

Sensibilidad *in vitro* de aislados del complejo *Paracoccidioides spp* a antifúngicos sistémicos utilizando el método de microdilución.

Julman R Cermeño¹, Primavera Alvarado², Mireya Mendoza² e Isabel Hernández de Cuesta¹

¹Departamento de Parasitología y Microbiología. Universidad de Oriente, Núcleo Bolívar, Ciudad Bolívar, Venezuela.

²Instituto de Biomedicina. Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

Palabras clave: Complejo *Paracoccidioides spp*; itraconazol; microdilución; sensibilidad antifúngica; voriconazol.

Resumen. El método de referencia, microdilución en caldo, recomendado por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorios (CLSI), no está disponible para hongos dimórficos, como los del género *Paracoccidioides*. En este trabajo se evaluó la sensibilidad *in vitro* del Complejo *Paracoccidioides* (n=19) frente a los antifúngicos sistémicos: anfotericina B, 5-fluorocitosina, ketoconazol, itraconazol, fluconazol, voriconazol y caspofungina empleando el método de microdilución (Documento M27-A3 y M27-S3), con algunas modificaciones: tiempo de cultivo en medio de Sabouraud dextrosa agar (7-10 días), medio RPMI 1640 suplementado con glucosa al 2%, tiempo de incubación (7, 8 y 18 días). La sensibilidad *in vitro* fue variable; la mayoría de los aislados de *Paracoccidioides* fueron sensibles a ketoconazol (73,7%), seguido de voriconazol (68,4%), itraconazol (63,1%), anfotericina B (52,6%), fluconazol (47,4%), 5-fluorocitosina (42,1%) y caspofungina (5%). La resistencia global fue mayor ante caspofungina (94,7%), seguido de 5-fluorocitosina (52,6%) and anfotericina B (47,4%). El 53% de los aislados fue sensible dosis dependiente a fluconazol, 15,7%, itraconazol y 5,3% a 5-fluorocitosina. Anfotericina B, itraconazol y voriconazol fueron los antifúngicos más potentes contra *Paracoccidioides spp* (CMI: 0,03-1 µg/mL). Basándose en estos resultados, se propone tentativamente un protocolo de ensayo de microdilución para las pruebas de sensibilidad de *Paracoccidioides spp* frente a fármacos antimicóticos. Esta metodología podría ser clínicamente útil para predecir el desarrollo de resistencias, aunque son necesarios más estudios.

In vitro susceptibility of isolates of *Paracoccidioides* spp complex to systemic antifungals using the microdilution method.

Invest Clin 2015; 56(3): 243 - 253

Keywords: Antifungal susceptibility; itraconazole; microdilution; *Paracoccidioides* spp complex; voriconazole.

Abstract. Broth microdilution, the reference method recommended by the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), is not available for use with dimorphic fungi, such as those of the *Paracoccidioides* genus. In this work, *in vitro* susceptibility of the *Paracoccidioides* complex (n=19) to systemic antifungals: amphotericin B, 5-flucytosine, ketoconazole, itraconazole, fluconazole, voriconazole and caspofungin, was evaluated using the microdilution method (Document M27-A3, M27-S3), with some modifications such as: culture time in Sabouraud dextrose agar (7-10 days), RPMI 1640 medium supplemented with 2% glucose and the incubation time (7, 8 and 18 days). The sensitivity *in vitro* was variable; the majority of *Paracoccidioides* isolates was susceptible to ketoconazol (73.7%), followed by voriconazole (68.4%), itraconazole (63.1%), amphotericin B (52.6%), fluconazole (47.4%), 5-flucytosine (42.1%) and caspofungin (5%). The overall resistance was mainly to caspofungin (94.7%), followed by 5-flucytosine (52.6%) and amphotericin B (47.4%). Fifty-three percent of the isolates were susceptible-dose dependent to fluconazole followed by itraconazole (15.7%) and 5-fluorocytosine (5.3%). Amphotericin B, itraconazole and voriconazole were the most potent antifungal drugs against *Paracoccidioides* spp (CMI: 0.03-1µg/mL). Based on these results, we tentatively propose a microdilution assay protocol for susceptibility testing of *Paracoccidioides* spp to antifungal drugs. This method may be clinically useful to predict resistance, even though further studies are needed.

Recibido: 23-06-2014 *Aceptado:* 26-03-2015

INTRODUCCIÓN

El Complejo *Paracoccidioides brasiliensis* (especies crípticas S1, PS2, PS3) y *Paracoccidioides lutzii* son hongos dimórficos y agentes etiológicos de la Paracoccidioidomicosis (PCM), enfermedad granulomatosa, sistémica, con múltiples formas de presentación clínica, de evolución crónica y con altas tasas de morbilidad; endémica en los países de América Latina, desde el sur de México hasta la Argentina (1-5). La PCM en América Latina, representa un problema importante de salud pública en Brasil, Colombia, Venezuela, Ecuador y Argentina. Se considera que en Brasil, Colombia y Venezuela el 10% de la población se ha infectado en algún momento de su vida (1, 5-7).

