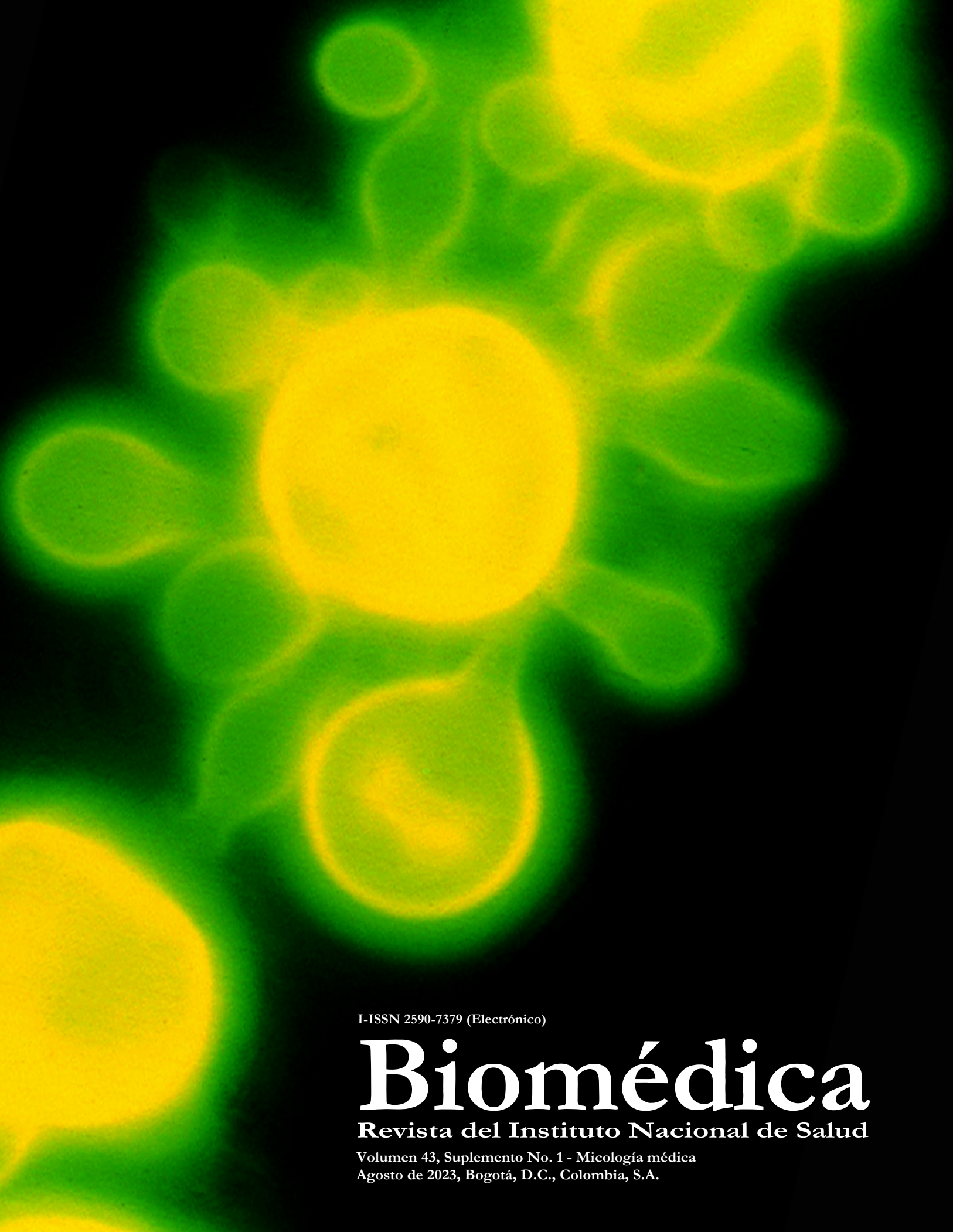


I-ISSN 2590-7379 (Electrónico)

Biomédica

Revista del Instituto Nacional de Salud

Volumen 43, Suplemento No. 1 - Micología médica
Agosto de 2023, Bogotá, D.C., Colombia, S.A.

Portada: *Paracoccidioides brasiliensis*, levaduras, calcoflúor, 1.000X

Microscopio de fluorescencia, Grupo de Micología Médica, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Myrtha Arango-Arteaga (q.e.p.d.)

Biomédica Instituto Nacional de Salud

Volumen 43, Suplemento No. 1 - Bogotá, D.C., Colombia - Agosto de 2023

Editoras Invitadas

Beatriz L. Gómez
Universidad del Rosario
Bogotá, D.C., Colombia

Patricia Escandón
Instituto Nacional de Salud
Bogotá, D.C., Colombia

Comité Editorial

Editores

Luis Alberto Gómez
Instituto Nacional de Salud
Bogotá, D.C., Colombia

Carlos Arturo Hernández
Instituto Nacional de Salud
Bogotá, D.C., Colombia

Rubén Santiago Nicholls
Organización Panamericana de la Salud
Washington, D.C., Estados Unidos

Editores Asociados

Enrique Ardila
Academia Nacional de Medicina
Bogotá, D.C., Colombia

Julián Alfredo Fernández-Niño
Bloomberg Schoool of Public Health Johns Hopkins University
Baltimore, MD, Estados Unidos

José Moreno-Montoya
Fundación Santa Fe de Bogotá
Bogotá, D.C., Colombia

Leonard Munstermann
Yale University School of Medicine
New Haven, CT, Estados Unidos

Erika Santamaría
Instituto Nacional de Salud
Bogotá, D.C., Colombia

Omar Segura
Federación Médica Colombiana
Bogotá, D.C., Colombia

Orlando Torres-Fernández
Instituto Nacional de Salud
Bogotá, D.C., Colombia

Magdalena Wiesner
Instituto Nacional de Salud
Bogotá, D.C., Colombia

Comité Científico

Arnoldo Barbosa
Universidad del Tolima
Ibagué, Colombia

Antonio Bermúdez
Instituto Nacional de Salud
Bogotá, D.C., Colombia

Jorge H. Botero
Universidad de Antioquia
Medellín, Colombia

Gustavo Alonso Cabrera
Universidad de Antioquia
Medellín, Colombia

Víctor Cárdenas
University of Arkansas
Little Rock, AK, Estados Unidos

Alberto Concha-Eastman
Guatapé, Colombia

Zoilo Cuéllar
Academia Nacional de Medicina
Bogotá, D.C., Colombia

Luis Gabriel Cuervo
Organización Panamericana de la Salud
Washington, D.C., Estados Unidos

Patricia del Portillo
Corpogén
Bogotá, D.C., Colombia

Andrés de Francisco
Organización Panamericana de la Salud
Washington, D.C., Estados Unidos

Fernando De la Hoz
Universidad Nacional de Colombia
Bogotá, D.C., Colombia

José Luis Di Fabio
Organización Panamericana de la Salud
Washington, D.C., Estados Unidos

Jorge Hernando Donado
Universidad Pontificia Bolivariana
Medellín, Colombia

Carlos Andrés Fandiño
Universidad del Valle
Cali, Colombia

José Figueroa
World Health Organization
Ginebra, Suiza

Luis Fernando García
Universidad de Antioquia
Medellín, Colombia

Alberto Gómez
Pontificia Universidad Javeriana
Bogotá, D.C., Colombia

Enrique González
University of Texas Health Science Center at San Antonio
San Antonio, TX, Estados Unidos

John Mario González
Universidad de los Andes
Bogotá, D.C., Colombia

Felipe Guhl
Universidad de los Andes
Bogotá, D.C., Colombia

Antonio Iglesias
Universidad Nacional de Colombia
Bogotá, D.C., Colombia

Jorge Jara
Organización Panamericana de la Salud
Washington, D.C., Estados Unidos

Ernesto Jaramillo
Organización Mundial de la Salud
Ginebra, Suiza

Marcelo Labruna
Universidade de São Paulo
São Paulo, Brasil

Jairo Lizarazo
Hospital Universitario Erasmo Meoz
Cúcuta, Colombia

Juan Guillermo McEwen
Corporación para Investigaciones Biológicas
Medellín, Colombia

Roberto Mendoza
The Hospital for Sick Children
Toronto, Ontario, Canada

Ricardo Negroni
Hospital de Infecciosas
Francisco Javier Muñiz
Buenos Aires, Argentina

María Teresa Ochoa
University of California Los Ángeles
Los Ángeles, CA, Estados Unidos

Juan P. Olano
University of Texas Medical Branch
Galveston, TX, Estados Unidos

Blanca Restrepo
University of Texas
Brownsville, TX, Estados Unidos

Gerzaín Rodríguez
Investigador Emérito
Instituto Nacional de Salud
Universidad de La Sabana
Bogotá, D.C., Colombia

Víctor E. Reyes
University of Texas Medical Branch
Galveston, TX, Estados Unidos

Gustavo C. Román
Methodist Neurological Institute
Houston, TX, Estados Unidos

Pedro Romero
Ludwig Center for Cancer Research
University of Lausanne
Lausana, Suiza

Álvaro Ruiz
Pontificia Universidad Javeriana
Bogotá, D.C., Colombia

Gioconda San Blas
Instituto Venezolano de
Investigaciones Científicas
Caracas, Venezuela

Álvaro Sanabria
Hospital Pablo Tobón Uribe
Medellín, Colombia
Universidad de La Sabana
Chía, Colombia

Ricardo Sánchez
Universidad Nacional de Colombia
Bogotá, D.C., Colombia

Nancy Gore Saravia
Centro Internacional de Entrenamiento
e Investigaciones Médicas
Cali, Colombia

Robert Tesh
University of Texas
Galveston, TX, Estados Unidos

Bruno Travi
University of Texas
Galveston, TX, Estados Unidos

Gustavo Valbuena
University of Texas
Galveston, TX, Estados Unidos

Juan Miguel Villalobos
Universidade Federal de Rondônia
Porto Velho, Brasil

Moisés Wasserman
Investigador Emérito
Instituto Nacional de Salud
Universidad Nacional de Colombia
Bogotá, D.C., Colombia

Carlos Arturo Hernández	Linda Grace Molano	Diana A. Londoño	Elizabeth Guzmán	Luz Ángela Salgado
Edición y corrección de estilo	Asistencia editorial	Corrección de estilo	Mercadeo digital	Diagramación

© Instituto Nacional de Salud

La revista *Biomédica* del Instituto Nacional de Salud es una publicación trimestral, eminentemente científica. Está amparada por la resolución número 003768 de 1981, emanada del Ministerio de Gobierno, y con tarifa postal reducida según resolución número 1128 del 5 de mayo de 1982.

Ninguna publicación, nacional o extranjera, podrá reproducir ni traducir sus artículos ni sus resúmenes sin previa autorización escrita del editor. Ni la revista, ni el Instituto asumen responsabilidad alguna por los puntos de vista expresados por los autores. La revista no publicará ningún tipo de propaganda comercial. Los nombres de equipos, materiales y productos manufacturados que eventualmente puedan mencionarse, no implican recomendación ni propaganda para su uso y sólo se mencionan como identificación genérica.

La revista *Biomédica* aparece reseñada en *Index Medicus*/*Medline de la National Library of Medicine,* en el *Science Citation Index Expanded (also known as SciSearch®)* y *Journal Citation Reports*/*Science Edition de Thomson Scientific,* en SciELO Colombia *(Scientific Electronic Library Online)*, en el índice de la *Literatura Latinoamericana en Ciencias de la Salud* (LILACS), en la Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal *(*RedAlyC*)*, en el *Índice Mexicano de Revistas Biomédicas Latinoamericanas* (Imbiomed), en *Scopus* de Elsevier B.V., en el *Sistema de Información Bibliográfica Regional Andina (*SIBRA*)*, en *CAB Abstracts, Review of Medical and Veterinary Entomology*, y forma parte del *Índice Nacional de Publicaciones Seriadas Científicas y Tecnológicas Colombianas* de Colciencias y del *Índice Latinoamericano de Revistas Científicas y Tecnológicas* (LATINDEX).

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
Avenida Calle 26 No. 51-20
Apartado aéreo 80334 y 80080
Bogotá, D.C., Colombia, S.A.

