

<https://doi.org/10.24245/drm/bmu.v67i2.8742>

Tipificación molecular y susceptibilidad *in vitro* de aislamientos clínicos costarricenses del complejo *Trichophyton mentagrophytes*

Molecular characterization and in vitro susceptibility of Costa Rican clinical isolates of Trichophyton mentagrophytes complex.

Diego Ortiz-Solano,¹ Daniela Jaikel-Viquez,^{1,2} Stefany Lozada,³ Norma T Gross^{1,2}

Resumen

OBJETIVO: Caracterizar aislamientos clínicos costarricenses del complejo *T. mentagrophytes* para determinar cuáles son las especies predominantes y su patrón de susceptibilidad *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS: Estudio de tipo experimental para tipificar y determinar la susceptibilidad antifúngica de aislamientos del complejo *T. mentagrophytes* obtenidos de muestras de uñas y piel, efectuado de 2019 a 2020. La tipificación molecular se realizó mediante la secuenciación de la región ITS. Para determinar los patrones de susceptibilidad de los aislamientos se utilizó el método de microdilución en caldo M38-A, del Instituto de Estándares para el Laboratorio Clínico.

RESULTADOS: Se analizaron 15 aislamientos que fueron identificados como *Trichophyton interdigitale*. La CMI₅₀ y CMI₉₀ para amorolfina fue de 0.13 y 0.50 µg/mL, para bifonazol de 0.25 y 0.50 µg/mL, para ciclopirox de 0.50 y 5.60 µg/mL, para fluconazol de 32 y 89.60 µg/mL, para itraconazol de 0.25 y 6.70 µg/mL y para terbinafina fue de 0.13 y 0.35 µg/mL, respectivamente.

CONCLUSIONES: Todos los aislamientos estudiados pertenecen a la especie *T. interdigitale*, lo que demuestra una transmisión persona-persona. Además, todos los aislamientos fueron susceptibles a amorolfina, bifonazol, ciclopirox y terbinafina. Sin embargo, la mayor parte mostró resistencia a fluconazol e itraconazol.

PALABRAS CLAVE: *Trichophyton interdigitale*; amorolfina; bifonazol; ciclopirox; fluconazol; itraconazol; onicomicosis.

Abstract

OBJECTIVE: To characterize Costa Rican clinical isolates of the *T. mentagrophytes* complex to determine the predominant species and their susceptibility pattern.

MATERIALS AND METHODS: An experimental study was conducted to typify and determine the antifungal susceptibility of isolates from the *T. mentagrophytes* complex, obtained from skin and nail samples, done from 2019 to 2020. Molecular typification was performed by sequencing the ITS region. Broth microdilution M38-A method, as described by the Clinical Laboratory and Standards Institute, was employed to determine the antifungal susceptibility patterns of the isolates.

RESULTS: Fifteen isolates were analyzed and all were identified as *Trichophyton interdigitale*. The MIC₅₀ and MIC₉₀ were 0.13 and 0.50 µg/mL for amorolfine, 0.25 and 0.50 µg/mL for bifonazole, 0.50 and 5.60 µg/mL for ciclopirox, 0.25 and 6.70 µg/mL

¹ Sección de Micología Médica, Departamento de Microbiología e Inmunología.

² Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET). Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San Pedro, Costa Rica.

³ Laboratorio Clínico y Banco de Sangre de la Universidad de Costa Rica, Universidad de Costa Rica, Hospital del Trauma, San José, Costa Rica.

Recibido: septiembre 2022

Aceptado: septiembre 2022

Correspondencia

Daniela Jaikel Viquez
daniela.jaikelviquez@ucr.ac.cr

Este artículo debe citarse como: Ortiz-Solano D, Jaikel-Viquez D, Lozada S, Gross NT. Tipificación molecular y susceptibilidad *in vitro* de aislamientos clínicos costarricenses del complejo *Trichophyton mentagrophytes*. Dermatol Rev Mex 2023; 67 (2): 155-167.

for itraconazole, 32 and 89.60 µg/mL for fluconazole, and 0.13 and 0.35 µg/mL for terbinafine respectively.

CONCLUSIONS: In the present study, only *T. interdigitale* was identified among the species belonging to *T. mentagrophytes* complex, which demonstrates a person-to-person transmission. All isolates were susceptible to amorolfine, bifonazole, ciclopirox and terbinafine. However, the majority exhibited resistance to itraconazole and fluconazole.

KEYWORDS: *Trichophyton interdigitale*; Amorolfine; Bifonazole; Ciclopirox; Fluconazole; Itraconazole; Onychomycosis.

ANTECEDENTES

Los dermatofitos son hongos filamentosos, capaces de infectar tejidos queratinizados, de origen humano y animal, produciendo infecciones superficiales en la piel y sus anexos (pelo y uñas).¹ Estos hongos se consideran los principales agentes etiológicos de onicomicosis. Entre ellos destacan *Trichophyton rubrum* y los miembros del complejo *Trichophyton mentagrophytes*. Según datos de Latinoamérica, los hongos del complejo *T. mentagrophytes* ocupan el tercer lugar como agentes etiológicos de las dermatofitosis (10% de los aislamientos), después de *T. rubrum* y *Microsporum canis*.² En Costa Rica, un estudio realizado en 2007 reveló que estos hongos constituyen el segundo agente más comúnmente implicado en las onicomicosis (4%), después de *T. rubrum*. Además, son agentes que se aíslan comúnmente de muestras de piel en el país.³

El complejo *T. mentagrophytes* está compuesto por hongos zoofílicos y antropofílicos. Esta diferencia ecológica incentivó distintos estudios moleculares para ver si efectivamente se trataba de especies diferentes, encontrándose que, por ejemplo, *T. mentagrophytes* (conejos y roedores)

y *Trichophyton erinacei* (erizos y roedores) son zoofílicos y *Trichophyton interdigitale* es antropofílico.⁴⁻⁹ En términos clínicos, la diferenciación de especies antropofílicas y zoofílicas resulta de especial importancia debido a que proporciona información acerca de la fuente de infección, así como de la elección y duración del tratamiento. Se ha reportado que los aislamientos de la especie *T. interdigitale* no son susceptibles a los azoles en comparación con las demás especies.⁷ Sin embargo, en Costa Rica no existen estudios que hayan caracterizado a este complejo de hongos y, por tanto, se desconoce su epidemiología.

