

## Actividad combinada de itraconazol y terbinafina sobre aislamientos clínicos de *Neoscytalidium dimidiatum*

### (Combined activity of Itraconazole and Terbinafine over clinical isolates of *Neoscytalidium dimidiatum*)

Armando Acosta-Zamora, Daniela Jaikel-Viquez

#### Resumen

**Objetivo:** analizar la susceptibilidad de *N. dimidiatum* ante el efecto combinado de itraconazol y terbinafina.

**Métodos:** se determinó la concentración mínima inhibitoria y la concentración inhibitoria fraccionada *in vitro*, mediante el método del tablero de ajedrez, a 15 aislamientos clínicos provenientes de onicomicosis de diferentes pacientes, todos positivos por *N. dimidiatum*. Se prepararon ensayos por duplicado con diluciones combinadas de los antifúngicos y se evaluó el efecto de ambos fármacos.

**Resultados:** la concentración mínima inhibitoria promedio de solo itraconazol aplicado a los aislamientos fue de 30,83 µg/mL y de 4,49 µg/mL combinado con terbinafina. La concentración mínima inhibitoria promedio de solo terbinafina fue de 0,33 µg/mL y de 0,07 µg/mL combinada con itraconazol. Hay diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones mínimas inhibitorias promedio de los antifúngicos analizados en solitario respecto de las concentraciones mínimas inhibitorias combinadas; para itraconazol ( $t = 2,958$ ;  $gl = 14$ ;  $p = 0,01$ ) y ( $t = 4,721$ ;  $gl = 14$ ;  $p < 0,001$ ) para terbinafina. El uso combinado evidenció 40 % de sinergismo.

**Conclusiones:** la combinación itraconazol-terbinafina presentó un efecto sinérgico total para inhibir el crecimiento de *N. dimidiatum*; esto ofrece una alternativa terapéutica en el tratamiento de las onicomicosis.

**Descriptores:** onicomicosis, itraconazol, terbinafina, terapia combinada.

#### Abstract

**Aim:** Study the combined susceptibility patterns of *Neoscytalidium dimidiatum* to the effect of Itraconazole and Terbinafine.

**Background:** The Minimum Inhibitory Concentration and Fractional Inhibitory Concentration were determined *in vitro* by the chessboard method for 15 clinical isolates of onychomycosis, from different patients, all positives for *N. dimidiatum*. Duplicated trials were prepared with combined dilutions of antifungals and the effect of both drugs was evaluated.

#### Afiliación de los autores:

Sección de Micología Médica, Departamento de Microbiología e Inmunología Clínica, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, Costa Rica.

**Abreviaturas:** ASG, agar Sabouraud glucosado; CIF, Concentración inhibitoria fraccionaria; CMI, Concentración mínima inhibitoria.

**Fuentes de apoyo:** este trabajo se subvenció a través del proyecto 430-B7-732 inscrito ante la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica.

**Conflicto de interés:** los autores declaran no tener conflictos de interés.

✉ sacostaz@ccss.sa.cr

**Results:** The average Minimum Inhibitory Concentration of Itraconazole when applied alone for the isolates was 30.83 µg/mL and 4.49 µg/mL when combined with Terbinafine. The average Minimum Inhibitory Concentration of Terbinafine alone was 0.33 µg/mL and 0.07 µg/mL when combined with Itraconazole. Statistically significant differences were found between the average Minimum Inhibitory Concentrations of the antifungals analyzed alone versus the Minimum Inhibitory Concentrations obtained by mixing both compounds. That is for Itraconazole (t = 2,958; gl = 14; p = 0,01) and (t = 4,721; gl = 14; p < 0,001) for Terbinafine. Combined use showed 40 % synergism.

**Conclusions:** The Itraconazole-Terbinafine combination had synergistic effect to inhibit the growth of *N. dimidiatum*, which offers a therapeutic alternative in the treatment of onychomycoses caused by this fungus.

**Keywords:** Onychomycosis, Itraconazole, Terbinafine, Combined Modality Therapy.

**Fecha recibido:** 22 de julio 2020

**Fecha aprobado:** 15 de octubre 2020

*Neoscytalidium dimidiatum* es un ascomicete filamentoso no dermatofito de importancia médica<sup>14</sup> que desde 1970<sup>5,6</sup> se ha descrito como agente causal de infecciones diseminadas, onicomiosis y otras manifestaciones clínicas en seres humanos.<sup>1,7-14</sup> Desde los años noventa se ha encontrado a *N. dimidiatum* en las Américas.<sup>8,15,16</sup> Se adquiere de la tierra o la materia vegetal por contacto directo o traumatismos,<sup>3,17</sup> aunque algunos autores como Moore (1986) y Campbell (1971) sugieren la posibilidad de transmisión persona a persona.<sup>12,18</sup> Es un patógeno primario gracias a su capacidad queratolítica (queratinasas, lipasas y amilasas hidrolizan la queratina de piel o uñas para facilitar su ingreso) y su pigmento melanina, como factor de virulencia, lo protege contra la acción del sistema inmune del hospedero.<sup>3,12,15,16,18,19</sup> Las onicomiosis son micosis de alta prevalencia mundial.<sup>20,21</sup> En Costa Rica estas infecciones se han estimado entre un (16 - 24) %, donde *N. dimidiatum* figura como causal de onicomiosis en un 2,8 % en uñas de los pies y en un 4,8 % en uñas de las manos.<sup>22,23</sup> *N. dimidiatum* generalmente ingresa por el lecho ungueal y los pliegues laterales distales. Una vez instalado genera onicodistrofia, con despigmentación blanquecina y onicolisis. Con el tiempo se presenta coiloniquia, hiperqueratosis subungueal, pigmentación amarillosa-café-negruzca y si la infección alcanza el borde proximal puede desarrollarse una paroniquia.<sup>8,24</sup> En inmunosupresos, ya sea por trasplante (de órgano sólido o médula ósea), lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, uso de corticoesteroides a largo plazo, infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), diabetes mellitus, cirrosis o ser mayor