URL: http://www.ins.gov.co
biomedica@ins.gov.co

Contenido

In memoriam

Ángela Restrepo Moreno
Beatriz L. Gómez 7

Editorial

Las infecciones fúngicas: una amenaza creciente
Beatriz L. Gómez, Patricia Escandón 11

Educación continua

Haga usted el diagnóstico - Primera parte
Yenny Ariza, Cristian Leonardo Cubides, Daniel Alejandro Cubillos, Carmen Lucía Roa, José Camilo Álvarez, Sonia Isabel Cuervo-Maldonado 17

Presentación de caso

La importancia de la correlación clínica y epidemiológica en el diagnóstico temprano de la histoplasmosis: reporte de dos casos clínicos en Popayán, Colombia
Jorge Andrés Potosí, Yina Marcela Gutiérrez, Fabiola Eugenia González 20

Geotricosis: fungemia en paciente con leucemia linfoblástica aguda
José Camilo Álvarez-Rodríguez, María Paula Blanco-Bustos, Sonia Isabel Cuervo-Maldonado, Julio César Gómez-Rincón, Ángela Reyes 32

Fusariosis en pacientes con cáncer: serie de 13 casos y revisión de la literatura
Sonia Isabel Cuervo-Maldonado, José Camilo Álvarez-Rodríguez, Cristian Leonardo Cubides, Juan Camilo Barrera, Juan Diego Montañez-Abril, Erika Paola Vergara-Vela, Carlos Humberto Saavedra-Trujillo, María José López-Mora, Gloria Elena Mora-Figueroa, Adriana Celis-Ramírez, Rose Mary Jaramillo-Calle, Rafael Parra-Medina 41

Brote de *tinea capitis* tricofítica en un grupo de niños escolares en un área rural del departamento del Cauca, Colombia
Fabiola Eugenia González, José Alejandro Rodríguez, Lina María Muñoz, Giovanny Apráez, Luis Reinel Vásquez 57

Hiperplasia pseudoepiteliomatosa: carcinoma escamocelular versus paracoccidioidomicosis oral, un caso con mirada dermatológica
Lina M. Osorio-Cock, Sandra Catalina Jaramillo-Pulgarín, Alba P. Ferrín-Bastidas, Diana Y. Molina-Colorado, Óscar M. Gómez-Guzmán, Alejandra Zuluaga, Juan G. McEwen-Ochoa, Martha E. Urán-Jiménez, María del Pilar Jiménez-Alzate 68

Artículo original

Evaluación de la formación de biopelículas en aislamientos bacterianos y fúngicos por el método semicuantitativo de microtitulación con cristal violeta y el cualitativo de agar con rojo Congo
Xiomara Moreno, Melanie Ventura, María Mercedes Panizo, María Fátima Garcés 77

Actividad de fosfolipasas y proteasas en aislamientos de especies de *Candida* colonizadoras y causantes de vulvovaginitis en mujeres gestantes
Martha Puello, Gregorio Young, Paola Suárez 89

Candidiasis oral mixta en pacientes con diabetes de tipo 2: identificación y espectro de sensibilidad
Javier Araiza, Valentín Sánchez-Pedraza, Ana Karen Carrillo, Denise Fernández- Samar, Jazmín Tejeda, Alexandro Bonifaz 97

Esporotricosis en Argentina: análisis clínico y epidemiológico
Gabriela Santiso, Fernando Messina, Alicia Arechavala, Emmanuel Marín, María de las Mercedes Romero, María de los Ángeles Sosa, Florencia Rojas, Javier Mussin, Sonia Contreras, Viviana Galache, María Guerrero, Vanesa Sosa, Yone Chacón, Christian Álvarez, Ivana Maldonado, Mercedes Romero, Sofía Echazarreta, Norma Fernández, Silvia Relloso, Julián Serrano, Gustavo Giusiano 109

Sensibilidad *in vitro* a antifúngicos de aislamientos de *Malassezia furfur* de pacientes positivos y negativos para HIV
Kevin Ehemann, Andrés Contreras, Adriana Marcela Celis-Ramírez 120

Diagnóstico micológico de paracoccidioidomicosis en un hospital de área no endémica: metodología clásica y molecular
Norma B. Fernández, Adriana Toranzo, Luciana Farias, Cristina E. Canteros 132

Expresión de los genes *ERG11*, *ERG3*, *MDR1* y *CDR1* en *Candida tropicalis*
Ana Elisa Rojas, Leidy Yurany Cárdenas, María Camila García, Jorge Enrique Pérez 144

Evaluación *in vitro* y QSAR (*Quantitative and Structure-Activity Relationship*) de la actividad antifúngica de terpenoides obtenidos de aceites esenciales frente a *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*
Sergio Andrade-Ochoa, Daniela Sánchez-Aldana, Luz María Rodríguez-Valdez, Guadalupe Virginia Nevárez-Moorillón 156

Protocolo rápido y económico para la producción de antígenos de *Paracoccidioides* spp.
Karolina Rosa Fernandes-Beraldo, Roseli Santos de Freitas-Xavier, Adriana Pardini Vicentini 170

Descripción de la micobiota de los tubos endotraqueales de pacientes de unidad de cuidados intensivos en Bogotá, Colombia
Mónica Gabriela Huertas, Miguel Rodríguez, Patricia Castro, Sergio Danilo Cruz, Érika Alejandra Cifuentes, Andrés Felipe Yepes, María Mercedes Zambrano, Ana Margarita Baldión..... 181

Tipificación bioquímica y evaluación de la patogenicidad de aislamientos vulvovaginales del complejo *Candida albicans*
Soraya Morales-López, Keiner Ustate, Zulay Pedrozo, Yulibeth Torres Pedrozo..... 194

Criptococosis meníngea e infección por SARS-CoV-2 en personas con VIH/SIDA
Fernando Antonio Messina, Andrés Benchetrit, Andrea Bocassi, María de las Mercedes Romero, Sofía Bauer, Emmanuel Marín, Facundo Bertera, Guillermo Onis, Matías Enzenhofer, Milagro Sánchez, Lilia Mammana, Dana Mijalovsky, Gabriela Santiso..... 206

Caracterización fenotípica y genotípica de aislamientos clínicos colombianos de *Sporothrix* spp.
Laura C. Álvarez-Acevedo, María C. Zuleta-González, Óscar M. Gómez-Guzmán, Álvaro L. Rúa-Giraldo, Orville Hernández-Ruiz, Juan G. McEwen-Ochoa, Martha E. Urán-Jiménez, Myrtha Arango-Arteaga†, Rosely M. Zancopé-Oliveira, Manoel Marques Evangelista de Oliveira, María del P. Jiménez-Alzate..... 216

Validación de la metodología para cuantificar el fluconazol y sus impurezas orgánicas en materia prima por cromatografía líquida de alta resolución
James Alexander Castillo, Natalia Afanasjeva..... 229

Brote de *tinea capitis* y otras micosis superficiales en una comunidad urbana de Medellín
Nelson Andrés Sterling, Dubán Andrés Rincón, Sebastián Barrera, Erika Andrea Sánchez, Diana Yuledi Molina, Martha Eugenia Urán, María del Pilar Jiménez..... 245

Desafío diagnóstico: PCR anidada y en tiempo real frente a un sistema de puntuación en individuos con gran riesgo de neumonía por *Pneumocystis jirovecii*
Fernando Almeida-Silva, Rodrigo Almeida-Paes, Lisandra Serra-Damasceno, Edwiges Motta-Santos, Luiz Claudio Ferreira, Leonardo Pereira-Quintella, Marcela de Faria Ferreira, Mauro de Medeiros-Muniz, Rosely M. Zancopé-Oliveira..... 255

Revisión de tema

Micología de desastres
Daniel F. Q. Smith, Arturo Casadevall..... 267

Candida auris: un agente patógeno global que se ha arraigado en Colombia
Patricia Escandón, Shawn R. Lockhart, Nancy A. Chow, Tom M. Chiller..... 278

Taxonomía de los hongos: un rompecabezas al que le faltan muchas piezas
Álvaro León Rúa-Giraldo..... 288

Educación continua

Haga usted el diagnóstico - Segunda parte
Yenny Ariza, Cristian Leonardo Cubides, Daniel Alejandro Cubillos, Carmen Lucía Roa, José Camilo Álvarez, Sonia Isabel Cuervo-Maldonado 312

Contents

In memoriam

Ángela Restrepo Moreno
Beatriz L. Gómez 7

Editorial

Fungal infections: A growing threat
Beatriz L. Gómez, Patricia Escandón 11

Continuing education

Make the diagnosis - First part
Yenny Ariza, Cristian Leonardo Cubides, Daniel Alejandro Cubillos, Carmen Lucía Roa, José Camilo Álvarez, Sonia Isabel Cuervo-Maldonado 17

Case presentation

The relevance of clinical and epidemiological correlation in the early diagnosis of histoplasmosis: Report of two clinical cases in Popayán, Colombia
Jorge Andrés Potosí, Yina Marcela Gutiérrez, Fabiola Eugenia González 20

Geotrichosis: fungemia in a patient with acute lymphoblastic leukemia
José Camilo Álvarez-Rodríguez, María Paula Blanco-Bustos, Sonia Isabel Cuervo-Maldonado, Julio César Gómez-Rincón, Ángela Reyes 32

Fusariosis in cancer patients: 13 case series report and literature review
Sonia Isabel Cuervo-Maldonado, José Camilo Álvarez-Rodríguez, Cristian Leonardo Cubides, Juan Camilo Barrera, Juan Diego Montañez-Abril, Erika Paola Vergara-Vela, Carlos Humberto Saavedra-Trujillo, María José López-Mora, Gloria Elena Mora-Figueroa, Adriana Celis-Ramírez, Rose Mary Jaramillo-Calle, Rafael Parra-Medina 41

An outbreak of trichophytic *tinea capitis* in a group of schoolchildren in a rural area of the department of Cauca, Colombia
Fabiola Eugenia González, José Alejandro Rodríguez, Lina María Muñoz, Giovanny Apráez, Luis Reinel Vásquez 57

Pseudoepitheliomatous hyperplasia: Squamous cell carcinoma versus oral paracoccidioidomycosis, a case from a dermatological perspective
Lina M. Osorio-Cock, Sandra Catalina Jaramillo-Pulgarín, Alba P. Ferrín-Bastidas, Diana Y. Molina-Colorado, Óscar M. Gómez-Guzmán, Alejandra Zuluaga, Juan G. McEwen-Ochoa, Martha E. Urán-Jiménez, María del Pilar Jiménez-Alzate 68

Original article

Assessment of biofilms formation of bacterial and fungal isolates using qualitative Congo red agar and semiquantitative crystal violet microtiter methods
Xiomara Moreno, Melanie Ventura, María Mercedes Panizo, María Fátima Garcés 77

Phospholipase and proteinase activities of isolates of colonizing *Candida* spp. causing vulvovaginitis in pregnant women
Martha Puello, Gregorio Young, Paola Suárez 89

Mixed oral candidiasis in type 2 diabetic patients: Identification and spectrum of sensitivity
Javier Araiza, Valentín Sánchez-Pedraza, Ana Karen Carrillo, Denise Fernández- Samar, Jazmín Tejeda, Alexandro Bonifaz 97

Sporotrichosis in Argentina: clinical and epidemiological analysis
Gabriela Santiso, Fernando Messina, Alicia Arechavala, Emmanuel Marín, María de las Mercedes Romero, María de los Ángeles Sosa, Florencia Rojas, Javier Mussin, Sonia Contreras, Viviana Galache, María Guerrero, Vanesa Sosa, Yone Chacón, Christian Álvarez, Ivana Maldonado, Mercedes Romero, Sofía Echazarreta, Norma Fernández, Silvia Relloso, Julián Serrano, Gustavo Giusiano 109

In vitro sensitivity of *Malassezia furfur* isolates from HIV-positive and negative patients to antifungal agents
Kevin Ehemann, Andrés Contreras, Adriana Marcela Celis-Ramírez 120

Mycological diagnosis of paracoccidioidomycosis in a hospital from a nonendemic area: classical and molecular methods
Norma B. Fernández, Adriana Toranzo, Luciana Farias, Cristina E. Canteros 132

Expression of *ERG11*, *ERG3*, *MDR1* y *CDR1* genes in *Candida tropicalis*
Ana Elisa Rojas, Leidy Yurany Cárdenas, María Camila García, Jorge Enrique Pérez 144

In vitro and *Quantitative and Structure Activity Relationship* (QSAR) evaluation of the antifungal activity of terpenoid constituents of essential oils against *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum*
Sergio Andrade-Ochoa, Daniela Sánchez-Aldana, Luz María Rodríguez-Valdez, Guadalupe Virginia Nevárez-Moorillón 156

Fast and cost-effective protocol to produce *Paracoccidioides* spp. antigens
Karolina Rosa Fernandes-Beraldo, Roseli Santos de Freitas-Xavier, Adriana Pardini Vicentini 170

Description of the colonizing mycobiota of endotracheal tubes from patients admitted to two intensive care units in Bogotá, Colombia
Mónica Gabriela Huertas, Miguel Rodríguez, Patricia Castro, Sergio Danilo Cruz, Érika Alejandra Cifuentes, Andrés Felipe Yepes, María Mercedes Zambrano, Ana Margarita Baldión..... 181

Biochemical typing and evaluation of pathogenicity in vulvovaginal isolates of *Candida albicans* complex
Soraya Morales-López, Keiner Ustate, Zulay Pedrozo, Yulibeth Torres Pedrozo..... 194

Meningeal cryptococcosis and SARS-CoV-2 infection in people living with HIV/AIDS
Fernando Antonio Messina, Andrés Benchetrit, Andrea Bocassi, María de las Mercedes Romero, Sofía Bauer, Emmanuel Marín, Facundo Bertera, Guillermo Onis, Matías Enzenhofer, Milagro Sánchez, Lilia Mammana, Dana Mijalovsky, Gabriela Santiso..... 206

Phenotypic and genotypic characterization of Colombian clinical isolates of *Sporothrix* spp.
Laura C. Álvarez-Acevedo, María C. Zuleta-González, Óscar M. Gómez-Guzmán, Álvaro L. Rúa-Giraldo, Orville Hernández-Ruiz, Juan G. McEwen-Ochoa, Martha E. Urán-Jiménez, Myrtha Arango-Arteaga†, Rosely M. Zancopé-Oliveira, Manoel Marques Evangelista de Oliveira, María del P. Jiménez-Alzate..... 216

Method validation for the quantification of fluconazole and its organic impurities in raw material using high-performance liquid chromatography
James Alexander Castillo, Natalia Afanasjeva..... 229