A lo largo de la historia, las dermatofitosis se han considerado infecciones fúngicas de fácil tratamiento. No obstante, en los últimos años se ha observado un aumento de infecciones resistentes en países como India.¹⁰ El incremento de infecciones fúngicas sin curación clínica hace necesario aumentar el estudio de este grupo de hongos. Por otro lado, la mayor parte de los tratamientos antifúngicos en las onicomicosis suelen tener una duración considerable (3-6 meses hasta un año) y, por ende, con el fin de prevenir la administración de fármacos tóxicos de forma innecesaria, resulta importante determinar el perfil de susceptibilidad de cada uno

de los diferentes agentes etiológicos.^{11,12} Por ejemplo, existen reportes que han vinculado a hongos del complejo *T. mentagrophytes* con sensibilidad disminuida al fluconazol y al itraconazol¹¹ y un estudio que vincula a los hongos de este complejo con susceptibilidad disminuida a la terbinafina.⁷ Esto resulta de gran relevancia ya que estos antifúngicos se han considerado clásicamente parte del tratamiento contra las dermatofitosis. Son fármacos que están ampliamente disponibles en las farmacias del país y son de libre venta. Además, el fluconazol y el itraconazol son recetados como opción terapéutica en la Caja Costarricense del Seguro Social, mientras que la terbinafina se receta a nivel privado.

Hasta nuestro conocimiento, en Costa Rica no existen estudios que hayan evaluado el perfil de susceptibilidad *in vitro* a antifúngicos de los hongos del complejo *T. mentagrophytes*. Ante los reportes internacionales de resistencia de este grupo de hongos, resulta relevante conocer cuáles son las mejores opciones terapéuticas a partir de aislamientos obtenidos en el país. Al comprobar la susceptibilidad de los distintos aislamientos, es posible establecer un correcto esquema de tratamiento, con el fin de disminuir las infecciones y complicaciones asociadas. Por tanto, el objetivo de este estudio es caracterizar aislamientos clínicos costarricenses del complejo *T. mentagrophytes* para determinar cuáles son las especies circulantes y su patrón de susceptibilidad *in vitro* hacia amorolfina, bifonazol, ciclopirox, fluconazol, itraconazol y terbinafina, antimicóticos prescritos en el tratamiento de las dermatofitosis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio de tipo experimental para tipificar fenotípica y genéticamente aislamientos clínicos costarricenses del complejo *T. mentagrophytes* y evaluar su susceptibilidad antifúngica, efectuado de 2019 a 2020. Estos hongos fueron depositados en la Micoteca de la Facultad de Microbiología de

la Universidad de Costa Rica (VI- B7-732), entre 1991 y 2018. Todos los aislamientos se obtuvieron de pacientes diferentes. Los hongos se mantuvieron en tubos con medio D a temperatura ambiente (20-30°C). Como control para la tipificación molecular se utilizó la cepa control *American Type Culture Collection* (ATCC) ATCC 9533, correspondiente a *T. interdigitale*. Como controles para los estudios de susceptibilidad se utilizaron cepas control de la ATCC: *Candida krusei* ATCC 6258 y *Candida parapsilosis* ATCC 22019.

Identificación macroscópica y microscópica

Los hongos se identificaron de forma preliminar de manera macroscópica y microscópica. Se describió el anverso y reverso de las colonias crecidas en medio D y se realizaron montajes húmedos con azul de lactofenol que fueron analizados a 400X¹³.

Prueba de hidrólisis de la urea

Los aislamientos se inocularon en medio de agar urea de Christensen y se incubaron a temperatura ambiente (20-30°C) durante una semana. Se conservaron en el estudio los que lograron virar el medio de cultivo de amarillo a rojo, lo cual pone de manifiesto la actividad ureasa propia de este complejo de especies. Por el contrario, se descartaron los hongos que no lograron virar el medio.¹³

Extracción de ADN

Los aislamientos se inocularon en placas de agar Mycosel® y se incubaron a temperatura ambiente hasta obtener el crecimiento deseado (aproximadamente 22 días). Posteriormente, se procedió a recolectar las colonias del medio de cultivo. Para ello, se vertieron 2 mL de etanol absoluto sobre las colonias. Se recolectó el material fúngico con un bisturí estéril mediante raspado. Enseguida se depositó el contenido en tubos cónicos de 15 mL y se agregó etanol absoluto hasta cubrir

el material fúngico. Los tubos se incubaron a 4°C durante la noche. Al día siguiente se removió el exceso de etanol y se procedió a macerar el material en un mortero. Luego se utilizó el kit comercial NucleoSpin Plant II (Macherey Nagel, Alemania), siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Posteriormente, se cuantificó la concentración de ADN extraído con el equipo NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos). El ADN de alto peso molecular se almacenó a -20°C.

Amplificación de ADN

Con el producto obtenido se realizó la amplificación del ITS, según el protocolo descrito por White y colaboradores.¹⁴ Los imprimadores utilizados fueron ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') [forward] e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') [reverse]. Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis. Para tal fin, se elaboró un gel de agarosa al 1.5%, que fue revelado mediante una corrida a 80 V durante 60 minutos. Los amplicones se enviaron a MACROGEN Inc. (Corea del Sur) para ser secuenciados. Luego, las secuencias obtenidas fueron revisadas y editadas utilizando el programa BioEdit.¹⁵ Usando el programa MEGAX (del inglés *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*)¹⁶ se realizó el alineamiento (ClustalW)¹⁷ y la comparación con las secuencias existentes en GenBank. Los árboles filogenéticos se construyeron utilizando inferencia bayesiana mediante el programa MrBayes; 1000 réplicas se analizaron, el porcentaje de Bootstrap se reflejó en cada rama del árbol.

Pruebas de susceptibilidad *in vitro* a los antifúngicos

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó según el método de microdilución en medio líquido según las directrices del documento Método de Microdilución en Caldo M38-A

para hongos filamentosos de CLSI (*Clinical Laboratory and Standards Institute*).¹⁸

Los antifúngicos estudiados fueron amorolfina, bifonazol, ciclopirox, itraconazol, terbinafina (Royal Pharm, Hangzhou, China) y fluconazol (Laboratorios Stein SA, Costa Rica). Las concentraciones finales fueron: 0.13-64 µg/mL para amorolfina y terbinafina 0.03-16 µg/mL para bifonazol e itraconazol, 0.06-32 µg/mL para ciclopirox y 0.25-128 µg/mL para fluconazol. Para los hongos filamentosos el CLSI, hasta la fecha, no ha indicado puntos de corte. Se indica que para el fluconazol los hongos filamentosos no son sensibles a este antifúngico, la mayor parte de las CMI son mayores de 64 µg/mL, con la excepción de algunos hongos dimórficos y dermatofitos y para el itraconazol, las CMI de este antifúngico suelen estar comprendidas entre 0.03 y 16 µg/mL.¹⁸

Para *T. mentagrophytes* la CMI fue la concentración más baja que produjo una inhibición del 80% del crecimiento, al compararla contra el control de crecimiento. Para los controles levaduriformes, la CMI fue la concentración más baja que produjo la inhibición del 50% del crecimiento. La lectura se realizó de manera visual y espectrofotométrica a 450 nm utilizando un equipo Synergy HT (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, Estados Unidos).