de 60 años, los factores de riesgo pueden llevar a una infección sistémica con una mortalidad hasta del 50 %.<sup>10-12,25-27</sup> Respecto del tratamiento de las onicomiosis, en la práctica clínica *N. dimidiatum* ha mostrado resistencia a muchos antimicóticos azólicos, derivados de alilaminas, morfolinas y ciclopirox<sup>28</sup> y en la actualidad no se ha estandarizado un protocolo de tratamiento eficaz.<sup>22,23,29-31</sup> Estudios como el de Lacroix y de Chauvin (2008) han analizado la susceptibilidad *in vitro* de este hongo frente a distintos antimicóticos, de lo cual reportan concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) probadas en solitario de 0,25 µg/mL para voriconazol; 0,50 µg/mL para anfotericina B; 0,50 µg/mL para terbinafina; 2 µg/mL para posaconazol; 8 µg/mL para caspofungina y >16 µg/mL para itraconazol.<sup>24,29</sup> No obstante, a la fecha en la bibliografía no se reporta un estudio como este, en el cual se determine el efecto combinado de antifúngicos sobre el hongo en cuestión. Por lo tanto, el objetivo de la presente investigación ha sido determinar la interacción combinada *in vitro* de itraconazol y terbinafina sobre aislamientos clínicos de onicomiosis positivas por *N. dimidiatum*.

---

## Métodos

---

**Aislamientos:** se analizaron 15 aislamientos de *N. dimidiatum* obtenidos de distintos pacientes diagnosticados con onicomiosis y depositados en la Micoteca de la Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, entre los años 2009 al 2016. Los hongos se cultivaron en tubos con agar Sabouraud glucosado (ASG) a temperatura ambiente (25 - 35) °C. Previo a los análisis

de susceptibilidad se analizó su morfología colonial y microscópica (en lactofenol claro) para verificar que fenotípicamente los aislamientos correspondieran a *N. dimidiatum*.<sup>32</sup>

**Método del tablero de ajedrez:** la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración inhibitoria fraccionada (CIF) se determinaron mediante el método del tablero de ajedrez.<sup>33,34</sup> Todos los cultivos y ensayos se realizaron por duplicado. Para ello se preparó una solución madre de cada antifúngico (terbinafina 6400 µg/mL e itraconazol 1600 µg/mL) (Royal Pharm, Hangzhou, China) utilizando dimetil sulfoxido (DMSO) (Sigma Chemicals Co., St. Louis, Mo, EE. UU) como diluyente. A partir de la solución madre se hicieron diluciones dobles seriadas en medio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) y se rotularon de la siguiente manera: A1 a A8 para terbinafina y B1 a B8 para itraconazol. Para el esquema del llenado de placas de microtitulación figura 1.

un lector de placas Synergy HT (BioTek Instruments, Inc.; Winooski, VT, EE. UU).

**Determinación de la CIF:** se restó a cada pocillo la absorbancia del medio (esto es, la absorbancia del pocillo 11H). El valor de las CIF (o índice CIF) se calculó con base en la siguiente **ecuación:** Índice CIF =  $CIF_A / CMI_A + CIF_B / CMI_B$ , donde  $CIF_A$  es la CMI del fármaco A en combinación y  $CMI_A$  es la CMI del fármaco A en solitario;  $CIF_B$  es la CMI del fármaco B en combinación y  $CMI_B$  es la CMI del fármaco B en solitario. El índice CIF se basa en la hipótesis de que un fármaco no puede interactuar consigo mismo y, por tanto, el efecto de la combinación si  $CIF \leq 0,5$  se considera sinergismo; si  $CIF > 0,5$  pero  $< 4,0$  significa no efecto y por último cuando  $CIF \geq 4,0$  significa antagonismo.<sup>34-40</sup>

**Análisis estadístico:** los resultados se analizaron

$$\text{Índice CIF} = \frac{CIF_A}{CMI_A} + \frac{CIF_B}{CMI_B} \quad (\text{fórmula 1})$$