Tinea capitis outbreak and other superficial mycosis in an urban community of Medellín
Nelson Andrés Sterling, Dubán Andrés Rincón, Sebastián Barrera, Erika Andrea Sánchez, Diana Yuledi Molina, Martha Eugenia Urán, María del Pilar Jiménez..... 245

The conventional diagnosis challenge: Real-time PCR and nested PCR correlation with the scoring system for individuals at high-risk of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia
Fernando Almeida-Silva, Rodrigo Almeida-Paes, Lisandra Serra-Damasceno, Edwiges Motta-Santos, Luiz Claudio Ferreira, Leonardo Pereira-Quintella, Marcela de Faria Ferreira, Mauro de Medeiros-Muniz, Rosely M. Zancopé-Oliveira..... 255

Topic review

Disaster mycology
Daniel F. Q. Smith, Arturo Casadevall..... 267

Candida auris: a global pathogen that has taken root in Colombia
Patricia Escandón, Shawn R. Lockhart, Nancy A. Chow, Tom M. Chiller..... 278

Fungal taxonomy: A puzzle with many missing pieces
Álvaro León Rúa-Giraldo..... 288

Continuing education

Make the diagnosis - Second part
Yenny Ariza, Cristian Leonardo Cubides, Daniel Alejandro Cubillos, Carmen Lucía Roa, José Camilo Álvarez, Sonia Isabel Cuervo-Maldonado 312

Biomédica 2023;43(Supl.1):7-10

Biomédica Instituto Nacional de Salud

Volumen 43, Suplemento No. 1 - Bogotá, D.C., Colombia - Agosto de 2023

In memoriam

Ángela Restrepo Moreno
1931-2022



La doctora Ángela Restrepo Moreno nació en Medellín (Colombia) en 1931 y, desde muy joven, dada su curiosidad por descubrir y saber más sobre los pequeños microorganismos causantes de enfermedades –y que se podían observar con el microscopio de su abuelo– escogió la ciencia y la microbiología como el eje de su vida académica. La importancia y la magnitud de la labor científica, pedagógica y humana de "la Doctora", como la llamábamos con gran respeto, cariño y admiración todos sus alumnos y colegas, la convirtieron en una de las principales figuras de la historia de la ciencia en Colombia. Sus aportes a la micología médica la convirtieron en pionera, en reconocida experta y en "maestra" de muchos en Colombia, en Latinoamérica y en todo el mundo.

La doctora Ángela se graduó en la primera promoción de técnicas de laboratorio clínico del Colegio Mayor de Antioquia de Medellín en 1954. Sus prácticas profesionales las hizo en la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia, e ingresó al Departamento de Microbiología y Parasitología

de esta facultad luego de haberse graduado. Entre 1958 y 1960 cursó una maestría en Ciencias en la Universidad de Tulane (Nueva Orleans, Estados Unidos) y, a su regreso a la Universidad de Antioquia, fundó el Laboratorio de Micología Médica dentro del Departamento de Microbiología y Parasitología, con el cual se inició esta disciplina en el país, y en donde se capacitó un gran número de profesionales.

Su inquietud por aprender más sobre cómo hacer investigación, la llevó de regreso a la Universidad de Tulane para complementar su formación y obtener su doctorado en 1965.

A su regreso a Colombia y a la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia, se integró de nuevo al Laboratorio de Micología Médica y rodeada de alumnos, colegas y profesores de varias disciplinas, convirtió este laboratorio en un centro de referencia nacional para el diagnóstico, la investigación y la enseñanza de las enfermedades producidas por hongos.

La doctora Restrepo estableció la línea de investigación sobre la paracoccidioidomicosis, causada por el hongo *Paracoccidioides* spp., una micosis a la que dedicó décadas de estudio. Sus investigaciones, en colaboración con sus alumnos y con un grupo importante de profesores del área clínica y de ciencias básicas, incluyeron desde la descripción en 1961 de los primeros casos de esta micosis en Colombia hasta aportes al conocimiento de la paracoccidioidomicosis en todos sus aspectos: su agente etiológico y la búsqueda de su hábitat, la fisiopatología de la enfermedad, el desarrollo y la estandarización de nuevos métodos diagnósticos y de nuevas terapias para su tratamiento.

Otra de las grandes contribuciones de la doctora Ángela en la Universidad de Antioquia fue la creación de la maestría en Microbiología Médica, en asociación con otros profesores del Departamento de Microbiología y Parasitología, donde tuvo la oportunidad de formar la primera generación de micólogos e investigadores profesionales del país. Mediante la coordinación del programa *Latin American Professorship* de la *American Society for Microbiology* –en cuyo convenio vinieron a Colombia destacados microbiólogos estadounidenses a dictar cursos avanzados en diferentes tópicos–, la doctora Restrepo contribuyó a la formación de investigadores en otras áreas de la Microbiología y se logró que muchos estudiantes y profesionales pudieran hacer pasantías y continuar sus estudios en prestigiosas universidades de los Estados Unidos.

Fue profesora titular de la Universidad de Antioquia hasta 1976, y luego de trabajar dos años como subdirectora del Laboratorio Departamental de Antioquia, en 1978 se vinculó a la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), institución de la que fue cofundadora y de la que fue su directora científica entre 1978 y 2015, es decir, hasta su retiro. La doctora Restrepo, en colaboración con otros distinguidos y reconocidos profesores e investigadores, logró hacer de la CIB uno de los principales centros de investigación biológica no sólo de Colombia, sino de Latinoamérica.

En esta institución, trabajando cooperativamente con un gran número de alumnos de diversas universidades y de profesionales reconocidos y expertos en diversos campos a nivel nacional e internacional, la doctora Ángela continuó su investigacion sobre *Paracoccidioides* spp. y la paracoccidioidomicosis logrando importantes avances y nuevos conocimientos sobre esta enfermedad y su agente etiológico, avances

que la llevaron a ser reconocida como la gran experta a nivel nacional e internacional en esta micosis.

Más recientemente, cuando la aplicación de la epidemiología molecular y la genética de poblaciones reveló que el género *Paracoccidioides* se compone, al menos, de cinco especies diferentes, una de las nuevas especies del hongo se denominó *Paracoccidiodes restrepiensis* en su honor.

Aunque la mayor parte de su trabajo se centró en la paracoccidioidomicosis, la doctora Ángela también hizo aportes muy destacados en el diagnóstico y estudio de otras infecciones causadas por hongos, y fue así como alcanzó la plenitud de su producción científica y gran reconocimiento durante los años de trabajo en la CIB.

Su obra científica incluye más de 400 publicaciones nacionales e internacionales y está compuesta por artículos originales, revisiones, ensayos y más de 40 capítulos en libros, muchos de ellos en los más destacados libros de Medicina o de Microbiología a nivel mundial.

La doctora Restrepo recibió dos títulos de doctorado *honoris causa*, uno otorgado por la Universidad Pontificia Bolivariana de Medellín en 1994, y el segundo, por la Universidad de Antioquia de Medellín en 1996. A lo largo de sus más de 50 años de vida científica, recibió muchísimos reconocimientos, premios, distinciones y homenajes (más de 50) por parte de sociedades científicas nacionales e internacionales, universidades e instituciones públicas. Entre estos premios, caben ser destacados tres de ellos otorgados por importantes sociedades científicas internacionales y que ningún científico latinoamericano había recibido antes: el Lucille K. George Award, otorgado por la *International Society for Human and Animal Mycology* (ISHAM) en 1979; el Rodha Benham Award, otorgado por la *Medical Mycology Society of the Americas* en 1990, y la Medical Mycology Medal, otorgada por la *Canadian Society of Mycology* en 1991.

Es de destacar que la doctora Ángela Restrepo fue la única mujer que participó en la “Misión de sabios” creada por el gobierno nacional de Colombia entre 1992 y 1994 para aportar a la construcción e implementación de la política pública de educación, ciencia, tecnología e innovación. Al formar parte de esta comisión, realizó uno de sus grandes sueños, en el que trabajó también por décadas: el descubrimiento y promoción de jóvenes con talento para la investigación.

La doctora Ángela fue miembro activo y honorario de importantes academias científicas colombianas, entre ellas la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, y junto a un número importante de destacados investigadores establecieron una activa colaboración con el Parque Explora de Medellín, logrando incluir en la agenda educativa del parque una serie de actividades de difusión científica, especialmente para niños y jóvenes escolares de escasos recursos. Durante toda su carrera científica, y aun desde su retiro, formó cientos de jóvenes estudiantes y profesionales en el campo de la micología y también apoyó a los de otras disciplinas afines. Sus alumnos hoy se desempeñan en instituciones en Colombia y en otros países, y llevarán siempre la huella imborrable de haber sido sus discípulos. La doctora Ángela solía decir con mucho orgullo que sus alumnos eran sus “mejores condecoraciones” y que eran, además, su familia.

Los últimos años de su vida los consagró a seguir apoyando a la Institución Educativa Ángela Restrepo Moreno, nombrada en su honor. Allí se convirtió en la mentora y guía de todas las actividades científicas, incluso durante los años de la pandemia en la modalidad virtual, animando e inspirando a los jóvenes estudiantes el deseo de continuar sus estudios superiores.

La doctora Ángela era una mujer culta, dotada de una gran sensibilidad por la música, el arte y la literatura. Era una mujer muy generosa y humilde, de buen humor y, sobre todo, era una gran ciudadana con un inmenso amor por su patria. Su inmensa calidez le permitía ser una compañía inigualable en todos los momentos, siempre tenía un mensaje de estímulo, de apoyo, de cariño y de solidaridad para cada persona y en cada momento.

Por su majestuoso legado de ciencia y humanidad, todos sus alumnos, colegas, compañeros de proyectos y todos quienes tuvimos el privilegio y enorme fortuna de conocerla y de ser cercanos a ella, nuestra eterna gratitud, admiración y cariño a la gran científica, a la maestra por excelencia y a la mujer cálida y ejemplar que fue y que seguirá siendo inspiración y modelo para las generaciones presentes y futuras.

Beatriz L. Gómez, Ph. D.
Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad del Rosario, Bogotá, D.C., Colombia

Biomédica Instituto Nacional de Salud

Volumen 43, Suplemento No. 1 - Bogotá, D.C., Colombia - Agosto de 2023

Editorial

Las infecciones fúngicas: una amenaza creciente

De todos los microorganismos patógenos para los humanos, históricamente los hongos han sido los menos estudiados y atendidos por los programas de salud pública a nivel nacional y mundial. La importancia médica, veterinaria y ecológica de las enfermedades fúngicas ha aumentado considerablemente en el pasado. La carga actual de las enfermedades micóticas en humanos supera varios millones de casos y se calculan más de 1,5 millones de muertes al año en todo el mundo, además de que el costo de su diagnóstico y tratamiento tiene un importante impacto económico y en la salud pública (1-5) (https://gaffi.org/).

Las causas de esta situación actual son complejas, pero la mayoría refleja una confluencia de actividades humanas que han resultado en avances significativos en la medicina moderna. Estas causas incluyen, entre otras: los efectos y dimensiones de la epidemia del VIH/sida como consecuencia de la difusión del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) alrededor del mundo y que ha dado como resultado un gran número de personas con inmunidad debilitada; la aparición de nuevos hongos patógenos, como *Candida auris*, que presenta un alto grado de resistencia a los antifúngicos disponibles y que, además, ha causado brotes en las unidades de cuidados intensivos (6), y factores globales como el incremento del fenómeno migratorio, los viajes, el cambio climático, los desastres naturales y los provocados por el hombre (1,5,7-8).

Todo esto se suma a que las infecciones causadas por hongos son difíciles de tratar porque tienden a ser crónicas, muchas de ellas difíciles de diagnosticar y de erradicar con los medicamentos antimicóticos disponibles actualmente. Por último, y no menos importante, las predicciones climáticas para el siglo XXI prevén un calentamiento global progresivo que reducirá el gradiente de temperatura de los mamíferos y el ambiente. Esto combinado con la capacidad de los hongos para adaptarse a temperaturas más altas aumenta la posibilidad de nuevas enfermedades fúngicas (1,9-12).

Antes de la pandemia por el virus SARS-CoV-2, la resistencia a los antibióticos figuraba como la prioridad mundial de la atención en salud. Algunos análisis, incluido el informe de O'Neill en 2022 (13), han pronosticado que las muertes debidas a infecciones bacterianas resistentes a medicamentos podrían eclipsar el número total de muertes por cáncer para el 2050. Aunque las infecciones fúngicas permanecen en la sombra de la conciencia pública, las muertes anuales totales atribuibles son similares o superan la mortalidad global por malaria, tuberculosis o VIH. El impacto de las infecciones fúngicas se ha visto exacerbado por el aumento constante de cepas y especies resistentes a los fármacos antifúngicos, lo que refleja su uso generalizado para la profilaxis y la terapia, y en el caso de la resistencia a los azoles en *Aspergillus* spp., se ha relacionado con el uso generalizado de antifúngicos en la agricultura (14-19).

Citación:
Gómez BL, Escandón P. Las infecciones fúngicas: una amenaza creciente. Biomédica. 2023;43(Supl.1):11-6.