Actualmente, varias drogas están disponibles para el tratamiento de PCM, tales como los azoles, trimetoprim sulfametoxazol y anfotericina B, los cuales han presentado buena actividad y algunos efectos colaterales (6, 8-10). El análisis de sensibilidad *in vitro* del género *Paracoccidioides* a los diferentes antifúngicos sistémicos muestra discrepancias atribuidas a la diversidad de técnicas empleadas en los distintos estudios y a los diferentes puntos de interpretación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) (11-23).

La mayoría de los estudios publicados hasta ahora han empleado diversas metodologías de sensibilidad *in vitro* para este hongo, y pocos han empleado el método de microdilución (19,

23) recomendado por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorios (CLSI) o métodos alternativos (microplacas alamar Blue) (22).

Hasta ahora, ningún Documento del CLSI incluye el estudio de susceptibilidad *in vitro* de hongos dimórficos como el género *Paracoccidioides* a diferentes fármacos, debido a la dificultad en el cultivo; sin embargo, es importante emplear el método recomendado por CLSI para pruebas *in vitro* para facilitar la definición de parámetros de control de calidad y la interpretación de los puntos de cortes.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la sensibilidad *in vitro* del género *Paracoccidioides* a los antifúngicos sistémicos: anfotericina B, 5-fluorocitosina, ketoconazol, itraconazol, fluconazol, voriconazol y caspofungina mediante el método de microdilución en medio líquido recomendado por el CLSI (Documento M27-A3 y M27-S3 con algunas modificaciones (24,25).

MATERIAL Y MÉTODOS

Aislados

Se emplearon 17 aislados clínicos: Pb305, Pb6182, Pb309, Pb307, Pb673, Pb9369, Pb9551, Pb207, Pb10556, Pb9103, Pb1237, Pb 10107, Pb 9299, Pb 106, Pb9570, Pb 9570, Pb7987 y 2 aislados ambientales de *Paracoccidioides spp* (Pb300, PbT2). Todos los aislados fueron obtenidos e identificados en el Laboratorio de Micología, Instituto de Biomedicina, mediante métodos convencionales de micromorfología, crecimiento a temperatura ambiente y 37°C (dimorfismo), para comprobar su pureza y viabilidad. Sólo aislados Pb300, Pb305, Pb309 y Pb307 han sido identificados a nivel molecular (26,27) correspondiendo todos a la especie *P. brasiliensis*.

Los aislados fueron cultivados en agar Sabouraud tiamina asparagina a 35°C $\pm$ 2°C y sub-cultivados en Sabouraud dextrosa agar (Difco, Detroit, Mich, USA) a 35°C $\pm$ 2°C, 7-10 días antes del estudio de sensibilidad *in vitro*.

Agentes antifúngicos

Se emplearon los siguientes antifúngicos: anfotericina B (Bristol-Myers Squibb), ketoconazol (Esteve Química, Barcelona, España), itraconazol (Janssen Research Foundation, Beerse, Belgium), fluconazol (Pfizer, España), 5-fluorocitosina (Sigma Chemical Company St. Louis, Mo USA), voriconazol (Pfizer) y caspofungina (Merck). Todos los antifúngicos fueron almacenados en oscuridad a 8°C, hasta su empleo.

Los antifúngicos se disolvieron siguiendo las recomendaciones del CLSI, Documento M27A3 y M27-S3, empleándose los siguientes rangos de concentraciones: anfotericina B: 0,0313-16 μ g/mL, 5-fluorocitosina: 0,125-64 μ g/mL, ketoconazol: 0,0313-16 μ g/mL, fluconazol: 0,125-64 μ g/mL, itraconazol: 0,0313-16 μ g/mL, voriconazol: 0,0313 a 16 μ g/mL y caspofungina de 0,015 a 8 μ g/mL. Se dispensaron en placas las cuales posteriormente fueron envueltas con papel de aluminio y almacenadas a -20°C hasta su utilización. Estos fueron probados en una misma unidad estándar de actividad.

Estudios de susceptibilidad a antifúngicos

Se utilizó la metodología de microdilución en caldo (según el CLSI Documento M27-A3 y M27-S3) (24,25) con algunas modificaciones, según se explica a continuación: se empleó RPMI 1640 L-glutamina sin bicarbonato sódico, tamponado a pH 7 con buffer MOPS (Sigma), suplementado con 2% de glucosa para las pruebas de microdilución en medio líquido.