Análisis estadístico

Para analizar los resultados obtenidos se utilizó el programa estadístico Minitab® Statistical Software versión 19 (Minitab, LLC, State College, PA, Estados Unidos). Se determinó la media geométrica y el intervalo para las CMI, también se determinó la CMI₅₀ y la CMI₉₀ para cada antifúngico analizado. Finalmente, se realizó un análisis de variancia ANOVA para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre las CMI obtenidas para los distintos antifúngicos.

RESULTADOS

Aislamientos clínicos

En este estudio se analizaron 15 aislamientos clínicos de hongos del complejo *T. mentagrophytes*. Los datos demográficos de los pacientes correspondientes a los aislamientos analizados se encuentran en el **Cuadro 1**. La mayor parte de los aislamientos carecían de datos demográficos. No obstante, entre los que sí contaban con dichos datos se apreció que la mayoría de los pacientes eran del sexo femenino. Además, la mayoría correspondía a personas adultas y la zona anatómica más comúnmente afectada fue alguna de las uñas de los pies.

Caracterización fenotípica de los aislamientos

Los 15 aislamientos estudiados exhibieron la morfología colonial típica correspondiente a

hongos del complejo *T. mentagrophytes*: colonias blancas o amarillentas, pulverulentas con pigmentos color amarillo a marrón-rojizo en el reverso (**Figura 1**). Los montajes de todos los

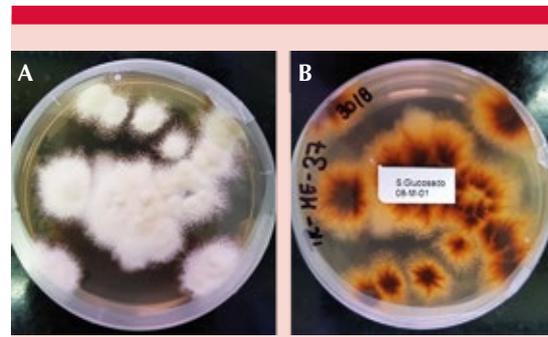


Figura 1. Morfología macroscópica típica de los hongos del complejo *T. mentagrophytes* crecidas en medio D y almacenadas a temperatura ambiente (20-30°C). **A.** Colonias pulverulentas blancas (anverso). **B.** Pigmento café-rojizo (reverso).

Cuadro 1. Datos demográficos de los pacientes con dermatofitosis a partir de los cuales se obtuvieron los aislamientos en estudio

Aislamiento	Año	Código de acceso de GenBank	Datos demográficos del paciente			
			Sexo	Edad	Lugar de residencia	Sitio anatómico de la lesión
TR-ME-07	ND	MT371910	ND	ND	ND	ND
TR-ME-10	1994	MT371911	ND	ND	ND	ND
TR-ME-13	2000	MT371912	ND	ND	ND	ND
TR-ME-15	ND	MT371913	ND	ND	ND	ND
TR-ME-16	ND	MT371914	ND	ND	ND	ND
TR-ME-17	ND	MT371915	ND	ND	ND	ND
TR-ME-18	ND	MT371916	ND	ND	ND	ND
TR-ME-19	ND	MT371917	ND	ND	ND	ND
TR-ME-20	ND	MT371918	ND	ND	ND	ND
TR-ME-24	2016	MT371919	Femenino	69	ND	Uñas de los pies
TR-ME-25	2016	MT371920	Femenino	70	ND	Uñas de los pies
TR-ME-27	2017	MT371921	Femenino	62	San José	Planta del pie
TR-ME-31	2018	MT371922	Femenino	4	San José	Piel
TR-ME-37	2018	MT371924	Masculino	48	Limón	Piel de la cara
TR-ME-38	2018	MT371925	Masculino	64	San José	Uñas de los pies

ND: no hay datos.

aislamientos en azul de lactofenol revelaron aleurias redondas y piriformes, acompañadas de micelio hialino septado e hifas en espiral. Un 22% de los aislamientos mostraron macroaleurias tabicadas (**Figura 2**). Además, todos los aislamientos resultaron positivos para la producción de la enzima ureasa.

Caracterización genotípica de los aislamientos

Las secuencias obtenidas se depositaron en GenBank. Los códigos de acceso se muestran en el **Cuadro 1**. Se realizó el análisis filogenético utilizando secuencias de cepas tipo y secuencias de cepas previamente caracterizadas y publicadas para estimar con mayor certeza la taxonomía de los aislamientos (**Cuadro 2**). El árbol filogenético se obtuvo mediante inferencia bayesiana y se construyó con las secuencias ITS (558 bp). Mil réplicas se analizaron y el porcentaje de remuestreo (*Bootstrap*) se indica en cada rama del árbol. Como secuencia externa se utilizó *Neurospora crassa* CBS 709.71, código de acceso a GenBank MH860307.1. Todos los aislamientos analizados se identificaron como *T. interdigitale*. **Figura 3**

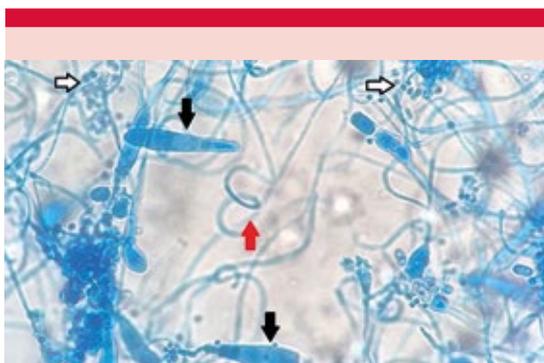


Figura 2. Morfología microscópica característica de los hongos del complejo *T. mentagrophytes* en azul de lactofenol a 400X; se observan microaleurias redondas (flecha blanca), macroaleurias tabicadas (flecha negra) e hifas en espiral (flecha roja).

Pruebas de susceptibilidad *in vitro* a los antifúngicos

En el **Cuadro 3** y en la **Figura 4** se muestra la distribución de las CMI de los 15 aislamientos estudiados. Los antifúngicos que se probaron fueron amorolfina, bifonazol, ciclopirox, fluconazol, itraconazol y terbinafina. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las CMI de los antifúngicos ($F = 24.00$; $gl = 5$; $p < 0.0001$). El análisis *post hoc* de Tukey agrupó a los tratamientos en dos conjuntos: en el primer grupo se incluyó el fluconazol y en el segundo grupo a la amorolfina, el bifonazol, el ciclopirox, el itraconazol y la terbinafina.