Actualmente, en la práctica clínica solo se utilizan cuatro clases de medicamentos antimicóticos sistémicos: los azoles, las equinocandinas, las pirimidinas y los polienos, y solo unos pocos más están en desarrollo (5,20-23). Aunque los medicamentos antimicóticos existentes son efectivos, están asociados con muchos efectos adversos. La prescripción de estos medicamentos también requiere experiencia y sus interacciones farmacológicas con otros son particularmente comunes (5,24). Tales interacciones, junto con el requisito de ciclos prolongados de terapia, afectan aún más la seguridad y el pronóstico del paciente.

La pandemia por coronavirus (COVID-19) también se ha asociado con un aumento en la incidencia de infecciones fúngicas invasivas comórbidas. La aspergilosis, la mucormicosis y la candidemia fueron las infecciones fúngicas más frecuentemente asociadas con COVID-19, y se informaron con frecuencia con consecuencias devastadoras (5,25).

En el ámbito médico específicamente, los pacientes en tratamiento de cánceres con medicamentos que alteran la inmunidad, los que reciben agentes inmunosupresores para tratar enfermedades autoinmunitarias, los que son sometidos a procedimientos invasivos tales como cirugías o colocación de catéteres intravasculares, y aquellos que reciben de forma profiláctica antibióticos y antimicóticos que modifican el microbioma normal, se convierten en huéspedes propensos a padecer infecciones causadas por hongos. Estas infecciones fúngicas son más recalcitrantes a la terapia en comparación con la mayoría de las infecciones bacterianas. Por lo tanto, los pacientes requerirán tratamientos largos, lo que a su vez aumenta el riesgo de desarrollo de resistencia antifúngica.

A pesar de los avances, la terapia para la mayoría de las enfermedades fúngicas invasivas sigue siendo insatisfactoria dada su alta morbilidad y mortalidad (1,5,14), como en los casos de la aspergilosis, la candidiasis y la criptococosis, que presentan una alta mortalidad –incluso con el tratamiento adecuado– y, a menudo, son incurables en huéspedes con inmunidad deteriorada (1).

A diferencia de las enfermedades bacterianas y virales, las infecciones fúngicas invasoras rara vez son transmisibles y esto ha llevado a un menor interés de las autoridades de salud pública en cuanto a su vigilancia, por lo que hay poca información sobre la incidencia y la prevalencia de estas micosis.

Es importante también mencionar que se pueden presentar “brotes” o “epidemias” causados por hongos y, cuando ocurren, tienden a reflejar una de tres situaciones:

1. aumento de la prevalencia de huéspedes con inmunidad comprometida vulnerables a estas infecciones;
2. exposiciones a un gran inóculo, como los brotes de histoplasmosis tras la exposición al agente causal en actividades como la tala de árboles en zonas endémicas, visitas a cuevas o remoción de material contaminado (26-27), y
3. causas iatrogénicas como, por ejemplo, el brote de meningitis fúngica por *Exserohilum rostratum* después de la aplicación de soluciones contaminadas de esteroides (28) o el brote causado por *Sarocladium kiliense* luego de la administración de un medicamento antiemético a pacientes oncológicos (29).

Considerando todo lo mencionado anteriormente, además de la importancia de establecer criterios que definan una especie fúngica y alcanzar una construcción filogenética más o menos estable que permita entender los cambios taxonómicos de una manera práctica (30, 31), tenemos un panorama actual en el que las enfermedades fúngicas son cada vez más prevalentes en ambos, humanos y animales, con opciones de tratamiento insatisfactorias para los primeros y pocas o ninguna para los segundos. Es muy probable que, en los próximos años, el problema de las infecciones fúngicas invasivas tienda a crecer y la humanidad se enfrente a nuevas amenazas con especies de hongos que actualmente no las representan.

A pesar de esta situación compleja causada por el incremento de las enfermedades fúngicas en humanos vulnerables y en diversos ecosistemas, el reino de los hongos tiende a ignorarse si se compara con las bacterias, los virus y los parásitos. La revista *Nature Microbiology* lo señaló recientemente en el editorial titulado “Stop neglecting fungi” (32).

Sin embargo, también es importante mencionar y reconocer que tenemos un progreso importante gracias a instituciones como el *Global Action Fund for Fungal Infections* (GAFFI) (https://gaffi.org/), que desde el año 2013 ha sido una de las voces a nivel mundial sobre las enfermedades fúngicas en términos de salud pública y estima que, con un mejor diagnóstico y tratamiento disponible, el número de muertes por enfermedades por hongos podría disminuir a menos de 750.000 por año.

Para lograr esto, GAFFI se encuentra trabajando con sectores de la academia, la industria y los entes de salud pública en políticas que comprenden cinco áreas temáticas:

1. minimizar las muertes por sida debido a enfermedades fúngicas,
2. diagnosticar correctamente la enfermedad pulmonar fúngica similar a la tuberculosis,
3. crear conciencia en los organismos de salud pública regionales y mundiales sobre las enfermedades tropicales desatendidas, por hongos,
4. ayudar a ampliar los servicios de laboratorio para el diagnóstico de enfermedades fúngicas mediante educación y transferencia de tecnología y
5. atender la resistencia antifúngica como problema global urgente (https://gaffi.org/).

Estos esfuerzos se unen también a iniciativas por la academia y un ejemplo es el de investigadores en el Reino Unido, que también ha sentado un precedente importante, con estrategias que reconocen la importancia de la financiación de proyectos que contribuyan al avance de la micología médica (33) y de otras agencias en los Estados Unidos, como los *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), líder mundial en el área de la salud pública. Es gracias a todos estos esfuerzos y al de muchas otras instituciones en los distintos países, que estamos logrando poco a poco avances importantes.

Es de resaltar que, en el 2017, la Organización Mundial de la Salud (OMS) elaboró su primera lista de agentes patógenos bacterianos prioritarios en el contexto del aumento de la resistencia a los antibióticos para ayudar a impulsar la acción mundial en la investigación y el desarrollo de nuevos tratamientos (34). Inspirándose en este documento, la OMS ha desarrollado

y publicado recientemente la primera lista de agentes fúngicos prioritarios (5). Este documento representa el primer esfuerzo mundial para priorizar sistemáticamente los agentes patógenos fúngicos, teniendo en cuenta sus necesidades insatisfechas de investigación y desarrollo, y su importancia percibida para la salud pública.

Este documento de la OMS tiene como objetivo enfocar e impulsar más investigaciones e intervenciones políticas para fortalecer la respuesta global a las infecciones fúngicas y a la resistencia a los antifúngicos (5). Propone tres áreas principales de acción:

1. fortalecimiento de la capacidad y la vigilancia de los laboratorios;
2. inversiones sostenibles en investigación, desarrollo e innovación; y
3. intervenciones de salud pública.

Los agentes patógenos se clasificaron en tres grupos de prioridad (crítica, alta y media). El grupo crítico incluye *Cryptococcus neoformans*, *Candida auris*, *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans*. El grupo de prioridad alta incluye *Nakaseomyces glabrata* (*Candida glabrata*), *Histoplasma* spp., agentes causantes de micetoma, mucorales, *Fusarium* spp., *Candida tropicalis* y *Candida parapsilosis*; y los agentes patógenos del grupo de prioridad media son *Scedosporium* spp., *Lomentospora prolificans*, *Coccidioides* spp., *Pichia kudriavzeveii* (*Candida krusei*), *Cryptococcus gattii*, *Talaromyces marneffei*, *Pneumocystis jirovecii* y *Paracoccidioides* spp.

Este documento propone acciones y estrategias para formuladores de políticas, profesionales de la salud pública y otras partes interesadas, con el objetivo de mejorar la respuesta general a los patógenos fúngicos prioritarios, incluyendo la prevención y el desarrollo de resistencia a medicamentos antifúngicos (5).

En consecuencia, existe una necesidad apremiante de más investigación en los diferentes campos que abarca la micología médica. Se necesitan mejores herramientas diagnósticas, nuevos medicamentos antimicóticos, más seguros y efectivos, una mejor comprensión de la interacción del huésped con el hongo y de la respuesta inmunitaria, y un consenso en la cambiante taxonomía de los hongos. Todo esto con el fin de aprovechar al máximo todas las herramientas modernas para llevar a cabo nuevos estudios y establecer redes interactivas entre los diferentes grupos de investigación, la industria farmacéutica y las entidades de salud pública.

El objetivo de este suplemento es contribuir a divulgar temas relevantes y estratégicos en el campo de la micología médica, con revisiones de tema hechas por expertos, presentaciones de casos y artículos originales. A través de estas contribuciones se espera resaltar la importancia de investigar en el campo de la micología médica desde la ciencia básica y desde la clínica.

Este suplemento está dedicado a la memoria y al gran legado de la doctora Ángela Restrepo Moreno, una de las principales figuras de la ciencia en Colombia, cuyas contribuciones a la Micología Médica la convirtieron en una pionera y un referente en Latinoamérica y a nivel mundial. Las editoras de este suplemento agradecen de una manera muy especial a la revista *Biomédica* por este espacio, y a todos los colegas, en Colombia, en los distintos países en Latinoamérica y en los Estados Unidos, por sus importantes contribuciones.

Beatriz L. Gómez, Ph. D.
Grupo de Estudios en Microbiología Translacional y Enfermedades Emergentes (MICROS), Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad del Rosario, Bogotá, D.C., Colombia

Patricia Escandón, M. Sc.
Grupo de Microbiología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

Referencias

1. Casadevall A. Fungal Diseases in the 21st Century: The near and far horizons. Pathog Immun. 2018;3:183-96. https://doi.org/10.20411/pai.v3i2.249
2. Bongomin F, Gago S, Oladele RO, Denning DW. Global and multi-national prevalence of fungal diseases – estimate precision. J Fungi (Basel). 2017;3:57. https://doi.org/10.3390/jof3040057
3. Brown GD, Denning DW, Gow NA, Levitz SM, Netea MG, White TC. Hidden killers: Human fungal infections. Sci Transl Med. 2012;4:165rv13. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004404
4. Rodrigues ML, Albuquerque PC. Searching for a change: The need for increased support for public health and research on fungal diseases. PLoS Negl Trop Dis. 2018;12:e0006479. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006479
5. World Health Organization. WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. 2022. Fecha de consulta: 15 de agosto de 2023. Disponible en: https://www.who.int/ publications/i/item/9789240060241
6. Lockhart SR, Etienne KA, Vallabhaneni S, Farooqi J, Chowdhary A, Govender NP, *et al.* Simultaneous emergence of multidrug-resistant *Candida auris* on 3 continents confirmed by whole-genome sequencing and epidemiological analyses. Clin Infect Dis. 2017;64:134-40. https://doi.org/10.1093/cid/ciw691
7. Smith DFQ, Casadevall A. Disaster microbiology-a new field of study. mBio. 2022;13:e0168022. https://doi.org/10.1128/mbio.01680-22
8. Casadevall A. Don't forget the fungi when considering global catastrophic biorisks. Health Secur. 2017;15:341-2. https://doi.org/10.1089/hs.2017.0048
9. Garcia-Solache MA, Casadevall A. Global warming will bring new fungal diseases for mammals. MBio. 2010;1. https://doi.org/10.1128/mBio.00061-10
10. Wu X, Lu Y, Zhou S, Chen L, Xu B. Impact of climate change on human infectious diseases: Empirical evidence and human adaptation. Environ Int. 2016;86:1423. https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.09.007
11. Nnadi NE, Carter DA. Climate change and the emergence of fungal pathogens. PLoS Pathog. 2021;17:e1009503. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009503
12. Frías-de-Leon MG, Brunner-Mendoza C, Reyes-Montes M del R, Duarte-Escalante E, editors. The impact of climate change on fungal diseases. New York: Springer International Publishing. 2022. https://doi.org/10.1007/978-3-030-89664-5
13. O'Neill, J. Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. Government of the United Kingdom. 2022. Available from: https://apo.org.au/node/63983
14. Gow NAR, Johnson C, Berman J, Coste AT, Cuomo CA, Perlin DS, *et al.* The importance of antimicrobial resistance in medical mycology. Nat Commun. 2022:12;13:5352. https://doi.org/10.1038/s41467-022-32249-5
15. Denning DW. Antifungal drug resistance: an update. Eur J Hosp Pharm Sci Pract. 2022;29:109-12. https://doi.org/10.1136/ejhpharm-2020-002604
16. Reddy GKK, Padmavathi AR, Nancharaiah YV. Fungal infections: Pathogenesis, antifungals and alternate treatment approaches. Curr Res Microb Sci. 2022;3:100137. https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2022.100137
17. Pfaller MA. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. Am J Med. 2012;125(Suppl. 1):S3-13. https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2011.11.001
18. Rhodes J, Abdolrasouli A, Dunne K, Sewell TR, Zhang Y, Ballard E, *et al.* Population genomics confirms acquisition of drug-resistant *Aspergillus fumigatus* infection by humans from the environment. Nat Microbiol. 2022;7:663-74. https://doi.org/10.1038/s41564-022-01091-2

19. Zhou D, Korfanty GA, Mo M, Wang R, Li X, Li H, *et al.* Extensive genetic diversity and widespread azole resistance in greenhouse populations of *Aspergillus fumigatus* in Yunnan, China. mSphere. 2021;6:e00066-21. https://doi.org/10.1128/mSphere.00066-21

20. Osherov N, Kontoyiannis DP. The anti-*Aspergillus* drug pipeline: Is the glass half full or empty? Med Mycol. 2017;55:118-24. https://doi.org/10.1093/mmy/myw060

21. Perfect JR. The antifungal pipeline: a reality check. Nat Rev Drug Discov. 2017;16:603-16. https://doi.org/10.1038/nrd.2017.46