**Ecuación A-1** para el cálculo de la concentración inhibitoria fraccionada.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			B1+A1	B2+A1	B3+A1	B4+A1	B5+A1	B6+A1	B7+A1	A2		
B			B1+A2	B2+A2	B3+A2	B4+A2	B5+A2	B6+A2	B7+A2	A3		
C			B1+A3	B2+A3	B3+A3	B4+A3	B5+A3	B6+A3	B7+A3	A4		
D			B1+A4	B2+A4	B3+A4	B4+A4	B5+A4	B6+A4	B7+A4	A5		
E			B1+A5	B2+A5	B3+A5	B4+A5	B5+A5	B6+A5	B7+A5	A6		
F			B1+A6	B2+A6	B3+A6	B4+A6	B5+A6	B6+A6	B7+A6	A7		
G			B1+A7	B2+A7	B3+A7	B4+A7	B5+A7	B6+A7	B7+A7	A8		
H			B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	CC	BR	

**Figura 1.** Distribución de los antifúngicos para la determinación de la concentración inhibitoria fraccionaria mediante el método del Tablero de Ajedrez en la microplaca de 96 hoyos (A: terbinafina, B: itraconazol, CC: control de crecimiento y BR: blanco de reactivos)

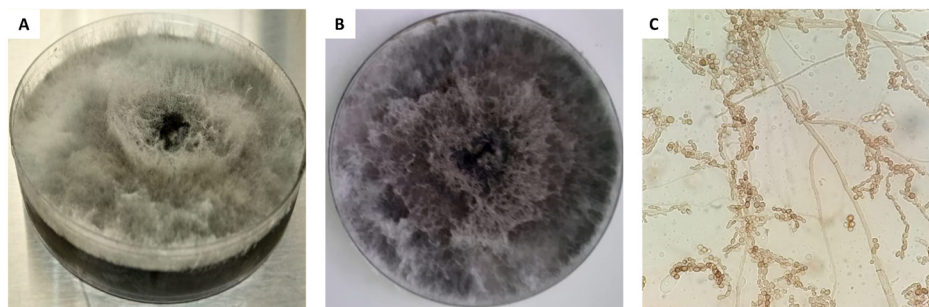
**Preparación de los inóculos:** los aislamientos en ASG se sembraron con técnica aséptica en agar papa dextrosa (APD) y se incubaron por 7 días a temperatura ambiente, para favorecer la esporulación. A partir del APD se preparó cada suspensión de artrosporas de *N. dimidiatum* en solución salina al 0,85%; utilizando una cámara de Bürker (Poly-Optik GmbH, Blankenburg, Alemania) y se ajustó a una concentración de  $(1 - 5) \times 10^6$  artrosporas/mL. Luego se diluyó 1:50 en caldo RPMI. Los pocillos de microtitulación se inocularon con 100 µL de la suspensión de esporas. Las placas se incubaron a temperatura ambiente sin agitación durante 72 horas hasta obtener crecimiento en el pocillo del control de crecimiento (CC).

**Determinación de la CMI:** la CMI se determinó como la concentración más baja que produjo inhibición del 80 % del crecimiento, al compararla contra el CC. La lectura espectrofotométrica ( $\lambda = 450 \text{ nm}$ ) se realizó con

con el programa SPSS para Windows versión 20 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EE. UU). Se estimó la media geométrica y los percentiles  $CMI_{50}$  y  $CMI_{90}$  donde terbinafina e itraconazol inhibían la multiplicación fúngica. Posteriormente, se realizó un análisis de *t student* para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones en solitario y las concentraciones en combinación.

## Resultados

**Aislamientos clínicos:** los 15 aislamientos exhibieron la morfología colonial típica correspondiente a hongos de la especie *N. dimidiatum*. Los montajes de todos los aislamientos en lactofenol claro demostraron la presencia de micelio fuliginoso septado y artrosporas (figura 2).



**Figura 2.** Cultivos (A y B) y morfología microscópica de *N. dimidiatum*(C)

**Determinación de los patrones de susceptibilidad *in vitro*:** con base en los ensayos realizados se estimaron las CMI (cuadro 1) y las CIF de los aislamientos clínicos de *N. dimidiatum*. Los antifúngicos utilizados fueron itraconazol y terbinafina, probados en forma individual y combinados. En el cuadro 2 se presentan los patrones de susceptibilidad de cada antifúngico evaluado. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las medias de la CMI al comparar al itraconazol usado en solitario

respecto del itraconazol combinado con terbinafina ( $t = 2,958$ ;  $gl = 14$ ;  $p = 0,01$ ). También entre las medias de la CMI de terbinafina usada en solitario y la terbinafina combinada con itraconazol ( $t = 4,721$ ;  $gl = 14$ ;  $p < 0,001$ ). Se obtuvieron CMIs menores al combinar ambas drogas. En el caso del itraconazol el 93,33 % ( $n = 14$ ) de los aislamientos presentó resistencia ( $CMI \geq 1 \mu g/mL$ ) cuando se evaluó su efecto al aplicarlo en solitario; pero al combinarlo con la alilamina este porcentaje disminuyó al 60,00 % ( $n = 9$ ) (cuadro 1).