Se encontró que la terbinafina y el bifonazol mostraron la mayor actividad antifúngica (menor CMI), ya que 13 de los 15 aislamientos analizados tuvieron CMI de 0.13 y ≤ 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. La amorolfina también exhibió elevada actividad antifúngica contra los aislamientos de este complejo de hongos, ya que 9/15 aislamientos tuvieron CMI ≤ 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El ciclopirox mostró buena actividad antifúngica, puesto que 11/15 aislamientos tuvieron CMI ≤ 2.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

En el caso de los triazoles, el itraconazol exhibió actividad antifúngica baja, ya que sólo 5/15 aislamientos analizados se catalogaron como sensibles a este medicamento (CMI ≤ 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Por otro lado, el fluconazol tuvo la menor actividad antifúngica, ya que 14/15 aislamientos se catalogaron como sensibles dependientes de dosis o resistentes (CMI ≥ 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

DISCUSIÓN

En este trabajo se caracterizaron aislamientos clínicos costarricenses del complejo *T. mentagrophytes*. En la actualidad, la identificación mediante morfología de los hongos dermatofitos sigue siendo retardadora. Esto debido a la gran diversidad que exhiben estos hongos, así como

Cuadro 2. Cepas tipo y caracterizadas similares a los aislamientos clínicos costarricenses del complejo *T. mentagrophytes* analizados en este estudio

Aislamiento	Identificación	Código GenBank	Query cover%	E-value	% ID	País	Manifestación clínica	Código
TR-ME-07	<i>T. interdigitale</i>	MN966494.1	100	0.0	100.00	Irán	Tiña del pie	-
TR-ME-10	<i>T. interdigitale</i>	MH859073.1	100	0.0	99.84	Holanda	Tiña del pie	CBS 101.68
TR-ME-13	<i>T. interdigitale</i>	KC146353.2	100	0.0	100.00	-	Clínico	ATCC 9533
TR-ME-16	<i>T. interdigitale</i>	MH858507.1	100	0.0	100.00	Holanda	Vello púbico	CBS 110.65
TR-ME-17	<i>T. interdigitale</i>	MN886820.1	100	0.0	100.00	Camboya	Tiña del cuerpo	-
TR-ME-15	<i>T. interdigitale</i>	KM578844.1	99	0.0	100.00	Brasil	Tiña del pie y onicomycosis	ATCC MYA-3108
TR-ME-18	<i>T. interdigitale</i>	MH858883.1	99	0.0	99.83	Holanda	Tiña del pie	CBS 559.66
TR-ME-19	<i>T. interdigitale</i>	MN691060.2	100	0.0	100.00	Senegal	Tiña del pie	-
TR-ME-20	<i>T. interdigitale</i>	MN807366.1	100	0.0	99.82	Irán	Clínico	-
TR-ME-24	<i>T. interdigitale</i>	MN966494.1	100	0.0	100.00	Irán	Tiña del pie	-
TR-ME-25	<i>T. interdigitale</i>	KJ606110.1	99	0.0	99.85	Bélgica	Clínico	ATCC 24952
TR-ME-27	<i>T. interdigitale</i>	LR746289.1	100	0.0	100.00	República Checa	Onicomycosis	-
TR-ME-31	<i>T. interdigitale</i>	FJ746658.1	99	0.0	99.85	Estados Unidos	Onicomycosis	ATCC MYA-4439
TR-ME-37	<i>T. interdigitale</i>	MN691064.2	99	0.0	99.25	Francia	Clínico	-
TR-ME-38	<i>T. interdigitale</i>	MF443775.1	96	0.0	99.39	Vietnam	Clínico	-

al fenómeno de pleomorfismo producto del subcultivo sucesivo.¹⁰ Esto es válido también para los hongos que conforman el complejo *T. mentagrophytes*. En la bibliografía se ha postulado que la especie *T. mentagrophytes* se distingue por mostrar colonias pulverulentas, mientras que la especie *T. interdigitale* muestra colonias más algodonosas y mayor cantidad de microaleurias.^{2,4,19} No obstante, varios estudios han demostrado que lo anterior no siempre se cumple al correlacionar la identificación mediante métodos moleculares con la morfología del hongo.^{4,7} Por tanto, para la identificación definitiva de las especies pertenecientes a este complejo, resulta estrictamente necesario recurrir a métodos moleculares. En este estudio, todos los aislamientos exhibieron la morfología típica pulverulenta que caracteriza a este complejo

de hongos. Asimismo, fue posible observar el fenómeno de pleomorfismo en la mayoría de los aislamientos luego de realizar varios subcultivos.

T. interdigitale es un dermatofito antropofílico causante de la mayoría de los cuadros de dermatofitosis por hongos del complejo *T. mentagrophytes* reportados en todo el mundo;^{4,7,19,20} por tanto, no es sorprendente que el 100% de los aislamientos de este estudio fueran agrupados dentro de esta especie. Además, al tratarse de muestras clínicas humanas, era esperable que el agente etiológico más común fuera un dermatofito antropofílico. Un estudio realizado en Chile en 2019 analizó 17 aislamientos de hongos del complejo *T. mentagrophytes*. Luego de realizar la amplificación de la región ITS, los 17 aislamientos se clasificaron como *T. interdigitale*.⁴ Al