22. Hoenigl M, Sprute R, Egger M, Arastehfar A, Cornely OA, Krause R, *et al.* The antifungal pipeline: Fosmanogepix, ibrexafungerp, olorofim, opelconazole, and rezafungin. Drugs. 2021;81:1703-29. https://doi.org/10.1007/s40265-021-01611-0

23. Denning DW, Bromley MJ. Infectious disease. How to bolster the antifungal pipeline. Science. 2015;347:1414-6. https://doi.org/10.1126/science.aaa6097

24. Niazi-Ali S, Atherton GT, Walczak M, Denning DW. Drug-drug interaction database for safe prescribing of systemic antifungal agents. Ther Adv Infectious Dis. 2021;8:19. https://doi.org/10.1177/20499361211010605

25. Raut A, Huy NT. Rising incidence of mucormycosis in patients with COVID-19: another challenge for India amidst the second wave? Lancet Respir Med. 2021;9:e77. https://doi.org/10.1016/S2213-2600(21)00265-4

26. Deepe GS. Outbreaks of histoplasmosis: The spores set sail. PLoS Pathog. 2018;14:e1007213. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007213

27. Armstrong PA, Beard JD, Bonilla L, Arboleda N, Lindsley MD, Chae SR, *et al.* Outbreak of severe histoplasmosis among tunnel workers-Dominican Republic, 2015. Clin Infect Dis. 2018;66:1550-7. https://doi.org/10.1093/cid/cix1067

28. Andes D, Casadevall A. Insights into fungal pathogenesis from the iatrogenic epidemic of *Exserohilum rostratum* fungal meningitis. Fungal Genet Biol. 2013;61:143-5. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2013.08.014

29. Etienne KA, Roe CC, Smith RM, Vallabhaneni S, Duarte C, Escadón P, *et al.* Whole-genome sequencing to determine origin of multinational outbreak of *Sarocladium kiliense* bloodstream infections. Emerg Infect Dis. 2016;22:476-81. https://doi.org/10.3201/eid2203

30. Naranjo-Ortiz MA, Gabaldón T. Fungal evolution: Diversity, taxonomy and phylogeny of the fungi. Biol Rev Camb Philos Soc. 2019;94:2101-37. https://doi.org/10.1111/brv.12550

31. Spatafora JW, Aime MC, Grigoriev IV, Martin F, Stajich JE, Blackwell M. The fungal tree of life: From molecular systematics to genome-scale phylogenies. Microbiol Spectr. 2017;5. https://doi.org/10.1128/microbiolspec

32. No authors listed. Stop neglecting fungi. Nat Microbiol. 2017;2:17120. https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.120

33. Gow NAR, Amin T, McArdle K, Brown AJP, Brown GD, Warris A, *et al.* Strategic research funding: A success story for medical mycology. Trends Microbiol. 2018;26:811-3. https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.05.014

34. World Health Organization. Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis. Geneva: World Health Organization; 2017.

Biomédica 2023;43(Supl.1):17-30
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.6977

Educación continua

Haga usted el diagnóstico
Primera parte

Yenny Ariza[1], Cristian Leonardo Cubides[1,2], Daniel Alejandro Cubillos[2,3], Carmen Lucía Roa[1], José Camilo Álvarez[1,2], Sonia Isabel Cuervo-Maldonado[1,2,3]

[1] Grupo de Medicina Interna e Infectología, Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá, D.C., Colombia
[2] Grupo de Investigación en Enfermedades Infecciosas en Cáncer y Alteraciones Hematológicas, Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá, D.C., Colombia
[3] Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

Se trata de un hombre de 23 años, natural de Cantaura (Venezuela) y procedente de Yopal (Casanare), obrero de construcción. Como antecedentes de importancia, refirió haber tenido malaria cuatro años antes, diagnosticada y tratada en Venezuela; además, fumó un paquete de cigarrillos al día durante dos años (índice paquetes-años, IPA=2).

Consultó inicialmente al Hospital de la Orinoquia por presentar dolor de 4 meses de evolución en la región lumbosacra derecha, irradiado al miembro inferior derecho, acompañado de fiebre no cuantificada, aparición de masas en la región cervical e hiporexia. No refirió síntomas respiratorios, gastrointestinales, ni lesiones mucocutáneas.

Por la presencia de adenopatías cervicales y axilares, se practicó una biopsia ganglionar que informó: “Ganglio linfático alterado por presencia de granuloma con abundantes eosinófilos y estructuras redondeadas intracelulares que sugieren hongos”. A pesar de este hallazgo y con sospecha de linfoma no Hodgkin, se remitió para confirmación de la neoplasia hematológica maligna y tratamiento.

Al ingreso a la institución, se encontró un paciente en regular estado general, consciente, alerta y orientado, con tensión arterial de 102/62 mm Hg; frecuencia cardiaca de 80 latidos por minuto; frecuencia respiratoria de 18 por minuto; temperatura de 36,2 °C; saturación de oxígeno de 90 % al medio ambiente, peso de 40 kg; talla de 162 cm; índice de masa corporal de 15,24.

La cavidad oral se encontraba sin lesiones en mucosa yugal, encías, ni lengua. Había múltiples adenopatías cervicales y axilares, localizadas en estación Ia, Ib, II y V; la de mayor compromiso se encontró en la región cervical derecha, de 5 cm, aproximadamente, ulcerada y con secreción hematopurulenta (figura 1).

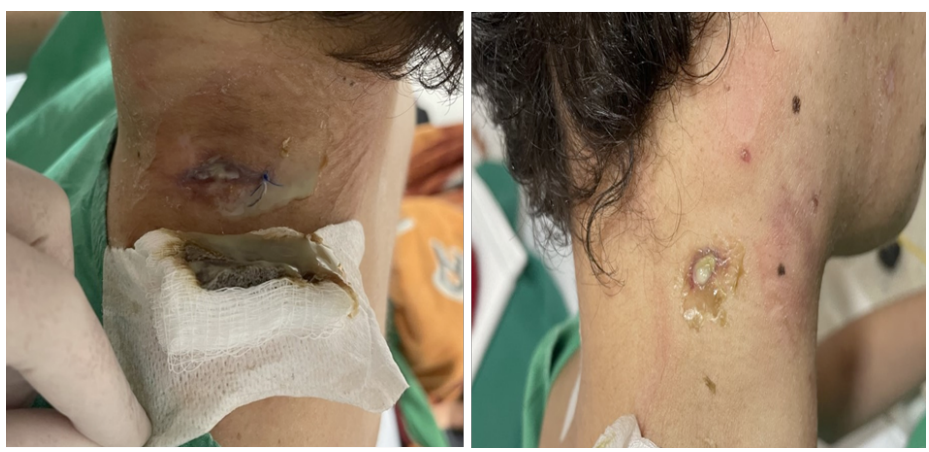


Figura 1. Adenopatías cervicales bilaterales, algunas con ulceración y salida de secreción purulenta

Recibido: 10/04/2023
Aceptado: 07/07/2023
Publicado: 11/07/2023

Citación:
Ariza Y, Cubides CL,Cubillos DA, Roa CL, Álvarez JC, Cuervo-Maldonado SI. Paracoccidioidomicosis ganglionar juvenil. Biomédica. 2023;43(Supl.1):17-30. https://doi.org/10.7705/biomedica.6977

Correspondencia:
Sonia Isabel Cuervo-Maldonado, Carrera 30 N° 45-03, edificio 471, oficina 510, Bogotá, D. C, Colombia
Teléfono: (0571) 316 5000, extensión 15012
sicuervom@unal.edu.co; scuervo@cancer.gov.co

Contribución de los autores:
Yenny Ariza y Sonia Isabel Cuervo-Maldonado: diagnóstico clínico, tratamiento del paciente y escritura del documento
Cristian Leonardo Cubides y José Camilo Álvarez: revisión crítica y escritura del documento
Daniel Alejandro Cubillos: revisión bibliográfica, revisión crítica y escritura del documento
Carmen Lucía Roa: diagnóstico histológico, figuras complementarias y revisión crítica

Financiación:
Este caso clínico no contó con financiación.

Conflicto de intereses:
Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

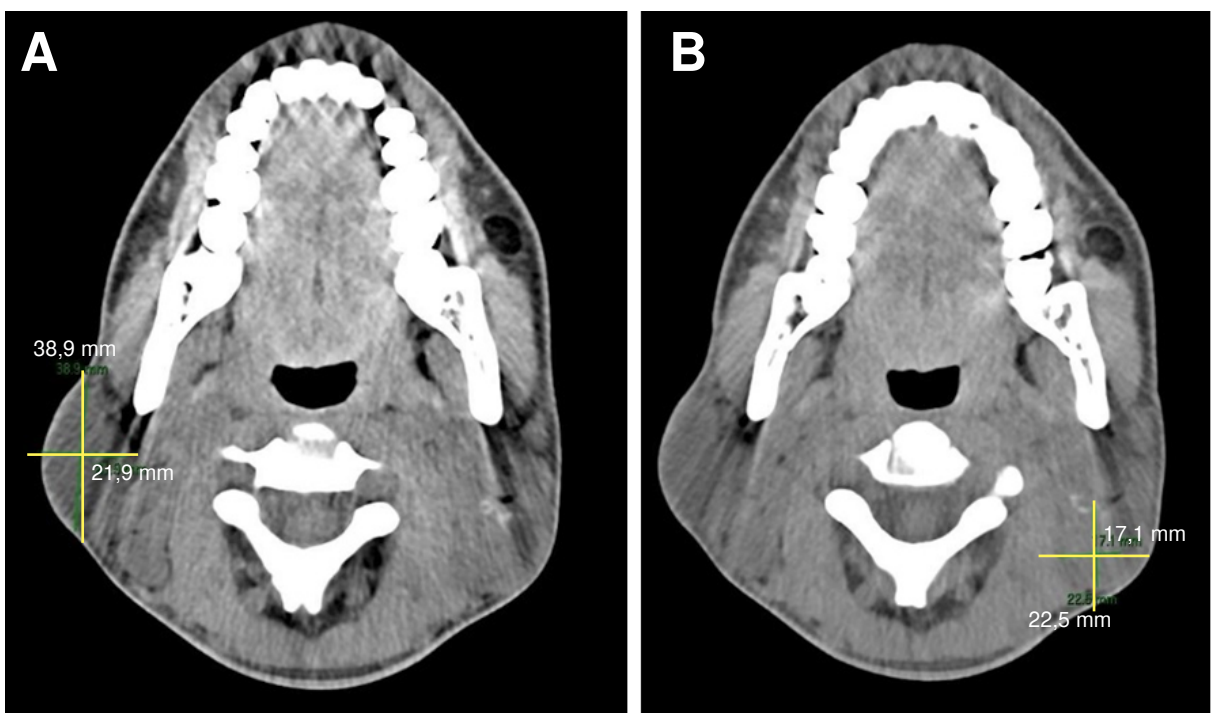
El examen cardiopulmonar fue normal; en el abdomen, se palpaba el borde hepático por debajo del reborde costal y el bazo se pudo percutir. No había lesiones en la piel. En el examen neurológico, el paciente estaba consciente, alerta, orientado en las tres esferas y sin déficit sensitivo, ni motor.

Con el diagnóstico de linfadenitis cervical y axilar con abscesos, se inició tratamiento con ampicilina-sulbactam y, dado que no hubo mejoría alguna, se adicionó vancomicina durante 10 días, sin que se observara ninguna modificación clínica.

En el cuadro hemático de ingreso, se reportó: leucocitosis (12.110 cél/µl), neutrofilia (7.120 cél/µl), linfocitos normales (1.840 cél/µl), anemia moderada (hemoglobina = 8,41 g/dl), normocítica, normocrómica, heterogénea, plaquetas normales (384.000 cél/µl). La química sanguínea estaba dentro de rangos normales (sodio = 138 mmol/L; potasio = 4,5 mmol/L; magnesio = 1,7 mmol/L; fósforo = 5,5 mg/dl); la función renal era normal (creatinina = 0,8 mg/dl; BUN = 13 mg/dl); PCR de 7,6 mg/dl; ELISA para HIV, no reactiva.

En las tomografías, se apreciaron adenomegalias en todas las estaciones ganglionares cervicales, algunas con calcificaciones centrales; en el tórax, adenomegalias en todas las estaciones mediastinales axilares bilaterales y supraclaviculares, especialmente las izquierdas, algunas con calcificaciones centrales; asimismo, escasas opacidades centrolobulillares de tipo “árbol en gemación” en el segmento anterior del lóbulo superior derecho (figura 2); en el abdomen y en la pelvis, conglomerados ganglionares y adenomegalias retroperitoneales, en cadenas ilíacas externas e inguinales bilaterales, algunos con calcificaciones centrales y hepatoesplenomegalia.

Durante la estancia hospitalaria, el paciente no manifestó nuevos síntomas y con el tratamiento antimicrobiano inicial no hubo modificación de los síntomas al ingreso. El resultado de la segunda biopsia del ganglio axilar permitió dirigir el tratamiento y el paciente evolucionó hacia la mejoría.