Para realizar las pruebas de sensibilidad las cepas de *Paracoccidioides spp* fueron cultivadas de 7-10 días en medio de Sabouraud dextrosa agar, incubadas a 35°C. Luego se preparó una suspensión celular transfiriendo, con un asa bacteriológica estéril, 1-3 colonias de aproximadamente 1 mm de diámetro de cada cultivo de 7-10 días de los diferentes aislados de *Paracoccidioides spp*, a un tubo con 5 mL de solución fisiológica estéril. El contenido de esta suspensión se ajustó por turbidez al patrón 0,5 de McFarland y luego fue medida por

espectrofotometría (75-77 % de transmitancia a 530 nm de longitud de onda), lo que se correspondió a una concentración de 1×10^6 a 5×10^6 células/mL. Esta suspensión se mezcló en vórtex durante 15 segundos, se diluyó 1:000 en medio de RPMI suplementado con glucosa al 2%. Cada pocillo de la placa de microdilución se inoculó con 100 μ L de la correspondiente suspensión del inoculo diluido, para obtener una concentración final del inoculo de $0,5 \times 10^3$ a $2,5 \times 10^3$ células/mL. Las placas de microdilución se incubaron a 35°C, en cámara húmeda sin agitación, durante 18 días y fueron observadas diariamente.

Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado en placas estériles, con tapa de poliestireno, de 96 pocillos con fondo plano. Las lecturas se realizaron con ayuda de un espejo de lectura, y se le asignó a cada pocillo un valor de 0 a 4 usando como referencia el control de crecimiento. También se evaluaron las placas mediante un lector de ELISA (Anthos® 2010) a 405 nm para todos los antifúngicos excepto anfotericina B la cual se midió a 550 nm. El crecimiento de cada pocillo se comparó con el pocillo de control de crecimiento (libre de droga).

Control de calidad:

Se incluyeron las cepas *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) y *Candida krusei* (ATCC 6258) como control (22-27). Las lecturas de las CMI de las cepas controles se realizaron a las 24 y 48 horas de incubación.

Determinación de la CMI

La CMI₅₀ y CMI₉₀ se definieron como la menor concentración del antifúngico que inhibieron el 50% y 90% respectivamente del crecimiento fúngico, comparado con el pocillo de control de crecimiento (sin agente antifúngico) y el control de esterilidad. Aunque los puntos de corte para *Paracoccidioides* spp no se han establecido, se consideraron los puntos de cortes señalados en el Documento CLSI para 5-fluorocitosina: ≤ 4 μ g/mL sensible (S), entre 8 a 16 μ g/mL susceptible dosis dependiente (SDD) y ≥ 32 μ g/mL resistente

(R); ketoconazol: entre 0,03 μ g/mL hasta < 16 μ g/mL S y ≥ 16 μ g/mL R; fluconazol: ≤ 8 μ g/mL S, entre 16 a 32 μ g/mL SDD y > 64 μ g/mL R; voriconazol: ≤ 1 μ g/mL S, 2 μ g/mL SDD, y ≥ 4 μ g/mL R; caspofungina: ≤ 2 μ g/mL S y > 2 μ g/mL R (24,25,28,29). Como no se han establecido puntos de corte para la anfotericina B, se consideró resistente cuando el valor de la CMI fue ≥ 1 μ g/mL.

Análisis estadístico

La media geométrica (Media G) y rangos de las CMI de los diferentes antifúngicos fueron calculados para los aislados del Complejo *Paracoccidioides* spp, así como las CMI₅₀ y la CMI₉₀ para las especies combinadas con la droga.

Se determinó la concordancia entre el método de lectura visual y espectrofotométrico. Para ello, se elaboraron tablas de contingencia, de las cuales se obtuvo el grado de concordancia entre dos pruebas diferentes para una misma población utilizando el índice kappa. El análisis de los datos fue realizado mediante el paquete estadístico SPSS versión 12.0.

RESULTADOS

Un total de 19 cepas fueron evaluadas con los diferentes antifúngicos. El crecimiento de *Paracoccidioides* spp se inició en algunas placas a las 120 horas de incubación. Sin embargo, fue a las 168 horas de incubación cuando, en los pocillos del control de crecimiento, se evidenció buen crecimiento fúngico, razón por la cual la primera lectura se efectuó a los 7 días de incubación y la segunda lectura a las 192 horas (8 días); no se observó variación en la CMI hasta por 18 días.

Existió una buena concordancia de sensibilidad cuando las CMI fueron leídas en forma visual y espectro-fotométricamente a los 7 y 8 días de incubación (Kappa= 0,34 y 0,26). Además, la sensibilidad a los antifúngicos entre la lectura visual y espectrofotométrica durante los distintos tiempos de incubación fue casi perfecta (Kappa=0,95 y 0,94). Por otro lado, las CMI de los diferentes antifúngicos probados con las cepas de referencias estuvieron dentro de los valores esperados.

El promedio de las medias geométricas de la CMI₅₀ y CMI₉₀ para los diferentes aislados de *Paracoccidioides spp* a los antifúngicos anfotericina B, 5-fluorocitosina, ketoconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol y caspofungina obtenidas de los aislados estudiados, se muestran en la Tabla I.