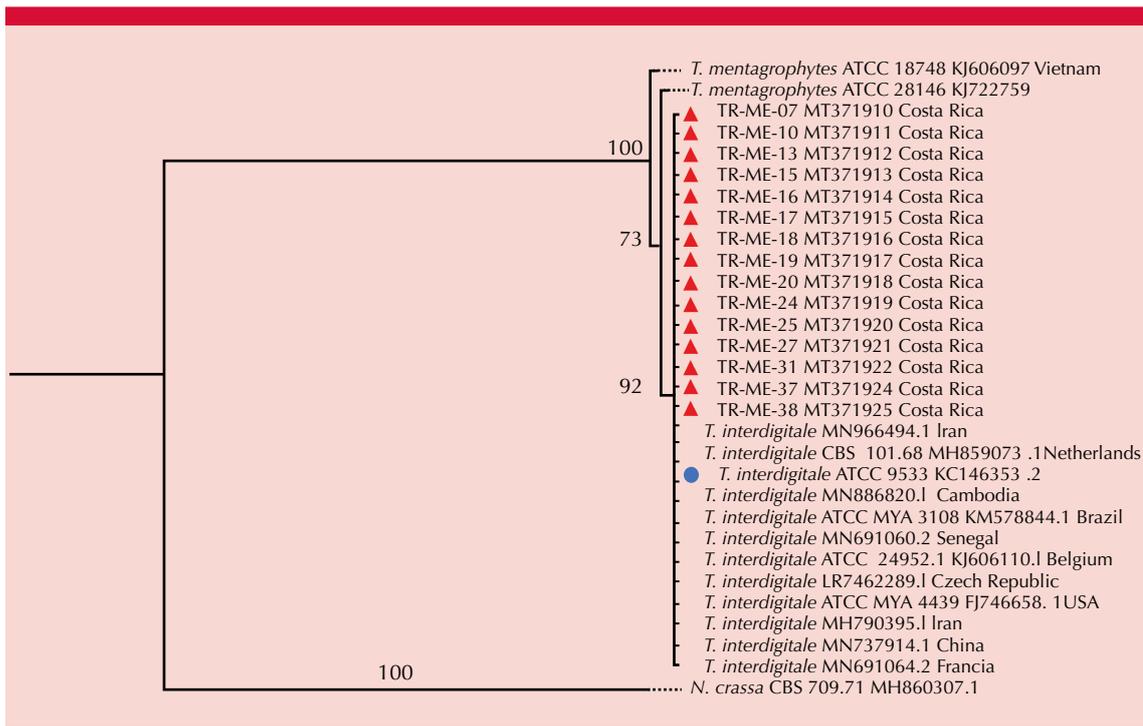
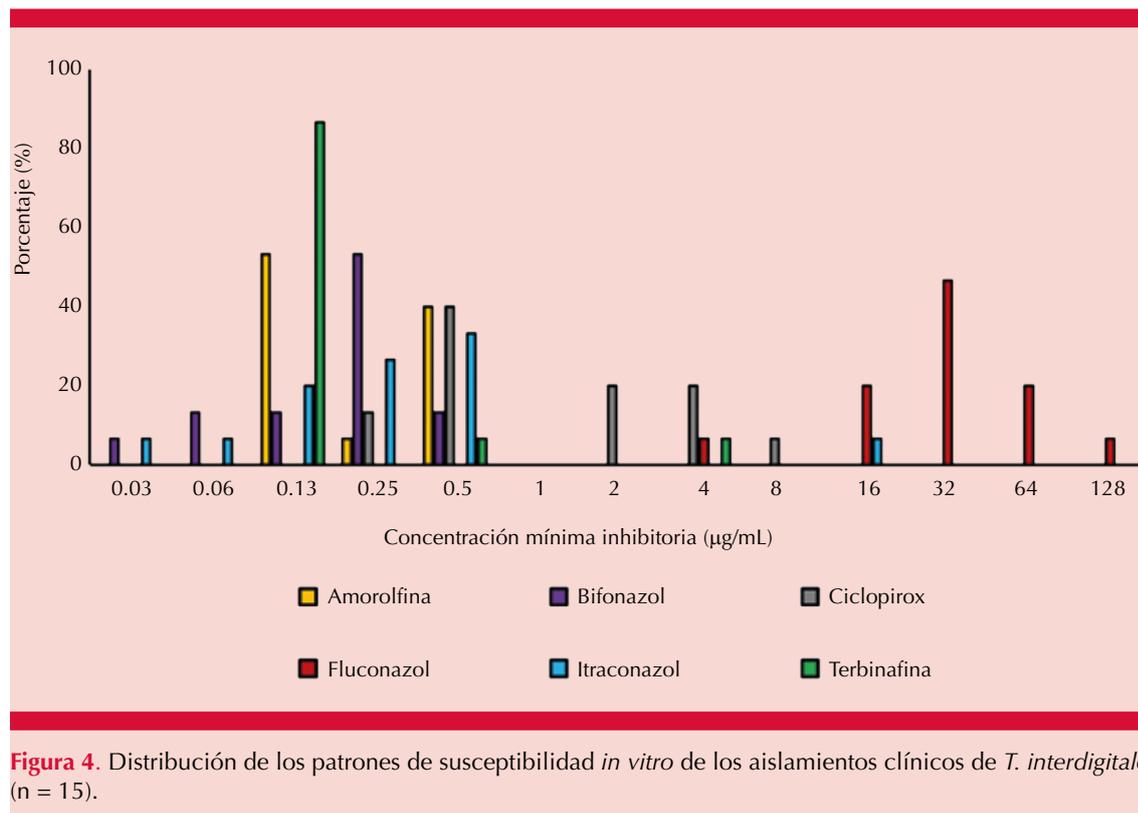


Figura 3. Árbol filogenético construido con las secuencias ITS (del inglés *Internal Transcribed Spacer*; 558 pb) obtenido mediante inferencia bayesiana. Se analizaron 1000 réplicas y el porcentaje de remuestreo (*bootstrap*) se muestra en cada rama del árbol. Se determinó un índice de consistencia de 1.0, un índice de retención de 1.0 y un índice compuesto de 1.0 para todos los sitios informativos de parsimonia. Los aislamientos costarricenses están marcados con triángulos rojos y la cepa de referencia con un círculo azul.

Cuadro 3. Distribución de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de aislamientos clínicos costarricenses de *T. interdigitale* (n = 15) provenientes de onicomicosis y muestras de piel

Antifúngico	CMI (µg/mL)			
	Promedio	Intervalo	CMI ₅₀	CMI ₉₀
Amorolfina	0.29 ± 0.18	0.13-0.50	0.13	0.50
Bifonazol	0.23 ± 0.14	0.03-0.50	0.25	0.50
Ciclopirox	1.97 ± 2.20	0.25-8.00	0.50	5.60
Fluconazol	39.73 ± 30.41	4.00-128.00	32.00	89.60
Itraconazol	1.33 ± 4.06	0.03-16.00	0.25	6.70
Terbinafina	0.41 ± 1.00	0.13-4.00	0.13	0.35



comparar las secuencias de *T. interdigitale* con las existentes en la base de datos de GenBank, se encontraron similitudes superiores al 99.5% con secuencias reportadas para cepas de esta especie en América (Brasil y Estados Unidos), Europa (Bélgica, Francia, Holanda y República Checa), Asia (Camboya, Irán y Vietnam) y África (Senegal). Estos hongos también tenían un origen antropofílico. Los dermatofitos antropofílicos se reproducen asexualmente en nichos ecológicos estables²¹ ya que han perdido el contacto con la tierra. Además, al ser heterotálicos, se ha determinado que al ponerse en contacto con sus ejemplares complementarios no pueden llevar a cabo su reproducción sexual.⁸ Lo anterior explica por qué nuestros aislamientos y las cepas control fueron agrupadas dentro del mismo clado, evidenciando un origen clonal y que no ocurre recombinación genética en los aislamientos analizados.