Cuadro 1. Actividad in vitro de la terbinafina e itraconazol combinados o en solitario, aplicados sobre aislamientos clínicos de *N. dimidiatum* ( $n = 15$ )

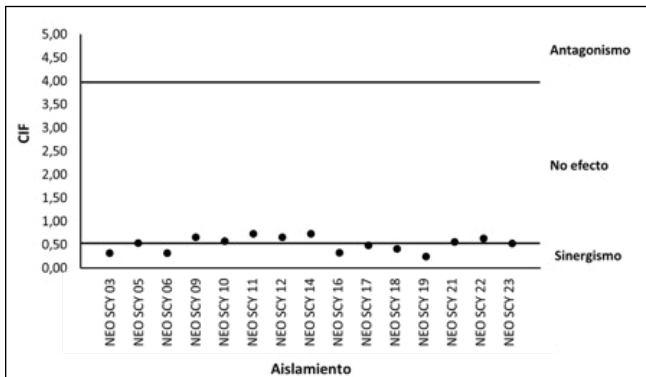
Hongo	*CMI Itraconazol ( $\mu g/mL$ )	CMI Itraconazol combinado ( $\mu g/mL$ )	**CMI Terbinafina ( $\mu g/mL$ )	CMI Terbinafina combinada ( $\mu g/mL$ )
NEO SCY 03	64,00	4,00	0,50	0,13
NEO SCY 05	64,00	2,00	0,50	0,25
NEO SCY 06	64,00	4,00	0,50	0,13
NEO SCY 09	0,40	0,20	0,13	0,02
NEO SCY 10	1,00	0,50	0,13	0,01
NEO SCY 11	1,00	0,50	0,13	0,03
NEO SCY 12	4,00	2,00	0,13	0,02
NEO SCY 14	32,00	16,00	0,13	0,03
NEO SCY 16	64,00	16,00	0,25	0,02
NEO SCY 17	2,00	0,50	0,52	0,07
NEO SCY 18	1,50	0,38	0,13	0,02
NEO SCY 19	128,00	16,00	0,25	0,03
NEO SCY 21	3,00	1,50	0,50	0,03
NEO SCY 22	1,60	0,80	1,00	0,13
NEO SCY 23	32,00	2,00	0,13	0,06

**Cuadro 2.** Distribución de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los aislamientos clínicos de *N. dimidiatum* (n = 15) utilizando itraconazol y terbinafina como antimicóticos

Antifúngico	CMI (µg/mL)			
	Promedio (DS)	Rango	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>
Itraconazol	30,83 ± 38,35	0,40 - 128,00	3,00	64,00
Itraconazol combinado*	4,49 ± 6,07	0,20 - 16,00	2,00	16,00
Terbinafina	0,33 ± 0,25	0,13 - 1,00	0,13	0,50
Terbinafina combinada**	0,07 ± 0,07	0,01 - 0,25	0,03	0,13

\*Combinación de itraconazol con terbinafina  
 \*\*Combinación de terbinafina con itraconazol

La CIF promedio de ambos antifúngicos combinados fue de 0,59 µg/mL requerida para inhibir la multiplicación fúngica. El resultado neto de mezclar los antimicóticos evidenció un 40 % (n = 6) de sinergismo en los casos estudiados (CIF ≤ 0,5). No se presentó ningún caso de antagonismo en los aislamientos estudiados (figura 3).



**Figura 3.** Efecto de la concentración inhibitoria fraccionada (CIF) de terbinafina e itraconazol combinados sobre aislamientos clínicos de *N. dimidiatum* (n=15)

## Discusión

Aunque la onicomicosis causada por *N. dimidiatum* pueden considerarse un reto terapéutico,<sup>23,29-31</sup> el presente trabajo probó el efecto conjunto de itraconazol y terbinafina sobre 15 aislamientos del hongo, en aras de encontrar una alternativa de tratamiento.

En la presente investigación, al aplicar la terbinafina en solitario se encontró una CMI entre (0,13 - 1,00) µg/mL, la cual concuerda con lo reportado en países como Inglaterra, Francia, España, Canadá, Colombia y Brasil

donde el rango de la CMI reportado es de (0,03 - 4,00) µg/mL.<sup>29,42-46</sup> La variabilidad en los valores de las CMI puede deberse a que los aislamientos provienen de cepas distintas y por eso exhiben diferentes susceptibilidades a esta alilamina. Los resultados *in vitro* podrían correlacionarse con el hecho de que *in vivo* la terbinafina se absorbe muy rápido independiente de la acidez, alcanza valores máximos a las dos horas post-ingesta, es altamente queratinolítica y lipofílica, fungicida y no sufre un metabolismo de primer paso.<sup>47-50</sup>

En el presente trabajo, la CMI<sub>50</sub> de terbinafina usada en solitario fue 0,13 µg/mL y para la CMI<sub>90</sub> fue de 0,50 µg/mL. En Holanda, Dorsthorst et al. (2002) encontraron una CMI<sub>50</sub> de 4 µg/mL de terbinafina en solitario para inhibir el crecimiento de *Aspergillus fumigatus*.<sup>33</sup> En España, el estudio de García et al. (2005) mediante la técnica de microdilución Sensititre YeastOne® estimó la CMI<sub>50</sub> para *A. fumigatus* en 0,50 µg/mL.<sup>51</sup> En Colombia, mediante el método E-test, Chávez et al. (2010) encontraron una CMI<sub>90</sub> de 0,38 µg/mL para inhibir *A. fumigatus*.<sup>52</sup> En Costa Rica, Ramírez-Hernández y colaboradores (2020) por medio de microdilución en placa (CLSI) encontraron una CMI<sub>50</sub> de 0,50 µg/mL y CMI<sub>90</sub> de 1,36 µg/mL para interrumpir el crecimiento de *Aspergillus versicolor*.<sup>53</sup> Esto permite inferir que *N. dimidiatum* requiere menores concentraciones de terbinafina en solitario que *Aspergillus sp.* para inhibir su multiplicación. Los resultados de otros trabajos incluyendo a este sugieren a la terbinafina como antimicótico contra *N. dimidiatum*, ya que se pudo determinar que esta alilamina usada en solitario ejerció un efecto inhibitorio mayor que el azol. Es importante resaltar que se comparan resultados entre el género *Aspergillus sp.* y *Neoscytalidium sp.* porque ambos son hongos filamentosos causantes de onicodistrofias y pueden generar infecciones sistémicas en pacientes inmunocomprometidos.

