados a resistencias clínicas y fallos terapéuticos en el caso de infecciones diseminadas graves causadas por hongos filamentosos no dermatofitos aunque no existe tal asociación en el caso de la onicomicosis¹⁹. Los valores obtenidos en el estudio fueron en todos los casos superiores a esos valores para FNZ e ITZ. En este caso, únicamente un único aislamiento mostró una CMI que estaría dentro del rango considerado como sensible. La reducida actividad antifúngica *in vitro* obtenida con los derivados triazólicos coincide con la bibliografía, incluso al emplear otros métodos de estudio de sensibilidad *in vitro*, en los que se describe un 80-95% de aislamientos resistentes a FNZ, ITZ, VRZ, KTZ y MNZ²²⁻²⁶.

Los valores de CMI para ITZ y TRB obtenidos en este estudio son inferiores a los publicados por Cuenca-Estrella (ITZ 8 mg/L y TRB 14,4 mg/L)²⁷. Al comparar nuestros resultados con otros estudios es importante considerar el mayor número de cepas estudiadas y las diferencias metodológicas que pueden llegar a suponer una influencia significativa en las CMI de algunos antifúngicos^{27,28}. A diferencia de estos autores, nosotros utilizamos el medio de cultivo sin el suplemento del 2% de glucosa y adaptándolo al de referencia del CLSI M38-A2 usado para la valoración con hongos filamentosos¹⁹.

Tabla 1 Actividad antifúngica *in vitro* (medias geométricas de las CMI) frente a *S. brevicaulis* (n=26).

Antifúngico	CMI (mg/L)	
	3d	5d
Amorolfina	0,08	0,47
Bifonazol	2,8	4,15
Clotrimazol	0,47	1,35
Econazol	1,48	3,56
Fluconazol	178,47	211,92
Itraconazol	4,7	4,3
Ketoconazol	3,73	4,51
Miconazol	1,56	4,64
Oxiconazol	0,3	0,8
Tioconazol	3,33	4,8
Terbinafina	0,35	1

CMI= concentración mínima inhibitoria

AMR fue el antifúngico con mayor actividad *in vitro* en este estudio. Esta podría ser una buena elección para el tratamiento tópico de las infecciones producidas por *S. brevicaulis*. Los imidazoles también tienen un amplio uso como antifúngicos de administración tópica. CLZ y OXZ fueron los más activos fueron y BFZ, ECZ, MNZ, KTZ y TCZ los menos activos. Algunos estudios ponen de manifiesto la reducida actividad antifúngica *in vitro* de los antifúngicos imidazólicos como CLZ, BFZ, TCZ y también de TRB aunque se utilice una metodología diferente^{14,25,27-30}.

Las CMI obtenidas muestran la reducida sensibilidad *in vitro* en general de *S. brevicaulis* a los antifúngicos utilizados y que son de posible uso para el tratamiento de las onicomicosis. TRB como antifúngico de administración oral y AMR de aplicación tópica, mostraron la mejor actividad fungicida *in vitro*, superior a ITZ, KTZ, MNZ y TCZ, siendo FNZ el antifúngico menos activo para todos los aislados ensayados. No obstante los valores obtenidos para algunas sustancias pueden ser inferiores a las concentraciones que se alcanzan tras la administración oral o tópica de algunos de ellos de forma individual o en combinación con otros antifúngicos.

A la vista de los datos obtenidos en este estudio, *S. brevicaulis* presenta una sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos que depende de la sustancia evaluada. Esta, además, presenta diferencias con respecto al perfil de sensibilidad que caracteriza otras especies de hongos involucradas en este tipo de infección. AMR, TRB y OXZ parecen tener una mayor actividad antifúngica *in vitro* que el resto de sustancias ensayadas. No obstante, el documento M38-A2 especifica que las CMI que la mayoría de hongos dermatofitos, grupo que no incluye a *Scopulariopsis* spp., presentan para la TRB es inferior o igual a 0,25 mg/L a excepción de algunos *T. rubrum* sin que exista correlación de éstos valores con la curación clínica. Por ello, es imprescindible realizar una correcta identificación del agente etiológico en la onicomicosis, previa al inicio del tratamiento, para seleccionar el antifúngico más adecuado a la vista también de distintos parámetros farmacológicos como son los valores de capacidad de penetración, acumulación y tiempo de permanencia en la uña^{18,31-35}. En el caso de la TRB se alcanzan valores de biodisponibilidad del 70% al 80% alcanzando valores terapéuticos en estrato córneo de la piel así como uñas y pelo rápidamente en donde se mantiene durante periodo de tiempo prolongados³¹. Estos datos farmacocinéticos permiten abordar el tratamiento de esta infección mediante terapia combinada, muy útil en el caso de la TRB con otros antifúngicos para el tratamiento de infecciones no dermatofíticas por hongos resistentes o mixtas^{18,32,36}.