Con relación a la sensibilidad *in vitro* frente a los antifúngicos sistémicos de las diferentes cepas de *Paracoccidioides spp* se encontró que la mayoría de los aislados fueron sensibles a ketoconazol (n=14; 73,7%), voriconazol (n=13; 68,4%), itraconazol (n=12; 63,1%) y anfotericina

B (n=10; 52,6%), siendo el 94,7% resistentes a la caspofungina (n=18), seguido de la 5-fluorocitosina (n=10; 52,6%). y anfotericina B (n=9; 47,4). El 52,6% resultó dosis dependiente al fluconazol (n=10) y al itraconazol (n=3; 15,7%) (Tabla I).

Al comparar las cepas de *P. brasiliensis* de origen clínico (Pb305, Pb307 y Pb309) con el aislado ambiental (Pb300), se demostró que todas fueron sensibles a anfotericina B (0,03 µg/mL), itraconazol (0,03 µg/mL), voriconazol (0,03 µg/mL), ketoconazol (0,5 µg/mL) y fluconazol (2 µg/mL), pero fueron resistentes a caspofungina (3 µg/mL) y 5-fluorocitosina (32 µg/mL).

TABLA I
CONCENTRACIONES MÍNIMAS INHIBITORIAS Y SENSIBILIDAD *IN VITRO* DE 19 AISLADOS DE *Paracoccidioides SPP* FRENTE A LOS ANTIFÚNGICOS SISTÉMICOS

Antifúngico	CMI*	Media Geométrica (µg/mL)	Máximo-Mínimo (µg/mL)	Sensible	SDD**	Resistente
Anfotericina B	50 90	3,27 4,24	0,03-16,00	10 (52,6) ⁺	-	9 (47,4)
5-Fluorocitosina	50 90	9,00 10,16	0,125-32,00	8 (42,1)	1 (5,3)	10 (52,6)
Ketoconazol	50 90	7,24 12,01	0,03-16,00	14 (73,7)	-	5 (26,3)
Fluconazol	50 90	9,23 10,02	0,125-16,00	9 (47,4)	10 (52,6)	-
Itraconazol	50 90	3,43 3,97	0,03-8,00	12 (63,1)	3 (15,7)	4 (21,1)
Voriconazol	50 90	5,81 6,23	0,015-16,00	13 (68,4)	-	6 (31,6)
Caspofungina	50 90	- 6,34	- 0,25-8	- 1(5)		18 (94,7)

*CMI: Concentración Mínima Inhibitoria; **SDD: Susceptible Dosis Dependiente, ⁺: (%).

DISCUSIÓN

En este estudio se han seguido las recomendaciones del documento CLSI M27-A3 y M27-S3 de microdilución, con ciertas modificaciones (24,25). En primer lugar, se utilizó el medio líquido RPMI 1640 suplementado con 2% de glucosa; el tiempo de incubación fue de 7 y 8 días para la primera y segunda lectura de las pruebas respectivamente y, las lecturas se realizaron tanto en forma visual como por espectrofotometría.

Se trabajó con la fase levaduriforme del hongo, debido a que esta es la fase parasitaria y por el menor riesgo que implica su manipulación en el laboratorio.

En cuanto al medio de cultivo, el medio líquido RPMI 1640 suplementado con 2% de glucosa facilita la interpretación de la prueba. Rodríguez-Tudela y Martínez-Suárez (30), han señalado que la adición de 2% de glucosa al medio de cultivo ayuda a leer mejor la CMI de los azoles, por lo que se decidió su empleo. Es de resaltar que se realizaron ensayos preliminares (resultados no mostrados) donde se observó un mejor crecimiento con RPMI + suplementado con 2% de glucosa que RPMI solo.

Por otro lado, Espinel-Ingroff y col. (31,32) propusieron que la adición de glucosa al RPMI/1640 ayuda a examinar mejor los puntos de cortes a los diferentes antifúngicos. Esta modificación puede contribuir a la estandarización de una adecuada metodología para la determinación de las CMI en el estudio de hongos dimórficos, especialmente el Complejo *Paracoccidioides* spp empleando el método de microdilución.

Sin embargo, en cuanto a los medios de cultivos, Cruz y col. (23) describieron que se obtienen mayores CMI al utilizar el medio RPMI que cuando se utiliza los medios de cultivos Mueller-Hilton y McVeigh y Morton. Además, sugieren que con el medio RPMI se puede observar una incompleta transición de levadura-micelio a 37°C.

Con relación al tiempo de incubación, el Complejo *Paracoccidioides* spp, son hongos de

crecimiento lento; varios autores han propuesto diferentes tiempos de incubación para iniciar la lectura de CMI (16, 17, 21). En este trabajo, la temperatura de incubación fue 35°C y se realizó la primera lectura de crecimiento a los 7 días de incubación, tiempo en el cual se evidenció un buen crecimiento en el pozo control. Otros autores proponen que los mejores resultados se obtienen después de 15 días de incubación (21), sin embargo, en este estudio los valores de las CMI no variaron después del día 8 hasta el día 18.