Por su parte, el itraconazol analizado en solitario presentó una CMI entre (0,40 - 128,00)  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , lo cual coincide con lo reportado en países como Inglaterra, Holanda, Francia, Bélgica y Colombia donde el rango de la CMI reportado es de (0,03 - >64,00)  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .<sup>24,29,38,42,44,54</sup> Las variantes en las CMI de estos estudios derivan de que los aislamientos evaluados pueden pertenecer a cepas diferentes y por tal motivo presentan resistencias distintas.

En la presente investigación la CMI<sub>50</sub> de itraconazol usado en solitario fue 3,00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y para la CMI<sub>90</sub> fue de 64,00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . En Colombia, Chávez *et al.* (2010) mediante el método E-test encontraron que ambas CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> >1,00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para inhibir *A. fumigatus*; CMI<sub>50</sub> de 1,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y CMI<sub>90</sub> de 3,00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  contra *Aspergillus niger*; y ambas CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> en 0,50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  contra *Aspergillus flavus*.<sup>52</sup> En Costa Rica, se encontró una CMI<sub>50</sub> de 1,00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y CMI<sub>90</sub> de 1,80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para interrumpir el crecimiento de *A. versicolor*, por la técnica de microdilución en caldo del CLSI.<sup>53</sup> En España, el estudio de García *et al.* (2005) mediante microdilución Sensititre YeastOne® estimó la CMI<sub>50</sub> en 0,13  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para *A. fumigatus*; CMI<sub>50</sub> en 0,50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  contra *A. niger*; y CMI<sub>50</sub> en 0,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  contra *A. flavus*.<sup>51</sup> En Holanda, Dorsthorst *et al.* (2002) determinaron la CMI<sub>50</sub> en 0,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de itraconazol en solitario para detener la multiplicación de *A. fumigatus*.<sup>33</sup> Los resultados de otros trabajos incluyendo a este demuestran el requerimiento de mayores concentraciones de itraconazol usado en solitario para inhibir el crecimiento de *N. dimidiatum* y menores concentraciones contra *Aspergillus* sp. Esto sugiere que itraconazol, cuando se usa solo, ejerce un menor efecto inhibitorio sobre *N. dimidiatum*. Estos resultados de itraconazol en solitario *in vitro* podrían correlacionar *in vivo* con que este medicamento es dosis dependiente, su absorción duodenal amerita un pH ácido (lo cual no es fácil de lograr porque el vaciado gástrico ácido induce la alcalinización del duodeno), además se requiere como mínimo una concentración en sangre  $\geq 5 \mu\text{g}/\text{mL}$  para observar algún efecto, lo que también es difícil porque el CYP3A4 realiza un metabolismo de primer paso a nivel de intestino delgado, lo que reduce su biodisponibilidad antes de llegar al lecho vascular ungueal para ejercer su efecto fungistático; también puede haber resistencia intrínseca de algunos aislamientos del hongo hacia los azoles.<sup>41,47,49,55</sup> Además, el uso generalizado de fármacos antifúngicos azólicos se ha asociado con la aparición de especies resistentes o con menos sensibilidad en muchas regiones del mundo y en poblaciones concretas de pacientes.<sup>56</sup>

Con respecto al efecto de la combinación de ambos tratamientos, en el año 2002, Dorsthorst y colaboradores reportaron un efecto sinérgico al combinar itraconazol y terbinafina sobre aislamientos de *A. fumigatus*.<sup>33</sup> En el estudio de un caso fatal de aspergilosis pulmonar, liderado por Meletiadis y colaboradores (2010) (apoyados

por el Programa de Investigación Intramural del Instituto Nacional del Cáncer, en Bethesda, Maryland, EE. UU.) y el estudio de Hall *et al.* (1983) en los cuales se analizó terbinafina e itraconazol, se confirmó que aun las interacciones débiles con CIF entre 0,5 y 0,99 demostraron ser estadísticamente significativas.<sup>40,57</sup> Por otro lado, Ramírez-Hernández y colaboradores (2020) encontraron un efecto potenciador de la terbinafina sobre el itraconazol con aislamientos de *A. versicolor*.<sup>53</sup> El presente estudio encontró, no solo este efecto potenciador, sino también un 40 % de sinergismo.