FINANCIACIÓN

Este trabajo no ha recibido ninguna financiación por parte de entidad pública ni privada.

BIBLIOGRAFÍA

- Filipello-Marchisio V, Fusconi A, Querio FL. *Scopulariopsis brevicaulis*: a keratinophilic or a keratinolytic fungus? *Mycoses* 2000;43:281-92.
- Carrillo-Muñoz AJ, Torres-Rodríguez JM, Madrenys-Brunet N, Dronda-Ayza A. Estudio comparativo sobre la supervivencia de 5 especies de dermatofitos y *Scopulariopsis brevicaulis* en arena de playa, bajo condiciones de laboratorio. *Rev Iberoam Micol* 1990;7:36-8.
- Roberts, DT, Evans EGV, Allen BR. Infecciones Fúngicas de las uñas. Doyma Eds. Madrid 1994.
- Petanovi M, Tomi Paradzik M, Kristof Z, Cvitkovi A, Topolovac Z. *Scopulariopsis brevicaulis* as the cause of dermatomycosis. *Acta Dermatovenerol Croat* 2010;18:8-13.
- Szentel JA, Kam JK, Yohendran J, Morrissey O, Hall AJ. Presumed *Scopulariopsis brevicaulis* chorioretinitis in a stem cell transplant recipient. *Clin Experiment Ophthalmol* 2010;38:314-5.
- Satyavani M, Viswanathan R, Harun NS, Mathew L. Pulmonary *Scopulariopsis* in a chronic tobacco smoker. *Singapore Med J* 2010;51:e137-9.
- Vignon M, Michonneau D, Baixench MT, Al-Nawakil C, Bouscary D, Buzyn A, et al. Disseminated *Scopulariopsis brevicaulis* infection in an allogeneic stem cell recipient. *Bone Marrow Transplant* 2011;46:1276-7.
- Salmon A, Debourgogne A, Vasbien M, Clément L, Collomb J, Plénat F, et al. Disseminated *Scopulariopsis brevicaulis* infection in an allogeneic stem cell recipient: case report and review of the literature. *Clin Microbiol Infect* 2010;16:508-12.
- Beltrame A, Sarmati L, Cudillo L, Cerretti R, Picardi A, Anemona L, et al. A fatal case of invasive fungal sinusitis by *Scopulariopsis acremonium* in a bone marrow transplant recipient. *Int J Infect Dis* 2009;13:e488-92.
- López-Jodra O, Torres-Rodríguez JM. Especies fúngicas poco comunes responsables de onicomicosis. *Rev Iberoam Micol* 1999;16:s11-s15.
- Gupta AK, Ryder JE, Baran R, Summerbell RC. Non-dermatophyte onychomycosis. *Dermatol Clin* 2003;21:257-68.
- Moreno G, Arenas R. Other fungi causing onychomycosis. *Clin Dermatol* 2010;28:160-3.
- Midgley G, Moore MK. Onychomycosis. *Rev Iberoam Micol* 1998;15:117.
- Torres-Rodríguez JM, Carrillo-Muñoz AJ, Madrenys-Brunet N. Minimal inhibitory concentrations of sertaconazole, miconazole and clotrimazole against 14 strains of *Scopulariopsis brevicaulis* isolated from onychomycosis. *J Mycol Med* 1993;4:225-228.
- Llambich A, Lecha M. Tratamiento actual de las onicomicosis. *Rev Iberoam Micol* 2002;19:127-12.
- del Palacio A, Garau M, González-Escalada A, Calvo MT. Trends in the treatment of dermatophytosis. In Kushawa RKS and Guarro J Eds. *Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi*. Bilbao 2000. pp 148-158.
- Tan JS, Joseph WS. Common fungal infections of the feet in patients with diabetes mellitus. *Drugs Aging* 2004;21:101-12.
- Carrillo-Muñoz AJ, Tur-Tur C, Hernández-Molina JM, Santos P, Cárdenas D, Giusiano G. Antifungal agents for onychomycoses. *Rev Iberoam Micol* 2010;27:49-56.