Uno de los primeros estudios de susceptibilidad de *P. brasiliensis* publicado en la literatura fue el realizado por Restrepo y Arango (11), quienes describen la susceptibilidad de *P. brasiliensis* a las sulfas demostrando CMI en sólo el 51,6% de los aislados probados.

Por otro lado, San Blas y col. (14) evaluaron una cepa de *P. brasiliensis* en fase filamentosa y levaduriforme frente a itraconazol, ketoconazol y saperconazol, y demostraron que la fase levaduriforme es más sensible a los azoles que la fase de micelio, observando cambios en la morfología de las membranas, especialmente cuando se emplea saperconazol.

Otros estudios previos (14,33) compararon la susceptibilidad de la fase levaduriforme y la forma micelial en *P. brasiliensis* y encontraron solo pequeñas diferencias, las cuales fueron atribuidas a la variación en la composición de lípidos en las dos fases morfológicas del hongo. Se ha demostrado que la pared de las células levaduriformes en hongos dimórficos como *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum* y *P. brasiliensis* contienen predominantemente α -glucano y solamente pequeñas cantidades de β -glucano, mientras que el β -glucano es abundante en la fase micelial (19).

En este estudio se demuestra la existencia de cepas de *Paracoccidioides* spp resistentes a anfotericina B (n=9; 47,4%), lo que explicaría posiblemente lo señalado en algunas publicaciones donde han descrito fallas terapéuticas con el empleo de la anfotericina B, especialmente con anfotericina liposomal (34).

Con la 5-fluorocitosina se encontró que el 52,6% fue resistente y el 42,1% fue sensible al antifúngico. Posiblemente, emplear la 5-fluorocitosina combinada con otras drogas podría ser de utilidad en el tratamiento de la PCM. Sin embargo, sería interesante realizar estudios de sinergismo y antagonismo a drogas para conocer el valor de su asociación con polienos o azoles.

El ketoconazol fue utilizado en el tratamiento de la PCM a partir de 1978 con eficacia. Se producen más del 90% de remisiones clínicas completas al cabo de un año de administración continua. Los fracasos terapéuticos se han observado en pacientes gastrectomizados o con hipoclorhidria gástrica, en individuos con la forma sub-aguda juvenil con bloqueo de los ganglios mesentéricos y en aquellos que recibían simultáneamente rifampicina por tuberculosis coexistente (35). No obstante, existen escasos estudios que evalúan la sensibilidad de este hongo frente a ketoconazol. En este estudio la mayoría de los aislados fueron sensibles (73,7%) a ketoconazol a diferencia del trabajo de San Blas y col. (14); cabe destacar que el punto de corte empleado en el presente estudio para categorizar un aislado sensible fue $< 16 \mu\text{g}/\text{mL}$.

No se observaron cepas de Complejo *Paracoccidioides spp* resistentes a fluconazol; sin embargo, el 52,6% fueron SDD y el 47,4% sensible. Aun cuando el fluconazol ha sido utilizado en un reducido número de pacientes con PCM, su eficacia, tanto en modelos experimentales animales y en ensayos clínicos, ha sido inferior que el itraconazol (36); quizás sea necesario un incremento de la dosis en aquellos casos donde los aislados del Complejo *Paracoccidioides spp* muestren una sensibilidad dosis dependiente.

Los resultados de las CMI para el itraconazol son similares a los logrados en la mayoría de aislados de *P. brasiliensis* obtenidos por San Blas y col., (14), Heins-Vaccari y col., (33) y Cruz y col., (23), por lo que podría inferirse que el hongo es sensible a esa droga, hecho que respalda el criterio de considerar al itraconazol la droga de elección en el tratamiento de la PCM (6,8,35-37), y que varios estudios han demostrado su

eficacia clínica aun cuando no ha sido posible correlacionar, en términos absolutos, la actividad de la droga con la actividad *in vivo* (16).

En este estudio se ha demostrado que voriconazol *in vitro* es un potente antifúngico contra *Paracoccidioides spp*. Recientemente, se han publicado varios estudios en pacientes tratados con voriconazol con excelente respuesta (38-40) y también en estudios experimentales (41,42).

Por otro lado, Espinel-Ingroff, (43), empleando el método de microdilución en medio líquido, señaló una buena sensibilidad *in vitro* al voriconazol para hongos dimórficos como *H. capsulatum* y *B. dermatitidis*. Estos hallazgos podrían sugerir que voriconazol podría ser la droga de elección de primera línea junto con itraconazol en el tratamiento de la PCM o una alternativa terapéutica en el caso de resistencia a los azoles.