Las pruebas de susceptibilidad a agentes antifúngicos en hongos dermatofitos no se realizan de forma rutinaria en el ámbito clínico. Lo anterior debido a las altas tasas de curación que se reportan para las dermatofitosis en la piel: 80-90%.²² No obstante, las tasas de curación son mucho más variables en el caso de las onicomicosis causadas por estos hongos (50-70%).²³ Además, en el caso de que ocurran recaídas es difícil definir si éstas se deben a poco apego al tratamiento o si se trata de infecciones causadas por cepas resistentes al mismo.²⁴ En este estudio se analizaron tres antifúngicos tópicos (amorolfina, bifonazol y ciclopirox) y tres sistémicos (fluconazol, itraconazol y terbinafina) prescritos para el tratamiento de los diversos tipos de dermatofitosis. Por lo general, el tratamiento tópico se indica en infecciones localizadas o de extensión limitada. Por ejemplo, la *tinea cruris*, *tinea corporis* y *tinea pedis* suelen aliviarse con

tratamiento tópico. Por el contrario, la terapia sistémica oral se recomienda en infecciones de mayor extensión. La *tinea capitis* siempre requiere terapia sistémica, al igual que la mayoría de los casos de onicomicosis.^{22,23}

La concentración mínima inhibitoria de la amorolfina mostró valores bajos en todos los aislamientos evaluados. Esto es comparable con los valores reportados en otros estudios, en donde se evidencia que la amorolfina tiene buena actividad antifúngica contra este complejo.²⁵⁻²⁹

El bifonazol también mostró buena actividad antifúngica contra los aislamientos evaluados. Esto es similar a lo reportado por Carrillo y su grupo de 19 aislamientos clínicos de *T. interdigitale* provenientes de España.²⁵

El ciclopirox mostró una concentración mínima inhibitoria promedio ligeramente mayor a las observadas en otros estudios.^{27,30} Sin embargo, sigue siendo un valor relativamente bajo, por lo que puede afirmarse que este antifúngico tiene buena actividad antifúngica contra *T. interdigitale*. Es importante resaltar que un estudio realizado en Suiza en 2013 evaluó dos aislamientos de onicomicosis y la cepa ATCC 28188, todos de la especie *T. rubrum*, ante diferentes concentraciones de antifúngicos. Dicho estudio encontró que la exposición prolongada a concentraciones subóptimas de amorolfina, itraconazol, terbinafina y ciclopirox conlleva a la disminución en la susceptibilidad ante los primeros tres agentes, pero no al ciclopirox. Esto resulta especialmente relevante en el tratamiento de la onicomicosis, debido a que los esquemas terapéuticos son prolongados. Además, se menciona que, en los sitios anatómicos en donde el fármaco no alcanza una concentración apropiada, es mayor la probabilidad de que el hongo desarrolle resistencia.²⁴ El ciclopirox es un antifúngico de la familia de las hidroxipiridonas, y es química y mecánicamente diferente a los demás fármacos antifúngicos. Éste no afecta la

síntesis de ergosterol ni es metabolizado por el citocromo P450. Además, tiene múltiples mecanismos de acción. Se cree que por estas razones no se ha reportado resistencia, tanto de hongos dermatofitos como levaduriformes, a este medicamento.²⁴ Lo anterior es congruente con los resultados reportados en este estudio, ya que los valores de la concentración mínima inhibitoria obtenidos del ciclopirox fueron bajos.

En este estudio sólo un aislamiento resultó sensible al fluconazol, lo cual es congruente con lo reportado en la bibliografía.^{26,31-35} Por ejemplo, un estudio realizado en Irán en 2018 evaluó 66 aislamientos de *T. interdigitale*. Se encontró un intervalo de CMI de 4.00 a 64.00 µg/mL.³¹

El itraconazol mostró un intervalo de valores de CMI similar a lo reportado en otros estudios.^{30,32,36} Por ejemplo, en Canadá se encontró un intervalo de CMIs entre 0.06 y 32 µg/mL al estudiar 32 aislamientos de hongos del complejo *T. mentagrophytes*.³⁰ El itraconazol se incluye como parte del tratamiento sistémico de primera línea contra la *tinea pedis*, *tinea corporis* y onicomicosis²² y en este estudio, sólo 5/15 aislamientos resultaron sensibles.

En un estudio previo se reportó resistencia al fluconazol en aislamientos clínicos costarricenses de *T. rubrum*, de los 80 aislamientos analizados el 8.7% mostró una CMI de 16 a 32 µg/mL y en un 5% fue mayor de 64 µg/mL.³⁷ La resistencia al fluconazol y al itraconazol, antifúngicos sistémicos recetados como opción terapéutica en la Caja Costarricense del Seguro Social, podría estar relacionada con la administración frecuente de estos antifúngicos en nuestra población, así como se ha demostrado en aislamientos de *Candida* sp resistentes al miconazol debido a su administración indiscriminada en sexoservidoras en Costa Rica.³⁸

La baja susceptibilidad a los azoles en hongos patógenos humanos se ha asociado con diversos

mecanismos de resistencia. Así, en hongos de los géneros *Candida* y *Aspergillus* se ha detectado la sobreexpresión del gen de la enzima blanco de dichos antifúngicos, la 14 α lanosterol desmetilasa.³⁹ Otro de los mecanismos vinculados con resistencia a compuestos azólicos es la sobreexpresión de transportadores de eflujo, los cuales son capaces de bombear múltiples fármacos afuera del citoplasma fúngico. Esto podría explicar lo encontrado en este estudio, ya que un mismo aislamiento tuvo el valor más alto de CMI para cuatro diferentes agentes antifúngicos: fluconazol, itraconazol, bifonazol y terbinafina.

Por último, la terbinafina mostró la mayor actividad antifúngica contra *T. interdigitale*, demostrando alta susceptibilidad, lo cual es similar a lo reportado en la bibliografía.^{12,31,32,35,36,40} Por ejemplo, en Brasil (2018) se reportó el mismo intervalo de concentración mínima inhibitoria encontrado en este estudio.²² Este medicamento no sólo es efectivo *in vitro*, sino también a nivel clínico, ya que distintos casos comunicados en la bibliografía causados por *T. erinacei*, otro miembro del complejo *T. mentagrophytes*, se han curado luego de la administración oral de este tratamiento. Por ejemplo, en México se reportó el caso de un niño de 12 años con tiña inflamatoria de la mano debido al contacto con un erizo pigmeo africano;⁴¹ en Tailandia se reportó el caso de una paciente de 23 años con lupus eritematoso sistémico que sufrió una onicomiosis y tiña del cuerpo, también por contacto con un erizo⁴² y en Chile se comunicó el caso de dos niños con tiña facial;⁴³ todos ellos se curaron con terbinafina.