El efecto sinérgico deriva de que la terbinafina inhibe a la enzima escualeno epoxidasa (en el primer paso de la biosíntesis del ergosterol) y el itraconazol, a la 14-alfa-esterol-desmetilasa (a la mitad del ciclo biosintético).<sup>47,55</sup> Lo anterior supone una ventaja farmacocinética y farmacodinámica porque a nivel hepático ambos medicamentos se metabolizan por vías distintas, no hay interacción negativa ni saturación enzimática de los citocromos detoxificantes, lo cual reduce la acumulación hepática de estos medicamentos. Esto redundaría en un beneficio farmacológico para el paciente porque su sinergia cuando se combinan y su rápido aclaramiento contribuyen a una menor probabilidad de daño hepatocelular.<sup>48,50,55,58-60</sup> La acción farmacológica neta de combinar itraconazol y terbinafina interrumpe dos pasos claves en la biosíntesis del ergosterol del hongo; esto debilita su membrana, facilita el ingreso de dichos fármacos dentro del hongo con lo cual queda expuesto a la acción de los leucocitos del sistema inmunológico.<sup>55,59</sup>

Cabe mencionar que cuando un paciente recibe terapias como ciclosporina, sirolimus, tacrolimus, efavirenz, lovastatina, sinvastatina, atorvastatina y fluvastatina la inhibición competitiva de itraconazol sobre el CYP3A4 induce un aumento plasmático de estos fármacos mencionados, lo que deriva en intoxicaciones, el riesgo de rabdomiólisis y miopatías.<sup>50,55,59</sup> Por su parte ritonavir, nelfinavir, cobicistat, darunavir o miconazol ejercen inhibición competitiva sobre el CYP2D6, de modo que la terbinafina se acumula en hígado ocasionando hepatopatías como necrosis del tejido. Estas interacciones negativas se potencian con polimorfismos que produzcan metabolizadores lentos homocigotos y las intoxicaciones pueden derivar en la muerte del paciente.<sup>50,58,60</sup> Por lo tanto, el médico debe valorar cada caso antes de administrar una terapia que incluya itraconazol o terbinafina en pacientes inmunosupresos o que reciben antirretrovirales.

En conclusión, la monoterapia con itraconazol no resultó efectiva *in vitro* para eliminar a *N. dimidiatum*. La monoterapia con terbinafina fue efectiva *in vitro* para inhibir al hongo. Por su parte, la combinación de itraconazol y terbinafina *in vitro* presentó una acción sinérgica total o parcial en la inhibición del crecimiento del hongo estudiado.

**Agradecimientos y colaboradores:** Se agradece a la señorita Alejandra Gómez, a la Dra. Pilar Salas Chaves y a la Dra. Norma T. Gross Martínez, de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica, por su apoyo y recomendaciones durante la realización de esta investigación.