Con relación a la caspofungina, antifúngico que inhibe la actividad de β -1,3-D-glucano sintetasa, se ha mostrado una excelente actividad *in vitro* contra *Candida spp* a excepción de *Candida parapsilosis* y *Candida guilliermondii*, en los cuales se han presentado altas CMI $> 2 \mu\text{g}/\text{mL}$, asociadas a las fallas terapéuticas. En este ensayo se describen en general altas CMI y bajos porcentajes de inhibición, a excepción del aislado Pb207 que fue sensible para voriconazol y caspofungina. La baja efectividad de este antifúngico demostrada en este estudio, puede ser consecuencia de los diferentes porcentajes de β -1,3-glucano que contiene la pared celular de la fase de levadura de los aislados *P. brasiliensis*, como lo describieron San Blas y San Blas (44). Asimismo, se ha demostrado que la caspofungina induce cambios físicos y deterioro en el citoplasma de la fase levaduriforme y micelial del hongo (45).

Por otro lado, Rodero y col. (18), evaluaron 9 aislados de *P. brasiliensis* mediante el método de macrodilución en medio líquido, basándose en el documento del CLSI (1992). Los autores obtuvieron lecturas de CMI similares a los obtenidos en el presente estudio para los aislados

estudiados frente a anfotericina B ($<0,02$ - $0,16$ $\mu\text{g/mL}$), ketoconazol ($0,03$ - $0,31$ $\mu\text{g/mL}$), fluconazol ($1,6$ - $6,2$ $\mu\text{g/mL}$) e itraconazol ($0,31$ - $1,3$ $\mu\text{g/mL}$). Sólo difiere de este estudio, un solo aislado con CMI elevadas de ketoconazol, fluconazol e itraconazol ($1,3$ mg/L , 100 mg/L y 5 mg/L), posiblemente debido a que en el presente trabajo se evaluó un número mayor de aislados del hongo.

En un estudio realizado por Nakai y col., (19), los autores describieron un rango de CMI para 7 aislados de *P. brasiliensis* para los antifúngicos probados (micafungina, anfotericina B, fluconazol e itraconazol), mediante el método de microdilución en medio líquido. Los rangos para la anfotericina B fueron de $0,01$ - $0,25$ $\mu\text{g/mL}$; para el fluconazol entre $0,125$ - $1,0$ $\mu\text{g/mL}$ y para el itraconazol $< 0,01$ $\mu\text{g/mL}$, y encontraron que todas las cepas eran sensibles a los antifúngicos probados, excepto para la micafungina en la cual el hongo mostró resistencia (CMI entre 4 y > 64 $\mu\text{g/mL}$).

En la actualidad se conocen pocos casos de PCM con resistencia *in vivo* a azoles (17, 37, 46, 47). El primer caso señalado en la literatura que correlaciona la sensibilidad *in vivo* / *in vitro* lo describe Hahn y col., (17) en un paciente con PCM multifocal sub-aguda, quien mostró resistencia a ketoconazol y a las sulfas (trimetoprim-sulfametoxazol).

La correlación *in vitro/in vivo* debería ayudar a la interpretación de estos resultados, pero son necesarias condiciones estándares en el ensayo de sensibilidad *in vitro* especialmente para el complejo *Paracoccidioides* spp, y es posible que esta metodología pueda ayudar.

Se desconoce si las diferentes especies del complejo *Paracoccidioides* originan perfiles clínicos distintos con respecto a la severidad de la enfermedad, tropismo a órganos específicos y la susceptibilidad a los diferentes fármacos, tópicos de interés que deben ser investigados. Existen muy pocos estudios que hayan señalado la susceptibilidad de *Paracoccidioides brasiliensis* y *P. lutzii* a diferentes antifúngicos (22).

Finalmente, se necesitan más estudios para comprender la fisiología del hongo y estandarizar

las pruebas de sensibilidad *in vitro* especialmente para el Complejo *Paracoccidioides*, ya que está demostrado que los ensayos de microdilución podría estar influenciado por diferentes factores (21, 23,46, 48).

Por otro lado, este estudio de susceptibilidad *in vitro* a los antifúngicos sistémicos demuestra que el voriconazol tiene una buena actividad contra *P. brasiliensis*, seguido del itraconazol, incluso mejor que con la anfotericina tradicional, mientras que la caspofungina mostró una baja efectividad. La anfotericina B, itraconazol y voriconazol fueron los antifúngicos más potentes contra *Paracoccidioides* spp.

Aunque son necesarios más estudios para evaluar la utilidad de esta metodología frente a especies de *Paracoccidioides*, este método puede ser clínicamente útil para predecir el desarrollo de resistencias.

REFERENCIAS

1. Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. Clin Microbiol Rev 1993; 6(2):89-117.
2. Visbal G, San Blas G, Murgich J, Franco H. *Paracoccidioides brasiliensis*, Paracoccidioidomycosis, and antifungal antibiotics. Curr Targets Disorders 2005; 5:211-226.
3. Van Damme PA, Bierenbroodspot F, Telgtt DS, Kwakman JM, De Wilde PC, Meis JF. A case of imported paracoccidioidomycosis: an awkward infection in The Netherlands. Med Mycol 2006; 44:13-18.
4. Teixeira MM, Theodoro RC, de Carvalho MJ, Fernandes L, Paes HC, Hahn RC, Mendoza L, Bagagli E, San-Blas G, Felipe MS. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. Mol. Phylogenet. Evol 2009; 52:273-283.
5. Bagagli E, Theodoro RC, Bosco SM, McEwen JG. *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. Mycopathologia 2008; 165:197-207.
6. Restrepo A. Treatment of tropical mycoses. J Am Acad Dermatol 1994; 31:91-102.