19. Clinical for Laboratory Standards Institute. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: approved standard-second edition. Document M38-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.
20. Gupta AK, Paquet M. Management of onychomycosis in Canada in 2014. *J Cutan Med Surg*. 2014;18:1-14.
21. Skora M, Macura AB, Bulanda M, *In vitro* antifungal susceptibility of *Scopulariopsis brevicaulis* isolates. *Med Mycol* 2014;52:723-7.
22. Carrillo-Muñoz AJ, Cárdenes DC, Carrillo-Orive B, Rodríguez V, del Valle O, Casals J, et al. Actividad antifúngica de voriconazol frente a hongos dermatofitos y *Scopulariopsis brevicaulis* determinada por el método de difusión en agar NeoSensitabs. *Rev Iberoam Micol* 2003;2:S7.
23. Carrillo-Muñoz AJ, Giusiano G, Guarro J, Quindós G, Guardia C, del Valle O, et al. *In vitro* activity of voriconazole against dermatophytes, *Scopulariopsis brevicaulis* and other opportunistic fungi as agents of onychomycosis. *Int J Antimicrob Agents* 2007;30:157-6.
24. Carrillo-Muñoz AJ, Guglietta A, Palacín C, Casals J, del Valle O, Guardia C, et al. *In vitro* antifungal activity of sertaconazole compared with nine other drugs against 250 clinical isolates of dermatophytes and *Scopulariopsis brevicaulis*. *Chemotherapy* 2004;50:308-1.
25. Carrillo-Muñoz AJ, Giusiano G, Cárdenes D, Hernández-Molina JM, Eraso E, Quindós G, et al. Terbinafine susceptibility patterns for onychomycosis-causative dermatophytes and *Scopulariopsis brevicaulis*. *Int J Antimicrob Agents* 2008;31:540-3.
26. Carrillo-Muñoz AJ, Quindós G, Del Valle O, Santos P, Giusiano G, Guardia C, et al. *In vitro* antifungal activity of sertaconazole nitrate against recent isolates of onychomycosis causative agents. *J Chemother* 2008;20:521-3.
27. Cuenca-Estrella M, Gómez-López A, Mellado E, Buitrago MJ, Monzón A, Rodríguez-Tudela JL. *Scopulariopsis brevicaulis*, a fungal pathogen resistant to broad-spectrum antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:2339-41.
28. Denning DW, Radford SA, Oakley KL, Hall L, Johnson EM, Warnock DW. Correlation between in-vitro susceptibility testing to itraconazole and in-vivo outcome of *Aspergillus fumigatus* infection. *J Antimicrob Chemother* 1997;40:401-14.
29. Carrillo-Muñoz AJ, Santos P, del Valle O, Quindós G. ¿Es activa la amfotericina B frente a hongos dermatofitos y *Scopulariopsis brevicaulis* Rev Esp Quimioter 2004; 17:244-9.
30. Carrillo-Muñoz AJ, Torres-Rodríguez JM, Madrenys-Brunet N, Gallach-Bau C. Microdilution susceptibility for *Candida*, dermatophytes and moulds using flutrimazole and clotrimazole. *J Mycol Med* 1994;4:34-6.
31. Gianni C. Update on antifungal therapy with terbinafine. *G Ital Dermatol Venereol*. 2010;145:415-24.
32. Krishnan-Natesan S. Terbinafine: a pharmacological and clinical review. *Expert Opin Pharmacother* 2009;10:2723-33.
33. Baran R, Gupta AK, Piérard GE. Pharmacotherapy of onychomycosis. *Expert Opin Pharmacother* 2005;6:609-24.
34. Kawada A, Aragane Y, Tezuka T. Clinical and pharmacokinetic studies of continuous itraconazole for the treatment of onychomycosis. *J Dermatol* 2004;31:104-8.
35. Gupta AK, Ryder JE. The use of oral antifungal agents to treat onychomycosis. *Dermatol Clin* 2003;21:469-79.
36. Carrillo-Muñoz AJ, Finkelievich J, Tur-Tur C, Eraso E, Jauregizar N, Quindós G et al. Combination antifungal therapy: a strategy for the management of invasive fungal infections. *Rev Esp Quimioter* 2014;27:141-58.