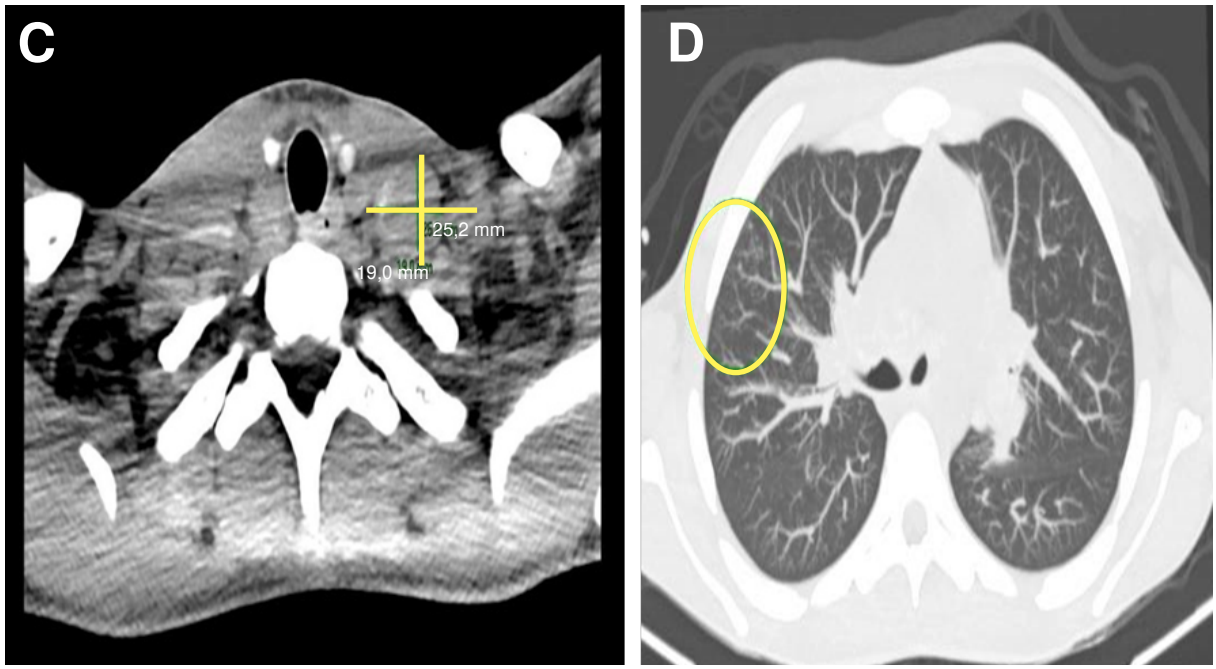


Figura 2. A y B. Tomografía de cuello. Se visualizan adenomegalias en todas las estaciones ganglionares cervicales, algunas con calcificaciones centrales. **C y D.** Tomografía de tórax. Adenomegalias en todas las estaciones mediastinales axilares bilaterales y supraclaviculares especialmente izquierdas, algunas con calcificaciones centrales. Escasas opacidades centrolobulillares de tipo "árbol en gemación" en el segmento anterior del lóbulo superior derecho.

Preguntas

1. ¿Cuál es su diagnóstico?
2. Basado en su diagnóstico, ¿cuál es el tratamiento indicado?

Biomédica 2023;43(Supl.1):20-31
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.6782

Presentación de caso

La importancia de la correlación clínico-epidemiológica en el diagnóstico temprano de la histoplasmosis: reporte de dos casos clínicos en Popayán, Colombia

Jorge Andrés Potosí, Yina Marcela Gutiérrez, Fabiola Eugenia González

Laboratorio de Microbiología y Parasitología, Facultad Ciencias de la Salud, Universidad del Cauca, Popayán, Colombia

La histoplasmosis es una micosis endémica en Colombia. Se presentan dos casos del departamento del Cauca, para mostrar el impacto clínico que conlleva un retraso en su diagnóstico y tratamiento. Se obtuvo el consentimiento informado para revisar las historias clínicas de los pacientes y publicar los casos.
El primer caso se trata de un paciente con infección por el virus de inmunodeficiencia humana (*Human Immunodeficiency Virus,* HIV), quien presentaba lesiones cutáneas generalizadas atribuidas inicialmente al virus del herpes; *post mortem* y mediante el cultivo para hongos de muestras de las lesiones dérmicas, se confirmó el diagnóstico de histoplasmosis. El segundo caso es un paciente inmunocompetente con sintomatología pulmonar, a quien se le diagnosticó tuberculosis clínicamente y se le instauró tratamiento; sin embargo, ante la nula mejoría y teniendo en cuenta el antecedente de ingreso a una cueva de murciélagos, se enfocó como una posible histoplasmosis pulmonar y se obtuvo mejoría con el tratamiento.
Se revisó la literatura sobre las pruebas de laboratorio y los datos epidemiológicos de histoplasmosis que deben considerar los profesionales de la salud. Se concluyó que las instituciones de salud deben disponer de pruebas rápidas (por ejemplo, antigénicas) para el diagnóstico y tratamiento adecuado de esta micosis, además de adoptar los correctivos necesarios para minimizar la exposición a *Histoplasma*.

Palabras clave: histoplasmosis; diagnóstico; HIV; síndrome de inmunodeficiencia adquirida; salud pública.

The relevance of clinical and epidemiological correlation in the early diagnosis of histoplasmosis: report of two clinical cases in Popayán, Colombia

Histoplasmosis is an endemic mycosis in Colombia. Here we present two cases in the Cauca department, to indicate the clinical impact of histoplasmosis delayed diagnosis and treatment when its epidemiology is unknown. Informed consent was requested to review patients' medical records and case report publication.
The first case was a patient diagnosed with human immunodeficiency virus and generalized presence of skin lesions. Initially, these lesions were diagnosed as herpes, but a postmortem diagnosis confirmed histoplasmosis through fungal cultures of tissues from the skin lesions. The second case is an immunocompetent patient with pulmonary symptoms diagnosed and treated for tuberculosis. However, given the lack of improvement and considering the bat cave entrance history, the patient was treated for possible pulmonary histoplasmosis with an adequate response.
We made a review of laboratory tests and histoplasmosis epidemiological data relevant to health professionals. We concluded that health institutions must provide rapid tests, such as antigen ones, to adequately diagnose and treat this mycosis; and also take corrective measures to minimize exposure to *Histoplasma*.

Key words: Histoplasmosis; diagnosis; HIV; acquired immunodeficiency syndrome; public health.

Caso uno

Se trata de un hombre de 39 años, procedente del área urbana de Popayán, con infección por HIV detectado tres meses antes y un cuadro clínico de 15 días de evolución caracterizado por la aparición de lesiones cutáneas pleomorfas en diferentes estadios, localizadas en los miembros superiores y en el cuero cabelludo, con posterior diseminación al tronco y a los miembros inferiores. Además, presentaba un síndrome constitucional, marcha inestable y tos de resolución espontánea, sin adenomegalias. Durante la valoración física de ingreso, se encontró hipotenso, bradicárdico y afebril.

Recibido: 06/12/2022
Aceptado: 26/04/2023
Publicado: 28/04/2023

Citación:
Potosí JA, Gutiérrez YM, González FE. La importancia de la correlación clínica y epidemiológica en el diagnóstico temprano de la histoplasmosis: reporte de dos casos clínicos en Popayán, Colombia. Biomédica. 2023;43(Supl.1):20-31. https://doi.org/10.7705/biomedica.6782

Correspondencia:
Fabiola Eugenia González, Laboratorio de Microbiología y Parasitología, Facultad Ciencias de la Salud, Universidad del Cauca, Carrera 5 N°13N-36, Popayán, Colombia
fegonza@unicauca.edu.co

Contribución de los autores:
Jorge Andrés Potosí y Yina Marcela Gutiérrez: revisión de las historias clínicas
Fabiola Eugenia González: lectura, identificación y fotografía del hongo aislado
Todos los autores participaron en la revisión de literatura y escritura del manuscrito.

Financiación:
Para el procesamiento de las muestras e identificación del hongo se utilizaron materiales de los que dispone el Laboratorio de Micología de la Facultad Ciencias de la Salud de la Universidad del Cauca.

Conflicto de intereses:
Los autores declaramos no tener conflicto de interés.

Se hizo el diagnóstico clínico de herpes cutáneo generalizado y se manejó con aciclovir. Los resultados del hemograma evidenciaron pancitopenia, valores de deshidrogenasa del ácido láctico (LDH) de 1.011 Ul/L y un recuento de 274 linfocitos CD4+ por µl. Otros exámenes de laboratorio resultaron negativos para patógenos oportunistas: marcadores serológicos de hepatitis B como inmunoglobulinas anticuerpos generales (anti-HBs) y contra el antígeno de superficie (HBsAg) y de la nucleocápisde (anti-HBc); búsqueda de anticuerpos contra hepatitis C (anti-VHC) y treponema (VDRL)-para diagnóstico de sífilis; tinción de Giemsa en lavado broncoalveolar para determinar pneumocistosis, examen coprológico y tinción de Gram en muestra de orina sin centrifugar. Los hallazgos de la radiografía de tórax fueron normales.

Dada la escasa efectividad terapéutica, se sospechó histoplasmosis diseminada. Se inició tratamiento empírico con deoxicolato de anfotericina B por vía intravenosa, en dosis diaria de 0,7 mg/kg, y se solicitó tinción de Giemsa y cultivo para hongos de una muestra tomada por biopsia de las lesiones cutáneas. No se observaron estructuras micóticas en el examen microscópico.

A pesar del tratamiento antimicótico, la salud del paciente continúo deteriorándose. Las citopenias empeoraron, y requirió transfusión de dos unidades de glóbulos rojos y cuatro de plaquetas.

Al sexto día, en la radiografía de tórax se observó engrosamiento peribronquial con infiltrados micronodulares. El paciente presentó convulsiones tonicoclónicas generalizadas, se tornó agresivo y se negó a recibir el tratamiento médico durante dos días. Al noveno día de hospitalización, sufrió un paro cardiorrespiratorio y falleció.

A los 28 días de incubación del cultivo para hongos, se obtuvo el aislamiento de un moho algodonoso y blanco. El hongo fue teñido con azul de lactofenol y, por microscopía, se observaron hifas tabicadas, delgadas y hialinas. Se hizo un montaje para microcultivo en la búsqueda de estructuras esporuladas que permitieran su identificación y, luego de 10 días, se reportó el aislamiento de *Histoplasma capsulatum* (figuras 1 y 2).

Caso dos

Se trata de un hombre de 47 años, proveniente del área rural de Timbío (Cauca), agricultor de profesión, que ingresó por un cuadro clínico de 15 días de evolución consistente en tos seca, disnea, cefalea, astenia, adinamia, osteomialgias, fiebre y pérdida de 6 kg de peso, aproximadamente.

En el examen físico se encontró taquicárdico, febril, con 86 % de saturación arterial de oxígeno, leves tirajes intercostales, estertores crepitantes de predominio derecho y ninguna alteración neurológica. Se le practicó una prueba rápida para HIV con resultado negativo, el hemograma y la creatinina se encontraron dentro de límites normales y la proteína C reactiva estaba elevada (15 mg/l).

En la radiografía inicial de tórax se evidenciaron infiltrados miliares difusos (figura 3). Ante estos hallazgos, se sospechó un cuadro de tuberculosis pulmonar y se ordenó baciloscopia seriada del lavado broncoalveolar. No se encontraron bacilos ácidoalcohol resistentes. El cultivo para micobacterias y la prueba de reacción en cadena de la polimerasa, realizada con el equipo GeneXpert, fueron negativos.

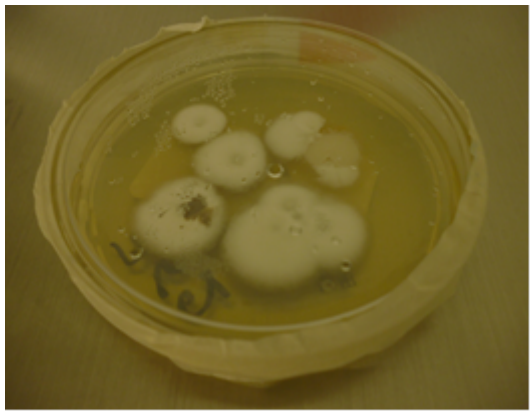


Figura 1. Cultivo de *Histoplasma capsulatum* en medio agar Sabouraud-dextrosa, a una temperatura de 28°C

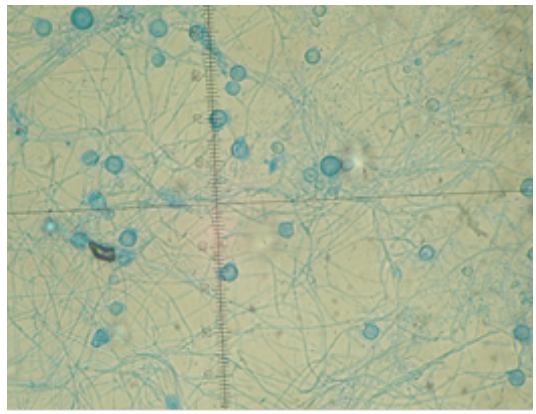


Figura 2. Macroconidias tuberculadas de *Histoplasma capsulatum*



Figura 3. Radiografía de tórax del paciente del segundo caso. Se reportan infiltrados miliares difusos.

En interconsulta con el especialista en Medicina Interna, el paciente refirió que un mes antes del inicio de los síntomas ingresó por primera vez a una cueva llena de murciélagos para recoger guano, acompañado por otras dos personas, quienes presentaron sintomatología similar, aunque mejoraron espontáneamente. Con los datos anteriores, se planteó la posibilidad diagnóstica de histoplasmosis pulmonar. Se solicitó una prueba con hidróxido de potasio y cultivo para hongos de la secreción obtenida por lavado broncoalveolar, cuyos resultados no se encontraron en la historia clínica.