7. Calle D, Rosero DS, Orozco LC, Camargo D, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis in Colombia: an ecological study. *Epidemiol Infect* 2001; 126:309-315.
8. Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho Fde Q, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML. Guidelines in paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006; 39:297-310.
9. Marques SA. Paracocci-dioidomycosis. *Clin Dermatol* 2012; 30(6):610-615.
10. Bocca AL, Amaral AC, Teixeira MM, Sato PK, Shikanai-Yasuda MA, Soares Felipe MS. Paracoccidioidomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. *Future Microbiol* 2013; 8:1177-1191.
11. Restrepo A, Arango MD. *In vitro* susceptibility testing of *Paracoccidioides brasiliensis* to sulfonamides. *Antimicrob Agents Chemother* 1980; 18:190-194.
12. Stevens DA, Vo PT. Synergistic interaction of trimethoprim and sulfamethoxazole on *Paracoccidioides brasiliensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1982; 21:852-854.
13. Restrepo A, Tabares C de B. *In vitro* susceptibility of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast form to antifungal agents. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1984; 26:322-328.
14. San Blas G, Calcagno AM, San Blas F. A preliminary study of *in vitro* antibiotic activity of saperconazole and other azoles on *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet* 1993; 31:169-174.
15. McGinnis MR, Pasarell L, Sutton DA, Fothergill AW, Cooper CR Jr, Rinaldi MG. *In vitro* evaluation of voriconazole against some clinically important fungi. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:1832-1834.
16. Hahn RC, Hamdan JS. *In vitro* susceptibilities of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast form to antifungal drugs. *Mycoses* 2000; 43:403-407.
17. Hahn RC, Morato Conceicao YT, Santos NL, Ferreira JF, Hamdan JS. Disseminated paracoccidioidomycosis: correlation between clinical and *in vitro* resistance to ketoconazole and trimethoprim sulphamethoxazole. *Mycoses* 2003; 46:342-347.
18. Rodero L, Canteros CE, Rivas C, Lee W, Davel G. *In vitro* sensitivity of *Paracoccidioides brasiliensis* to systemically used antifungal agents. *Rev Argent Microbiol* 1999; 31:78-81.
19. Nakai T, Uno J, Ikeda F, Tawara S, Nishimura K, Miyaji M. *In vitro* antifungal activity of Micafungin (FK463) against dimorphic fungi: comparison of yeast-like and mycelial forms. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:1376-1381.
20. Hahn RC, Fontes CJ, Batista RD, Hamdan JS. *In vitro* comparison of activities of terbinafine and itraconazole against *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol* 2002; 40:2828-2831.
21. Cruz RC, Werneck MC, Oliveira CS, Santos PC, Soares M, Santos DA, Cisalpino PS. Influence of different media, incubation times, and temperatures for determining the MICs of seven antifungal agents against *Paracoccidioides brasiliensis* by microdilution. *J Clin Microbiol* 2012; 51:436-443.
22. De Paula e Silva AC, Oliveira HC, Silva JF, Sangalli-Leite F, Scorzoni L, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJ. Microplate alamar Blue assay r *Paracoccidioides* susceptibility testing. *J Clin Microbiol* 2013; 51:1250-1252.
23. Cruz RC, Werneck SM, Oliveira CS, Santos PC, Soares BM, Santos DA, Cisalpino PS. Influence of different media, incubation times, and temperatures for determining the MICs of seven antifungal agents against *Paracoccidioides brasiliensis* by microdilution. *J Clin Microbiol* 2013; 51:43.
24. Clinical Laboratory Standards Institute. Reference method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved standard, 3rd ed. M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa. 2008.
25. Clinical Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Third Informational Supplement. CLSI document M27-S3. Wayne, Pennsylvania, USA, 2008.
26. Carrero LL, Niño-Vega G, Teixeira MM, Carvalho MJ, Soares CM, Pereira M, Jesuino RS, McEwen JG, Mendoza L, Taylor JW, Felipe MS, San-Blas G. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. *Fungal Genet Biol* 2008; 45:605-612.