La resistencia a la terbinafina en hongos dermatofitos se ha reportado en algunos países, como Suiza e India. Un estudio realizado en India en 2018 evaluó 63 aislamientos clínicos de *T. interdigitale*, aislados a partir de pacientes con *tinea cruris* y *tinea corporis*, en un hospital en Nueva Delhi. De la totalidad de hongos en estudio, 20 de los aislamientos resultaron resistentes a este tratamiento. Se determinó que el mecanismo de

resistencia implicado consistía en mutaciones puntuales en el gen de la enzima blanco, la escualeno epoxidasa.⁴⁴ Esta mutación produce cambios estructurales en la proteína blanco, lo cual, a su vez, disminuye la afinidad hacia la terbinafina, sin afectar la síntesis de ergosterol.⁴⁵

CONCLUSIONES

Las especies del complejo *T. mentagrophytes* son agentes importantes de dermatofitosis en el ser humano. Debido a la gran diversidad morfológica que muestran, así como el fenómeno de pleomorfismo, la identificación definitiva de especies de este complejo debe realizarse mediante métodos moleculares. En este estudio, todos los aislamientos analizados se agruparon como *T. interdigitale*, lo que sugiere que es la especie de este complejo de hongos que circula en Costa Rica y, al ser un hongo antropofílico, puede establecerse que la transmisión ocurre por contacto entre personas. Asimismo, se encontró que los aislamientos de este estudio y las cepas control eran clones, lo que reafirmó que la reproducción de dermatofitos antropofílicos ocurre de forma asexual. A nivel de identificación de laboratorio se recomienda realizar la identificación de especie del complejo *T. mentagrophytes*, con el fin de proporcionar una mayor guía al médico al momento de tratar al paciente.

Los resultados obtenidos en las pruebas de susceptibilidad a agentes antimicóticos en este estudio demuestran que la mejor opción para el tratamiento tópico de lesiones superficiales causadas por *T. interdigitale* es el bifonazol; por otro lado, la amorolfina y el ciclopirox pueden considerarse opciones de tratamiento tópico en onicomiosis. Como opción terapéutica sistémica, se recomienda la terbinafina. No se recomienda la administración de agentes azólicos, como el itraconazol y el fluconazol, debido a que *in vitro* no tienen buena efectividad contra *T. interdigitale*. En su defecto, si en el manejo terapéutico de las dermatofitosis por este hongo

están disponibles únicamente el fluconazol y el itraconazol, se recomienda realizar las pruebas de sensibilidad de los aislamientos clínicos y, en caso de resistencia, proporcionar a los pacientes afectados el tratamiento adecuado, en este caso, la terbinafina. Se recomiendan futuros estudios *in vitro* que evalúen la actividad combinada de antifúngicos tópicos y sistémicos contra *T. interdigitale* aislados de onicomicosis.

Agradecimientos

Se agradece a la Bch. Alejandra Gómez Arrieta por su apoyo durante la realización de este proyecto.

REFERENCIAS

- Fréalte E, Rodrigue M, Gantois N, Aliouat CM, et al. Phylogenetic analysis of *Trichophyton mentagrophytes* human and animal isolates based on MnSOD and ITS sequence comparison. *Microbiology* 2007; 153: 3466-3477. Doi: 10.1099/mic.0.2006/004929-0.
- Bonifaz A. *Micología Médica Básica*. 4ª ed. Ciudad de México: McGrawHill, 2012; 95, 127.
- Salas I, Gross N, Carrillo P. Micosis superficiales diagnosticadas en el laboratorio de micología médica de la Universidad de Costa Rica. *Rev Costarric Cienc Med* 2007; 28: 29-35.
- Vieille Oyarzo P, Cruz Choappa R, Álvarez Duarte E. Diferenciación morfofisiológica y molecular por curvas de melting de alta resolución (HRMA) y secuenciación del complejo *Trichophyton mentagrophytes* en cepas humanas en Valparaíso, Chile. *Rev Argent Microbiol* 2020; 52 (2): 88-95. Doi: 10.1016/j.ram.2019.05.002.
- Fernández R, Segundo C, Arenas R, Silva D, col. Determinación de las variedades de *Trichophyton mentagrophytes* en 10 casos de dermatofitosis de Paraguay. *Bioquímica* 2002; 27: 41-45.
- Cafarchia C, Iatta R, Latrofa MS, Gräser Y, et al. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of dermatophytes. *Infect Genet Evol* 2013; 20: 336-351. DOI: 10.1016/j.mee-gid.2013.09.005.
- Heidemann S, Monod M, Gräser Y. Signature polymorphisms in the internal transcribed spacer region relevant for the differentiation of zoophilic and anthropophilic strains of *Trichophyton interdigitale* and other species of *T. mentagrophytes sensu lato*. *Br J Dermatol* 2010; 162: 282-295. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2009.09494.x.
- Symoens F, Jousson O, Planard C, Fratti M, et al. Molecular analysis and mating behaviour of the *Trichophyton mentagrophytes* species complex. *Int J Med Microbiol* 2011; 301: 260-266. DOI: 10.1016/j.ijmm.2010.06.001.
- Kim JA, Takahashi Y, Tanaka R, Fukushima K, et al. Identification and subtyping of *Trichophyton mentagrophytes* by random amplified polymorphic DNA. *Mycoses* 2001; 165: 157-165. DOI: 10.1046/j.1439-0507.2001.00633.x.
- Rengasamy M, Chellam J, Ganapati S. Systemic therapy of dermatophytosis: Practical and systematic approach. *Clin Dermatology Rev* 2017; 1: 19-23. DOI: 10.4103/CDR.CDR_36_17.
- Khurana A, Sardana K, Chowdhary A. Antifungal resistance in dermatophytes: Recent trends and therapeutic implications. *Fungal Genet Biol* 2019; 132: 1-9. DOI: 10.1016/j.fgb.2019.103255.
- Dabas Y, Xess I, Singh G, Pandey M, et al. Molecular identification and antifungal susceptibility patterns of clinical dermatophytes following CLSI and EUCAST guidelines. *J Fungi* 2017; 3: 1-10. DOI: 10.3390/jof3020017.
- Gross N, Salas I. *Métodos diagnósticos en micología médica*. San José: UCR, 2015; 10,137.
- White TJ, Bruns TD, Lee SB, Taylor JW. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. New York: Academic Press, 1990; 315-322.
- Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 1999; 41: 95-98.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013; 30: 2725-2729. DOI: 10.1093/molbev/mst197.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, et al. Clustal W and clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 2007; 23: 2947-2948. DOI: 10.1093/bioinformatics/btm404.
- Cantón-Lacasa E, Martín-Mazuelos E, Espinel-Ingroff A. Pruebas estandarizadas para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos. *Rev Iberoam Micol* 2007: 1-24.
- Frías-De-león MG, Martínez-Herrera E, Atoche-Diéguez CE, González-Cespón JL, et al. Molecular identification of isolates of the *Trichophyton mentagrophytes* complex. *Int J Med Sci* 2020; 17: 45-52. doi:10.7150/ijms.35173.
- Tartabini ML, Bonino GS, Racca L. Estudio taxonómico de aislamientos clínicos de *Trichophyton* en Rosario, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología* 2013; 45: 248-253. DOI: 10.1016/S0325-7541(13)70031-2.
- De Hoog GS, Dukik K, Monod M, Packeu A, et al. Toward a novel multilocus phylogenetic taxonomy for the dermatophytes. *Mycopathologia* 2017; 182: 5-31. DOI: 10.1007/s11046-016-0073-9.
- Hay R. Therapy of skin, hair and nail fungal infections. *J Fungi* 2018; 4: 1-13. DOI: 10.3390/jof4030099.
- Ely JW, Rosenfeld S, Seabury Stone M. Diagnosis and management of tinea infections. *Am Fam Physician* 2014; 90: 702-10.
- Ghelardi E, Celandroni F, Gueye SA, Salvetti S, et al. Potential of ergosterol synthesis inhibitors to cause resistance