En búsqueda de compromiso multiorgánico, se ordenaron exámenes para evaluar los niveles de fosfatasa alcalina, transaminasas, bilirrubina total y directa, y deshidrogenasa láctica. Todos los valores se encontraron dentro de los parámetros normales.

Se inició un tratamiento empírico, con deoxicolato de anfotericina B por vía intravenosa, en dosis diaria de 0,7 mg/kg, antes de administrar hidrocortisona. A los 15 días de hospitalización, el paciente presentaba una evolución clínica favorable y se dio de alta con formulación de itraconazol durante seis meses y seguimiento médico ambulatorio.

Al revisar nuevamente la historia clínica, se encontró que el paciente regresó al mes para la consulta de control, señaló que se encontraba en buen estado de salud y no asistió a más consultas. En la visita domiciliaria se detectó, como factor de riesgo epidemiológico, que el paciente tenía galpones para la cría de pollos, por lo cual se le hicieron las respectivas recomendaciones según los *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC).

Los aspectos clínicos y epidemiológicos del caso, así como la mejoría clínica obtenida con el tratamiento y el control sin evidencia micológica ni inmunológica de actividad, permitieron hacer el diagnóstico de histoplasmosis pulmonar epidémica, según las definiciones de consenso del Grupo de Enfermedades Infecciosas de la *European Organisation for Research and Treatment of Cancer* y el estudio de Micosis (1).

Consideraciones éticas

Se solicitó consentimiento informado al segundo paciente para la presentación de su enfermedad como caso clínico. Debido al desenlace del paciente uno, se contactó a un familiar quien proporcionó el consentimiento informado para su publicación como caso clínico. Estos dos casos hacen parte del macroproyecto de investigación “Perfil clínico y epidemiológico de las micosis pulmonares en sintomáticos respiratorios de algunas instituciones prestadoras de servicios de salud del Cauca, Colombia”, el cual contó con el aval del comité de ética institucional.

Discusión

Se presentan dos casos clínicos de pacientes atendidos en centros hospitalarios de Popayán, por su importancia clínica y epidemiológica. En el primer paciente, su estado de inmunosupresión grave por la infección con HIV, con un recuento de 274 linfocitos CD4+ por µl, permitió la colonización oportunista de *H. capsulatum* y desarrolló histoplasmosis diseminada con manifestaciones cutáneas. Estas lesiones posiblemente tenían una baja carga del hongo, ya que este no se observó en el examen microscópico directo. El crecimiento del hongo fue muy lento en los medios de cultivo y se requirió un microcultivo para su identificación final. El proceso de laboratorio convencional fue muy demorado, ya que la micosis se confirmó después de la muerte del paciente, a pesar del tratamiento antimicótico empírico que se le estaba suministrando.

Es de aclarar que no se practicó la prueba inmunológica del antígeno de *Histoplasma* en orina, como indica el protocolo de manejo, ya que en el centro hospitalario donde se encontraba recluido el paciente no estaba disponible.

En el segundo caso, se sospechó inicialmente tuberculosis dada la sintomatología y los resultados de imagenología. Las fallas en la anamnesis inicial no permitieron hacer el diagnóstico presuntivo de esta micosis, pero en una segunda valoración, se sospechó histoplasmosis pulmonar epidémica por el antecedente de haber ingresado a una cueva de murciélagos. Por ser un paciente sin ningún tipo de inmunocompromiso y por el tratamiento empírico antimicótico administrado, se pudo tratar la enfermedad.

La histoplasmosis es una infección endémica en Colombia, que afecta especialmente a personas con riesgo clínico y epidemiológico. Los profesionales de la salud deben hacer una anamnesis detallada que les permita aproximarse a este diagnóstico clínico presuntivo y confirmarlo con las herramientas de apoyo diagnóstico (métodos micológicos convencionales y pruebas inmunológicas para la detección de anticuerpos y de antígenos de *H. capsulatum*).

La histoplasmosis se considera una micosis endémica en países tropicales y subtropicales (2). Es causada por el hongo dimorfo dependiente de temperatura *H. capsulatum*, cuyas variedades filogenéticas fueron estudiadas inicialmente por Kasuga *et al*. (2003), quienes identificaron ocho clados: 1) norteamericana clase 1, clado 1; 2) norteamericana clase 2, clado 2; 3) latinoamericana grupo A, clado 3; 4) latinoamericana grupo B, clado 4; 5) australiana, clado 5; 6) holandesa, clado 6; 7) euroasiática, clado 7 y 8) africana, clado 8 (anteriormente variedad *duboisii*) (3).

Histoplasma capsulatum puede encontrarse en la tierra contaminada con heces de aves y murciélagos, con altas concentraciones de nitrógeno y fosfatos, a una temperatura entre los 22 y los 29 °C, y una humedad relativa entre el 67 y el 87 %. Este hongo es dependiente de la temperatura, debido a que entre los 20 y los 25 °C (temperatura ambiente) se desarrolla la forma saprófita (moho), con formación de macroconidias tuberculadas que varían entre 8 y 15 µm de diámetro, y microconidias o esporas de 2 a 5 µm de diámetro. Dado el tamaño de estas últimas, de inhalarse pueden viajar hasta los alvéolos del huésped; la transición de *H. capsulatum* a una levadura ovoide, de 2 a 5 µm de diámetro, es inducida principalmente por cambios de temperatura mayores de 30 °C (4).

Esta micosis está limitada a ciertas regiones endémicas, como el centro-este de los Estados Unidos, donde se calcula que del 80 al 90 % de la población ha sido infectada por *H. capsulatum,* con una incidencia de 1.000 casos por año. En el 2020, se estimaron entre 6.710 y 15.657 los casos de histoplasmosis en pacientes con HIV, con una mortalidad aproximada del 39 % (5-7). Otras zonas endémicas importantes se localizan en Suramérica, Centroamérica y las Antillas. También, se ha descrito la enfermedad en Asia, África, Australia y Oceanía, principalmente en zonas de clima templado, subtropical o tropical húmedo (2,7,8). Sin embargo, los brotes autóctonos en latitudes extremas, como en Canadá y la Patagonia argentina, sugieren una mayor propagación de *H. capsulatum* en el medio ambiente (9).

Esta enfermedad cobró importancia para la salud pública por el incremento de su incidencia, especialmente en su forma diseminada progresiva, con el advenimiento de la pandemia por el HIV (5,10-12). En 1987, los CDC de Estados Unidos determinaron que la histoplasmosis diseminada es una entidad definitoria del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida) (13).

En Colombia, la histoplasmosis no es una enfermedad de notificación obligatoria, pero sí de notificación pasiva. El laboratorio diligencia una encuesta suministrada por el Instituto Nacional de Salud y envía el aislamiento de la cepa con las medidas de bioseguridad correspondientes. El último dato publicado de la Encuesta Nacional de Histoplasmosis en Colombia entre los años 1997 y 2008, reportó 432 casos: 77 % presentados por hombres y 70,5 % con coinfección por HIV. Para el departamento del Cauca, el registro fue del 0,69 % (14). Los resultados de la encuesta no reflejan el comportamiento verdadero de la enfermedad, ya que hay un

subregistro en aquellos lugares que carecen de un adecuado sistema de vigilancia en salud pública o donde no se reportan los datos.

En el departamento del Cauca, se ha visto un incremento de población vulnerable, como son los pacientes infectados por el HIV: para el año 2022 y según el Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA), la incidencia epidemiológica de VIH/sida en esta región fue de 120 casos (15).

Entre las actividades de riesgo epidemiológico para el ser humano tanto en el área rural como en la urbana, están: tareas de limpieza de corrales de aves, áticos y graneros, uso de abonos orgánicos (gallinaza, pollinaza, guano), demolición de edificios, tala de árboles, ingreso a cuevas con murciélagos, actividades de remoción de suelos y limpieza de puentes y alcantarillas. Usualmente, en estos lugares el hongo encuentra las condiciones microambientales que le permiten su reproducción y supervivencia (5,7).

Hay que tener en cuenta la asociación entre brotes de histoplasmosis y perturbaciones ambientales, particularmente en presencia de excrementos de pájaros o murciélagos, ya que las grandes concentraciones de esporas pueden causar la infección (5). Este fue la circunstancia de la exposición del segundo paciente y de dos de sus compañeros, quienes también presentaron una sintomatología respiratoria, que se resolvió sin complicaciones.

Se han reportado brotes de esta micosis en Estados Unidos, México y República Dominicana (5,16,17). En Colombia, también han ocurrido brotes de histoplasmosis en la zona andina. Los pacientes tenían como antecedentes: visitas a cuevas, remoción de tierra de un árbol hueco y de cal agrícola contaminada con excrementos de aves, demolición de casas viejas y uso de tierra abonada con gallinaza y tala de cafetales (18). En el 2002, se publicó un brote de histoplasmosis en Medellín, en una familia cuya fuente de infección fue la manipulación de tierra enriquecida con gallinaza (19).

En el 2007, Ramírez *et al.* llevaron a cabo un estudio en la zona urbana de Popayán, en el cual observaron que los murciélagos estaban formando sus colonias en los cielos rasos de las casas del sector histórico (20). Por lo anterior, durante la consulta médica es importante interrogar al paciente sobre su contacto con posibles focos de infección con esta micosis.

Los aerosoles originados en el suelo contaminado facilitan el ingreso por inhalación de las esporas de *H. capsulatum* en las vías aéreas, donde pueden ser atrapadas por el aparato mucociliar; las que alcanzan a evadir este obstáculo pueden producir una infección pulmonar (4). El reconocimiento inmunitario innato de *H. capsulatum* por macrófagos y células dendríticas, es fundamental para la producción temprana de citocinas y quimiocinas, y para el proceso de fagocitosis. Estas células proteínas son necesarias para promover la diferenciación y el reclutamiento de linfocitos T ayudadores (Th1); la falla en generar una respuesta de tipo Th1 resulta en un colapso de la inmunidad (11).

En pacientes inmunocompetentes, como el segundo, que viven en zonas endémicas y que pueden inhalar una gran cantidad de esporas, la sintomatología de histoplasmosis generalmente se presenta de una a tres semanas después de la exposición, y puede incluir fiebre, escalofríos, tos seca, dolor torácico, mialgias y cefalea (21).

La histoplasmosis tiene dos formas de manifestarse, tanto clínica como radiológicamente. La primera es como una enfermedad pulmonar aguda o epidémica que se acompaña de lesiones neumónicas segmentarias, a menudo

grandes, que tienden a curar y se designan como lesiones tempranas. La segunda forma suele presentarse como una complicación de la primera; es una enfermedad crónica caracterizada por cavitación persistente y aumento de la fibrosis pulmonar, y a menudo, por insuficiencia pulmonar progresiva; esta forma se puede confundir con tuberculosis pulmonar (6,22,23).

En pacientes inmunocomprometidos, como el del caso uno, la histoplasmosis se puede presentar en la forma diseminada progresiva, con síntomas constitucionales y respiratorios, acompañada de signos como hepatoesplenomegalia, linfoadenopatías y lesiones cutáneas (21). Los exámenes de laboratorio pueden mostrar anemia, leucopenia, trombocitopenia y valores muy elevados de LDH (superiores a 1.000 ng/ml) y ferritina (mayores de 10.000 ng/ml), que en un contexto clínico adecuado pueden sugerir el diagnóstico de la forma diseminada (23,24). Muchos de estos parámetros clínicos y paraclínicos los presentó el paciente con HIV que aún no estaba en estadio de sida

Según Wheat *et al.*, desde 1990, la sola presencia de fiebre en un paciente con un recuento de linfocitos CD4+ inferior a 150 por µl, acompañada o no de síntomas constitucionales, tos, visceromegalias y lesiones mucocutáneas, debe sugerir la posibilidad de histoplasmosis (6).

En la piel, la histoplasmosis primaria se puede presentar por implantación traumática, pero, debido a la poca cantidad de inóculo, es extremadamente rara en pacientes inmunocompetentes y se trata eficazmente con triazoles (25-27).

Según la literatura científica, entre las enfermedades cutáneas más frecuentes en pacientes infectados por el HIV está la histoplasmosis. Se pueden presentar cuando los linfocitos CD4+ se encuentran en cifras inferiores a 250 por µl (28). En el caso del paciente número uno, su recuento de CD4+ estaba en 274 por µl. En Latinoamérica, se ha reportado compromiso cutáneo por histoplasmosis en el 38 al 85 % de los pacientes con sida. Las lesiones son polimorfas, como placas con costras o sin ellas, pústulas, nódulos, lesiones semejantes a las del molusco contagioso, erupciones acneiformes o pápulas eritematosas (29).

Las pruebas más sensibles para un diagnóstico temprano de histoplasmosis en un paciente con lesiones cutáneas son las tinciones de Giemsa o Wright. Se deben recolectar muestras por escarificación o tejido por biopsia. La observación microscópica de estas muestras permite visualizar las blastoconidias intracelulares de 2 a 5 µm de diámetro, localizadas en el citoplasma de los neutrófilos y de las células fagocíticas del sistema inmunológico. La sensibilidad de estas tinciones es del 25 al 80 % y su especificidad hasta del 90 %, pero los resultados pueden depender de la carga del hongo en la muestra clínica y la experiencia del observador (30). Con tinciones histopatológicas para hongos como la de plata metenamina, o de Grocott-Gomori, se observan blastoconidias pequeñas, de color marrón oscuro por la precipitación de los iones de plata (31).