27. **Matute DR, McEwen JG, Puccia R, Montes BA, San-Blas G, Bagagli E, Rauscher JT, Restrepo A, Morais F, Niño-Vega G, Taylor JW.** Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol* 2006; 23(1):65-73.
28. **Pfaller MA, Diekema DJ, Rex JH, Espinel-Ingroff A, Johnson EM, Andes D, Chaturvedi V, Ghannoum MA, Odds FC, Rinaldi MG, Sheehan DJ, Troke P, Walsh TJ, Warnock DW.** Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against voriconazole: analysis and proposal for interpretive breakpoints. *J Clin Microbiol* 2006; 44:819-826.
29. **Pfaller MA, Diekema DJ, Ostrosky-Zeichner L, Rex JH, Alexander BD, Andes D, Brown SD, Chaturvedi V, Ghannoum MA, Knapp CC, Sheehan DJ, Walsh TJ.** Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against caspofungin, anidulafungin, and micafungin: analysis and proposal for interpretive MIC breakpoints. *J Clin Microbiol* 2008; 46:2620-2629.
30. **Rodríguez-Tudela JL, Martínez-Suárez JV.** Fluconazole and amphotericin B antifungal susceptibility testing by National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method compared with E-test and semiautomated broth microdilution test. *J Clin Microbiol* 1997; 35:336-337.
31. **Espinel-Ingroff A.** Comparison of the E-test with the NCCLS M38-P method for antifungal susceptibility testing of common and emerging pathogenic filamentous fungi. *J Clin Microbiol* 2001;39:1360-1367.
32. **Espinel-Ingroff A, Barchiesi F, Cuenca-Estrella M, Pfaller MA, Rinaldi M, Rodríguez-Tudela JL, Verweij PE.** International and multicenter comparison of EUCAST and CLSI M27-A2 broth microdilution methods for testing susceptibilities of *Candida* spp. to fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. *J Clin Microbiol* 2005; 43:3884-3889.
33. **Heins-Vaccari EM, Melo NT, Lacaz CS, Pereira AD, del negro G.** Aço *in vitro* do itraconazol (R-51211) sobre *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum* var *capsulatum* e *Histoplasma capsulatum* var *duboisii*. *Ann Bras Dermatol* 1988; 63:299-302.
34. **Dietze R, Fowler VG Jr, Steiner TS, Pecanha PM, Corey GR.** Failure of amphotericin B colloidal dispersion in the treatment of paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60:837-839.
35. **Negroni R.** Tratamiento actual de las micosis sistémicas endémicas. *Rev Iberoam Micol* 1996; 13: S44-S50.
36. **Negroni R, Elías Costa MRI de, Finquelevich JL, Agorio IL, Tiraboschi IN.** Comparative trials of three triazole in treatment of experimental paracoccidioidomycosis in rats. *Rev Iberoam Micol* 1991; 8:8-12.
37. **Yasuda MA.** Pharmacological management of paracoccidioidomycosis. *Expert Opin Pharmacother* 2005; 6:385-397.
38. **Queiroz-Telles F, Goldani LZ, Schlamm HT, Goodrich JM, Espinel-Ingroff A, Shikanai-Yasuda MA.** An open-label comparative pilot study of oral voriconazole and itraconazole for long-term treatment of paracoccidioidomycosis. *Clin Infect Dis* 2007; 45:1462-1469.
39. **Laties AM, Fraunfelder FT, Tomaszewski K, Goodrich J, Moreira AT, Sato MT, de Queiroz-Telles F.** Long-term visual safety of voriconazole in adult patients with paracoccidioidomycosis. *Clin Ther* 2010; 32:2207-2217.
40. **Mayr A, Kirchmair M, Rainer J, Rossi R, Kreczy A, Tintelnot K, Dierich MP, Lass-Flörl C.** Chronic paracoccidioidomycosis in a female patient in Austria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23:916-919.
41. **Kappe R.** Antifungal activity of the new azole UK-109, 496 (voriconazole). *Mycoses* 1999; 42 (Suppl 2):83-86.
42. **Granzoto DS, Vitali LH, Martinez R.** Efficacy of voriconazole in experimental rat paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop* 2013; 46:79-83.
43. **Espinel-Ingroff A.** *In vitro* activity of the new triazole voriconazole (UK-109,496) against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and common and emerging yeast pathogens. *J Clin Microbiol* 1998; 36:198-202.
44. **San Blas G, San Blas F.** Variability of the cell wall structure of *Paracoccidioides brasiliensis* a study of two strains. *Sabouraudia* 1982; 20: 31-40.
45. **Rodríguez-Brito S, Niño-Vega G, San-Blas G.** Caspofungin affects growth of *Paracoccidioides*

- brasiliensis* in both morphological phases. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54:5391-5394.
46. **Shikanai-Yasuda MA, Benard G, Higaki Y, Del Negro GM, Hoo S, Vaccari EH, Gryschek RC, Segurado AA, Barone AA, Andrade DR.** Randomized trial with itraconazole, ketoconazole and sulfadiazine in paracoccidioidomycosis. Med Mycol 2002; 40:411-417.
47. **Manns BJ, Baylis BW, Urbanski SJ, Gibb AP, Rabin HR.** Paracoccidioidomycosis: case report and review. Clin Infect Dis 1996; 23:1026-1032.
48. **Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Hollis RJ, Diekema DJ.** *In vitro* susceptibility testing of filamentous fungi: comparison of E-test and reference M38-A microdilution methods for determining posaconazole MICs. Diagn Microbiol Infect Dis 2003; 45: 241-244.