## Referencias

- Larone DH. Medically important fungus. 4ta ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 2002.
- Padin C, Fernández G, Yegres F, Richard N. *Scytalidium dimidiatum*: hongo oportunista para el hombre y árboles de Mangifera indica en Venezuela. Rev Iberoam Micol. 2005; 22: 172-173.
- Xavier AP, Oliveira JC, Ribeiro VL, Souza MA. Epidemiological aspects of patients with unguinal and cutaneous lesions caused by *Scytalidium* spp. Ann Bras Dermatol. 2010; 85: 805-810.
- Cob M, Valverde J. DermatOMICOSIS por *Neoscytalidium dimidiatum*. Reporte de un caso. Rev Coleg Microbiol y Quím Clín Costa Rica. 2018; 24: 192-198.
- Gentles JC, Evans EG. Infection of the feet and nails with *Hendersonula toruloidea*. Sabouraudia. 1970; 8: 72-75.
- Campbell CK, Mulder JL. Skin and nail infection by *Scytalidium hyalinum* sp. nov. Sabouraudia. 1977; 15: 161-166.
- Benne CA, Neeleman C, Bruin M, de Hoog GS, Fleer A. Disseminating infection with *Scytalidium dimidiatum* in a granulocytopenic child. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1993; 12: 118-121.
- Álvarez P, Enríquez AM, Toro C, Martínez I, Buhigas I, de Miguel S, et al. DermatOMICOSIS de importancia por *Scytalidium dimidiatum*: a propósito de tres casos. Rev Iberoam Micol. 2000, 17: 102-106.
- Gumbo T, Mkanganwi N, Robertson VJ, Masvaire P. Case report. *Nattrassia mangiferae* endophthalmitis. Mycoses. 2002; 45: 118-119.
- Dunn JJ, Wolfe MJ, Trachtenberg J, Kriesel JD, Orlandi RR, Carroll KC. Invasive fungal sinusitis caused by *Scytalidium dimidiatum* in a lung transplant recipient. J Clin Microbiol. 2003; 41: 5817-5819.
- Elinav H, Izhar U, Benenson S, Admon D, Hidalgo C, Polacheck I, et al. Invasive *Scytalidium dimidiatum* infection in an immunocompetent adult. J Clin Microbiol. 2009; 47: 1259-1263.
- Moutran R, Maatouk I, Wehbé J, Abadjian G, Obeid G. Infection sous-cutanée disséminée par *Scytalidium (Neoscytalidium) dimidiatum*. Ann Dermatol Vénéreol. 2012; 139: 204-208.
- Bakhshizadeh M, Hashemian HR, Najafzadeh MJ, Dolatabadi S, Zarrinfar H. First report of rhinosinusitis caused by *Neoscytalidium dimidiatum* in Iran. J Med Microbiol. 2014; 63: 1017-1019.
- Dionne B, Neff L, Lee SA, Sutton DA, Wiederhold NP, Lindner J, et al. Pulmonary Fungal Infection Caused by *Neoscytalidium dimidiatum*. Case report. J Clin Microbiol. 2015; 53: 2381-2384.
- Vázquez H, Mendoza C, Arenas R. Onicomicosis por *Scytalidium* sp. Revisión de infecciones por *Scytalidium* (scitalidiosis) a propósito de un caso de melanoniquia. Dermatol Rev Mex. 2005; 49: 168-173.
- Crous PW, Slippers B, Wingfield MJ, Rheeder J, Marasas WF, Philips AJ, et al. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. Stud Mycol. 2006; 55: 235-253.
- Arenas R. Micología médica ilustrada. 4ta edición. México, D.F.: Mc Graw Hill. 2011, caps. 2-5.
- Machouart M, Menir P, Helenon R, Quist D y Desbois N. *Scytalidium et scytalidiosis*: Quoi de neuf en 2012? J Mycol Méd. 2013; 23: 40-46.
- Morris R, Youngchim S, Hextall JM, Gomez BL, Morris SD, Hay RJ, et al. *Scytalidium dimidiatum* causing recalcitrant subcutaneous lesions produces melanin. J Clin Microbiol. 2004; 42: 3789-3794.
- Villanueva J, Zapata K, Cárdenas M. *Neoscytalidium dimidiatum*: moho no dermatofito emergente en onicomicosis y dermatomicosis, presentación de dos casos. Asoc Col Dermatol. 2011; 19: 337-340.
- Relloso S, Arechavala A, Guelfand L, Maldonado I, Walker L, Agorio I, et al. Onicomicosis: estudio multicéntrico clínico, epidemiológico y micológico. Rev Iberoam Micol. 2012; 29: 157-163.
- Salas I, Gross N. Agentes etiológicos de onicomicosis diagnosticadas en el laboratorio de micología médica de la Universidad de Costa Rica. Acta Méd Costarric. 2012; 54: 114-118.
- Ulloa M, Zumbado C. Onicomicosis causadas por hongos miceliales no dermatofitos. Rev Méd Costa Rica y Centroam. 2014; 71: 733-736.
- Spriet I, Lambrecht C, Lagrou K, Verhamme B. Successful eradication of *Scytalidium dimidiatum*-induced unguinal and cutaneous infection with voriconazole. Eur J Dermatol. 2012; 22: 197-199.
- Dhindsa MK, Naisdu J, Singh SM. A case of subcutaneous infection in a patient with discoid lupus erythematosus caused by *Scytalidium synanamorph of Nattrassia mangiferae*, and its treatment. Med Mycol. 1998; 36: 425-427.
- Ruiz M, Madrid H, Pastor FJ, Mayayo E, Mariné E, Guarro J. Development of murine models of disseminated infection by *Neoscytalidium dimidiatum*. Medical Mycol. 2010; 48: 681-686.
- Garinet S, Tourret J, Barete S, Arzouk N, Meyer I, Frances C, et al. Infecciones cutáneas invasivas de *Neoscytalidium* en receptores de trasplante renal: una serie de cinco casos. BMC Infect Dis. 2015; 15: 535-540.
- Ballesté R, Mousques N, Gezuele E. Onocomicosis. Revisión del tema. Rev Méd Uruguay. 2003; 19: 93-106.
- Lacroix C, de Chauvin FM. 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.
- Carrillo AJ, Tur C, Hernández JM, Santos P, Cárdenas D, Giusiano G. Antifúngicos disponibles para el tratamiento de las micosis ungueales. Rev Iberoam Micol. 2010; 27: 49-56.
- Soto, R. ¿Por qué fallan los tratamientos para onicomicosis? Rev Chil Dermatol. 2011; 27: 140-145.
- Gross N, Salas I. Métodos diagnósticos en micología médica. 1ª ed. San José, Costa Rica: Editorial de la Universidad de Costa Rica, 2012.
- Dorsthorst D, Verweij P, Meis J, Punt N, Mouton J. Comparison of Fractional Inhibitory Concentration Index with response surface modeling for characterization of in vitro interaction of antifungals against itraconazole susceptible and resistant *Aspergillus fumigatus* isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46: 702-707.