- or cross-resistance in *Trichophyton rubrum*. Antimicrob Agents Chemother 2014; 58: 2825-2829. DOI: 10.1128/AAC.02382-1.
25. Carrillo-Muñoz AJ, Tur-Tur C, Cárdenes D, Rojas F, et al. Influence of the ecological group on the in vitro antifungal susceptibility of dermatophytic fungi. Rev Iberoam Micol 2013; 30: 130-133. DOI: 10.1016/j.riam.2012.12.002.
 26. Harman S, Ashbee HR, Evans EGV. Testing of antifungal combinations against yeasts and dermatophytes. J Dermatolog Treat 2004; 15: 104-107. DOI: 10.1080/09546630410025988.
 27. Jo Siu WJ, Tatsumi Y, Senda H, Pillai R, et al. Comparison of in vitro antifungal activities of efinaconazole and currently available antifungal agents against a variety of pathogenic fungi associated with onychomycosis. Antimicrob Agents Chemother 2013; 57: 1610-1616. DOI: 10.1128/AAC.02056-12.
 28. Tamura T, Asahara M, Yamamoto M, Yamaura M, et al. In vitro susceptibility of dermatomycoses agents to six antifungal drugs and evaluation by fractional inhibitory concentration index of combined effects of amorolfine and itraconazole in dermatophytes. Microbiol Immunol 2014; 58: 1-8. DOI: 10.1111/1348-0421.12109.
 29. Li RY, Wan Z, Wang AP, Shen YN, et al. In vitro susceptibility testing of amorolfine in pathogenic fungi isolated from dermatomycosis patients in China. Mycoses 2004; 47: 402-406. DOI: 10.1111/j.1439-0507.2004.01014.x.
 30. Gupta AK, 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. DOI: 10.1046/j.1365-2133.2003.05418.x.
 31. Rezaei-Matehkolaei A, Khodavaisy S, Alshahni MM, Tamura T, et al. In vitro antifungal activity of novel triazole efinaconazole and five comparators against dermatophyte isolates. Antimicrob Agents Chemother 2018; 62: 1-6. doi:10.1128/AAC.02423-17.
 32. Khurana A, Masih A, Chowdhary A, Sardana K, et al. Correlation of in vitro susceptibility based on MICs and squalene epoxidase mutations with clinical response to terbinafine in patients with Tinea corporis/cruris. Antimicrob Agents Chemother 2018; 62: 1-22. DOI: 10.1128/AAC.01038-18.
 33. Barros MEDS, Santos DDA, Hamdan JS. Evaluation of susceptibility of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum* clinical isolates to antifungal drugs using a modified CLSI microdilution method (M38-A). J Med Microbiol 2007; 56: 514-51. DOI: 10.1099/jmm.0.46542-0.
 34. Oz Y, Qoraan I, Oz A, Balta I. Prevalence and epidemiology of tinea pedis and toenail onychomycosis and antifungal susceptibility of the causative agents in patients with type 2 diabetes in Turkey. Int J Dermatol 2017; 56: 68-74. DOI: 10.1111/ijd.13402.
 35. Altınbaş R, Özakkaş F, Barış A, Turan D, et al. In vitro susceptibility of seven antifungal agents against dermatophytes isolated in İstanbul. Turkish J Med Sci 2018; 48: 615-619. Doi:10.3906/sag-1709-157.
 36. Haghani I, Shams-Ghahfarokhi M, Dalimi Asl A, Shokohi T, et al. Molecular identification and antifungal susceptibility of clinical fungal isolates from onychomycosis (uncommon and emerging species). Mycoses 2019; 62: 128-143. DOI: 10.1111/myc.12854.
 37. Gross NT, Ureña M, Chaves O. Sensibilidad al fluconazol de aislamientos de *Trichophyton rubrum*. Acta Med Costarric 2014; 56: 23-26. DOI: <https://doi.org/10.51481/amc.v56i1.827>.
 38. Gross NT, Arias ML, Moraga M, Baddasarow Y, et al. Species distribution and susceptibility to azoles of vaginal yeasts isolated prostitutes. Infect Dis Obstet Gynecol 2007: 1-5. doi:10.1155/2007/82412.
 39. Monod M, Feuermann M, Salamin K, Fratti M, et al. *Trichophyton rubrum* azole resistance mediated by a new ABC transporter, TruMDR3. Antimicrob Agents Chemother 2019; 63: 1-19. DOI: 10.1128/AAC.00863-19.
 40. Lana AJD, Pippi B, Carvalho AR, Moraes RC, et al. In vitro additive effect on griseofulvin and terbinafine combinations against multidrug-resistant dermatophytes. Brazilian J Pharm Sci 2018; 54: 1-9. Doi:10.1590/s2175-97902018000217149.
 41. Cardona-Hernández MA, López-Ortiz KV, Rodríguez-Silva J. Tiña inflamatoria por *Trichophyton erinacei*. ¿Una enfermedad emergente? Dermatol Rev Mex 2021; 65 (Supl. 1): S151-S156. <https://doi.org/10.24245/dermatolrevmex.v65id.5437>.
 42. Phaitoonwattanakij S, Leeyaphan C, Bunyaratavej S, Chinhiran K. *Trichophyton erinacei* onychomycosis: The first to evidence a proximal subungual onychomycosis pattern. Case Rep Dermatol 2019; 11: 198-203. <https://doi.org/10.1159/000501424>.
 43. Rivaya B, Fernández-Rivas G, Cabañes FJ, Bielsa I, Castellá G, Wang JH, Matas L. *Trichophyton erinacei*: un patógeno emergente en las dermatofitosis en niños. Rev Iberoam Micol 2020; 37 (3-4): 94-96. doi: 10.1016/j.riam.2020.06.001.
 44. Singh A, Masih A, Khurana A, Singh PK, et al. High terbinafine resistance in *Trichophyton interdigitale* isolates in Delhi, India harbouring mutations in the squalene epoxidase gene. Mycoses 2018; 61: 477-484. DOI: 10.1111/myc.12772.
 45. Martinez-Rossi NM, Bitencourt TA, Peres NTA, Lang EAS, et al. Dermatophyte resistance to antifungal drugs: Mechanisms and prospectus. Front Microbiol 2018; 9: 1-18. DOI: 10.3389/fmicb.2018.011108.