34. Ganan M, Lorentzen SB, Aam BB, Eijsink VGH, Gaustad P, Sorlie M. Antibiotic saving effect of combination therapy through synergistic interactions between well-characterized chitooligosaccharides and commercial antifungals against medically relevant yeasts. *PlosONE*. 2019; 14: e0227098.
35. Eliopoulos GM. Synergism and antagonism. *Pharmacology*. 1989; 3: 399-406.
36. Rodríguez JL, Rodero L, Cuenca E, Córdoba S. V Curso Hispano-Argentino de Micología Médica: Determinación de la Resistencia a los antifúngicos en el laboratorio, 2002: 101-111.
37. Espino M, Couto MJ, Fiol N, Rojas N. Resistencia a antimicrobianos y evaluación del tratamiento combinado en la septicemia neonatal. *Rev Panam Salud Púb*. 2003; 13: 214-221.
38. Harman S, Ashbee H, Evans E. Testing of antifungal combinations against yeast and dermatophytes. *J Dermatol Treat*. 2004; 15: 104-107.
39. Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clin Infect Dis*. 2009; 49: 1749-1755.
40. Meletiadis J, Pournaras S, Roilides E, Walsh T. Defining fractional inhibitory concentration index cutoffs for additive interactions based on self-drug additive combinations, Monte Carlo simulation analysis, and *in vitro-in vivo* correlation data for antifungal drug combinations against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54: 602-609.
41. Cantón E, Martín E, Espinel-Ingroff A. Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos, *En: Pemán J, Martín E y Rubio MC (Eds) Guía práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica*. Bilbao: España, 2007: Cap. 15.
42. Clayton YM. Relevance of broad-spectrum and fungicidal activity of antifungals in the treatment of dermatomycoses. *Br J Dermatol*. 1994; 130: 7-8.
43. 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: 296-305.
44. Bueno JG, Martínez C, Zapata B, Sanclemente G, Gallego M, Mesa AC. In vitro activity of fluconazole, itraconazole, voriconazole and terbinafine against fungi causing onychomycosis. *Clin Experim Dermatol*. 2009; 35: 658-663.
45. Madrid H, Ruiz M, Cano J, Stchigel A, Orofino R, Guarro J. Genotyping and in vitro antifungal susceptibility of *Neoscytalidium dimidiatum* isolates from different origins. *Int J Antimicrob Agents*. 2009; 34: 351-354.
46. Tonani L, Morosini NS, Dantas de Menezes H, Nadaletto ME, Wainwright M, Leite GU, et al. In vitro susceptibilities of *Neoscytalidium* spp. sequence types to antifungal agents and antimicrobial photodynamic treatment with phenothiazinum photosensitizers. *Fungal Biol*. doi.org/10.1016/j.funbio.2017.08.009, 2017.
47. Martínez S, Martínez L, Crespo V. Tratamiento de las onicomicosis. *FMC*. 2007; 14: 217-221.
48. Meinerz AR, Cleff MB, Nascente P, Nobre M, Schuch LFD, Antunes T, et al. Efeitos de doses elevadas da terbinafina e itraconazol em ratos Wistar. *Rev Brasil Cs Farm*. 2007; 43: 105-109.
49. Mendoza N, Palacios C, Cardona N, Gómez L. Onicomicosis: afección común de difícil tratamiento. *Rev Asoc Col Dermatol*. 2012; 20: 133-142.
50. Delgado O, Ibáñez C. Interacciones farmacológicas de los antibióticos y antifúngicos *En: Aldaz A et al, ed. Introducción a las interacciones farmacológicas*. 1ª ed., Madrid: SEFH, 2013: 226-263.
51. García P, García L, Gutiérrez J, Ruiz J, Saldarreaga, Marín P. Actividad *in vitro* de anfotericina B, itraconazol y voriconazol frente a 20 especies de *Aspergillus* sp. empleando el método de microdilución Sensititre. *Enferm Infecc Microbiol*. 2005; 23: 15-26.
52. Chávez J, Rivas P, Cortés J, Cuervo J, Sánchez R, Parra C. Sensibilidad *in vitro* de hongos miceliales de aislamientos clínicos de pacientes con cáncer en el Instituto Nacional de Cancerología ESE. *Infectio*. 2010; 14: 116-126.
53. Ramírez-Hernández V, Montero-Arias C, Vargas-Ovalle MI, Villalobos-Vargas M, Gómez-Arrieta A, Lozada-Alvarado S, et al. In vitro activity of amorolfine, ciclopirox, itraconazole and terbinafine against *Aspergillus versicolor* as agent of onychomycosis. *Acta Sci Microbiol*. 2020; 3: 01-06.
54. Guarro J, Pujol I, Aguilar C, Ortoneda M. *In vitro* antifungal susceptibility of non-dermatophytic Keratinophilic fungi. *Rev Iberoam Micol*. 2000; 17: 142-147.
55. Lemke T, Williams DM, Roche V, Zito W. Foye's Principles of Medicinal Chemistry. Lippincot Williams and Wilkins. 7<sup>th</sup> Edition, 2013.
56. Arendrup MC, Patterson TF. Multidrug-Resistant *Candida* sp.: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment. *J Infect Dis*. 2017; 216: s445-s451.
57. Hall MJ, Middleton RF, Westmacott D. The fractional inhibitory concentration (FIC) index as a measure of synergy. *J Antimicrob Chemother*. 1983; 11: 427-433.
58. Tejada F. Hepatotoxicidad por fármacos. *Rev Clín Méd Fam*. 2010; 3: 177-191.
59. Claramunt RM, Cabildo M, Escolástico C, Jiménez JA y Santamaría D. *Fármacos y Medicamentos*. Madrid, España: EUNED, 2015: 113-174.
60. Morales L, Vélez N y Muñoz OG. Hepatotoxicidad: patrón colestásico inducido por fármacos. *Rev Col Gastroent*. 2016; 31: 36-47.