Por otro lado, el hallazgo de *H. capsulatum* en extendidos de sangre periférica es poco sensible, pero es simple, rápido y específico en casos diseminados (32). Las tinciones deben ir acompañadas del cultivo para hongos de muestras de sangre, secreciones respiratorias, aspirados de medula ósea o tejido de piel. Estas muestras deben ser procesadas en una cabina de bioseguridad de nivel tres.

El aislamiento del hongo permite el diagnóstico definitivo de la micosis. Es un hongo de lento crecimiento, entre 15 y 21 días en su forma del moho. La confirmación del dimorfismo y el desarrollo de macroconidias a partir del microcultivo para macroconidias tuberculadas, permiten su identificación. El cultivo tiene una sensibilidad variable, del 15 al 85 %, dependiendo de la presentación clínica de la enfermedad (33,34).

Entre las pruebas diagnósticas no microbiológicas, se encuentran las inmunológicas para determinar antígenos o anticuerpos (22). La determinación de antígenos como el galactomanano, un biopolímero de *Histoplasma*, es muy útil en el diagnóstico precoz en pacientes con VIH/sida, porque influye en el tratamiento oportuno de la infección, el cual disminuye la probabilidad de mortalidad.

Actualmente, se encuentran disponibles la prueba rápida de inmunocromatografia para pruebas de flujo lateral y la prueba de inmunoadsorción enzimática (ELISA) para detectar antígenos a partir de muestras de suero, lavado broncoalveolar, líquido cefalorraquídeo y orina. La ELISA es el método más sensible, especialmente en el diagnóstico de enfermedad diseminada, con una sensibilidad del 95 % en pacientes con VIH-sida (22,34-36). Según la recomendación del protocolo de manejo de pacientes con HIV en Colombia, debe realizarse la prueba de antígeno de *Histoplasma* al ingreso en aquellos pacientes con un recuento de CD4+ menor de 50 por µl y según el criterio clínico (37).

En un estudio realizado por la Corporación de Investigaciones Biológicas de Medellín, se estandarizaron y validaron dos pruebas comerciales (MiraVista®) en muestras de orina de pacientes con HIV y sin HIV. Se determinó una sensibilidad y especificidad de la prueba de flujo lateral del 96 %, en comparación con una sensibilidad del 96 % y una especificidad del 77 % de la ELISA. La prueba de flujo lateral evaluada en este estudio tiene varias ventajas, como producir resultados en aproximadamente 40 minutos, no requerir una infraestructura compleja para la instalación del equipo, usar muestras de orina y ser fácil de realizar (38).

Las pruebas para detectar anticuerpos se pueden medir por las técnicas de inmunodifusión, fijación del sistema del complemento o *Western Blot* (39). La prueba de inmunodifusión detecta los antígenos M y H de *Histoplasma*. La presencia del antígeno M indica exposición al agente patógeno y son los primeros anticuerpos en aparecer, mientras que los anticuerpos contra el antígeno H aparecen después y usualmente se relacionan con infección activa. La prueba de fijación del complemento tiene una sensibilidad del 89 % en la forma aguda, del 63 % en la diseminada en pacientes con HIV y del 98 % en la forma crónica. Si se combinan las técnicas de inmunodifusión y fijación del complemento, se observa que la sensibilidad es del 98,5 % en la enfermedad aguda, es de 67,2 % en la forma diseminada en pacientes con sida y es del 100 % en la forma crónica (22).

Las técnicas moleculares disponibles, utilizadas en el diagnóstico de histoplasmosis, requieren de un laboratorio de amplia complejidad, pero permiten detectar el gen *Hc100* que codifica para la proteína de 100 kDa de *Histoplasma,* a partir de muestras clínicas. Su uso en pacientes inmunocomprometidos ha adquirido relevancia debido a que reducen el tiempo de diagnóstico, lo que se traduce en una mejoría en la supervivencia de los pacientes por la rápida implementación de las terapias adecuadas (39). Otros diagnósticos de histoplasmosis están siendo probados, como la secuenciación de última generación (34).

En el protocolo de manejo de pacientes con HIV en Colombia, por considerarse zona endémica de histoplasmosis, cuando los linfocitos CD4+ están por debajo de 150 por µl, se recomienda el uso de itraconazol como profilaxis primaria (37).

El tratamiento de la enfermedad se basa fundamentalmente en la aplicación de anfotericina B y antimicóticos del grupo de los azoles, idealmente itraconazol, y depende de la presentación clínica del paciente: en la histoplasmosis grave o moderadamente grave, se recomienda administrar anfotericina B liposómica en dosis de 3,0 a 5,0 mg/kg/día durante dos semanas; cuando no se cuenta con esta, se recomienda administrar desoxicolato de anfotericina B en dosis de 0,7 a 1,0 mg/kg/día durante dos semanas, adoptando medidas para prevenir lesión renal. Se debe tener en cuenta que la afectación del sistema nervioso central puede requerir que se prolongue el tratamiento inicial o se aumente la dosis. Posteriormente, se administran 200 mg de itraconazol, dos veces al día, durante 12 meses. En la histoplasmosis leve a moderada, se utiliza el itraconazol en dosis de 200 mg, tres veces al día durante tres días, y luego, 200 mg dos veces al día. En los pacientes con HIV, se deja como profilaxis secundaria hasta la recuperación de los linfocitos CD4+ (40).

Para la prevención de la histoplasmosis, los CDC recomiendan diferentes medidas, como evitar el anidamiento o asentamiento de aves o murciélagos en las tomas de aire de los sistemas de ventilación y los procesos pulverulentos; limpiar y desinfectar locales o zonas contaminadas (por ejemplo, rociar una solución del 3 al 5 % de formalina o lejía, antes de empezar la limpieza de gallineros o zonas contaminadas) y usar elementos de protección en el caso de las personas expuestas, como el respirador aprobado por el *National Institute for Occupational Safety & Health* (NIOSH) de los Estados Unidos (41,42).

Conclusiones

Para un diagnóstico temprano de la histoplasmosis, es importante hacer una anamnesis clínica completa, en la que se indague por actividades que puedan representar riesgo de exposición al hongo. Como es una infección oportunista, debe sospecharse en todo paciente inmunocomprometido, principalmente en aquellos con HIV que presenten síntomas constitucionales, tos y lesiones cutáneas.

Las instituciones de salud deben disponer de las pruebas inmunológicas para el diagnóstico de histoplasmosis mediante la detección de *H. capsulatum*, pruebas que ya se encuentran disponibles en el país. Además, independientemente de su presentación clínica, se deben documentar los casos debido a que se cuenta con escasa información epidemiológica local.

Para esto, el Instituto Nacional de Salud tiene implementada la notificación pasiva por laboratorio. En este sentido, se recomienda a los profesionales de la salud y a las entidades de salud pública, profundizar y analizar la problemática sobre la epidemiología de esta micosis y sus riesgos para la salud pública.

Referencias

1. Donnelly JP, Chen SC, Kauffman CA, Steinbach WJ, Baddley JW, Verweij PE, *et al.* Revision and update of the consensus definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer, and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. Clin Infect Dis. 2020;71:1367-76. https://doi.org/10.1093/cid/ciz1008
2. Colombo AL, Tobón A, Restrepo A, Queiroz-Telles F, Nucci M. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. Med Mycol. 2011;49:785-98. https://doi.org/10.3109/13693786.2011.577821
3. Kasuga T, White TJ, Koenig G, McEwen J, Restrepo A, Castañeda E, *et al.* Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. Mol Ecol. 2003;12:3383-401. https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2003.01995.x
4. Mittal J, Ponce MG, Gendlina I, Nosanchuk JD. *Histoplasma capsulatum*: Mechanisms for pathogenesis. Curr Top Microbiol Immunol. 2019;422:157-91. https://doi.org/10.1007/822018114
5. Benedict K, Mody RK. Epidemiology of histoplasmosis outbreaks, United States, 1938-2013. Emerg Infect Dis. 2016;22:370-8. https://doi.org/10.3201/eid2203.151117
6. Wheat LJ, Azar MM, Bahr NC, Spec A, Relich RF, Hage C. Histoplasmosis. Infect Dis Clin North Am. 2016;30:207-27. https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.10.009
7. De Perio MA, Benedict K, Williams SL, Niemeier-Walsh C, Green BJ, Coffey C, *et al.* Occupational histoplasmosis: Epidemiology and prevention measures. J Fungi (Basel). 2021;26:510. https://doi.org/10.3390/jof7070510
8. Lockhart SR, Toda M, Benedict K, Cáceres DH, Litvintseva AP. Endemic and other dimorphic mycoses in The Americas. J Fungi. 2021;7:151. https://doi.org/10.3390/jof7020151
9. Taylor ML, Reyes-Montes MD, Estrada-Bárcenas DA, Zancopé-Oliveira RM, Rodríguez-Arellanes G, Ramírez JA. Considerations about the geographic distribution of *Histoplasma* species. Appl Environ Microbiol. 2022;88:e0201021. https://doi.org/10.1128/aem.02010-21
10. Mahajan VK, Raina RK, Singh S, Rashpa RS, Sood A, Chauhan PS, *et al.* Case report: Histoplasmosis in Himachal Pradesh (India): An emerging endemic focus. Am J Trop Med Hyg. 2017;97:1749-56. https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0432
11. Horwath MC, Fecher RA, Deepe GS JR, *Histoplasma capsulatum*, lung infection and immunity. Future Microbiol. 2015;10:967-75. https://doi.org/10.2217/fmb.15.25
12. Adenis A, Nacher M, Hanf M, Vantilcke V, Boukhari R, Blachet D, *et al.* HIV-associated histoplasmosis early mortality and incidence trends: From neglect to priority. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8:1-5. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003100
13. Centers for Disease Control and Prevention. Revision of the CDC surveillance case definition for acquired immunodeficiency syndrome. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 1987;36(Supp.1):S1-15.
14. Arango M, Castañeda E, Agudelo CI, De Bedout C, Agudelo CA, Tobón A, *et al.* Histoplasmosis: results of the Colombian National Survey, 1992-2008. Biomédica. 2011;31:344-56. https://doi.org/10.7705/biomedica.v31i3.348
15. Instituto Nacional de Salud. Boletín epidemiológico, semana 25. Fecha de consulta: 28 de octubre de 2022. Disponible en: https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2022_Bolet%C3%ADn_epidemiologico_semana_25.pdf
16. Taylor ML, Ruiz-Palacios GM, Reyes-Montes MR, Rodríguez-Arellanes G, Carreto-Binaghi LE, Duarte-Escalante E, *et al.* Identification of the infectious source of an unusual outbreak of histoplasmosis, in a hotel in Acapulco, state of Guerrero, Mexico. FEMS Immunol Med Microbiol. 2005;45:435-41. https://doi.org/10.1016/j.femsim.2005.05.017
17. Armstrong PA, Beard JD, Bonilla L, Arboleda N, Lindsley MD, Chae SR, *et al.* Outbreak of severe histoplasmosis among tunnel workers - Dominican Republic, 2015. Clin Infect Dis. 2018;66:1550-7. https://doi.org/10.1093/cid/cix1067
18. Ordóñez N, Tobón A, Arango M, Tabares A, De Bedout C, Gómez B, *et al.* Brotes de histoplasmosis registrados en el área andina colombiana. Biomédica. 1997;17:105-11. https://doi.org/10.7705/biomedica.v17i2.941
19. Jiménez RA, Urán ME, de Bedout C, Arango M, Tobón AM, Cano LE *et al.* Brote de histoplasmosis aguda en un grupo familiar: identificación de la fuente de infección. Biomédica. 2002;22:155-9. https://doi.org/10.7705/biomedica.v22i2.1154

20. Ramírez-Chaves HE, Mejía-Egas O, Zambrano G. Anotaciones sobre dieta, estado reproductivo, actividad y tamaño de colonia del murciélago mastín común (*Molossus molossus*: Molossidae) en la zona urbana de Popayán, Departamento del Cauca, Colombia. Chiropt Neotrop. 2008;14:384-90.

21. Di Mango Al, Zanetti G, Penha D, Menna Barreto M, Marchiori E. Endemic pulmonary fungal diseases in immunocompetent patients: An emphasis on thoracic imaging. Expert Rev Respir Med. 2019;13:263-77. https://doi.org/10.1080/17476348.2019.1571914

22. Tobón AM, Gómez BL. Pulmonary histoplasmosis. Mycopathologia. 2021;186:697-705. https://doi.org/10.1007/s11046-021-00588-4

23. Sousa C, Marchiori E, Youssef A, Mohammed TL, Patel P, Irion K, *et al.* Chest imaging in systemic endemic mycoses. J Fungi. 2022;8:1132. https://doi.org/10.3390/jof8111132

24. Butt AA, Michaels S, Greer D, Clark R, Kissinger P, Martin DH. Serum LDH level as a clue to the diagnosis of histoplasmosis. AIDS Read. 2002;12:317-21.

25. Kirn DH, Fredericks D, McCutchan JA, Stites D, Shuman M. Serum ferritin levels correlate with disease activity in patients with AIDS and disseminated histoplasmosis. Clin Infect Dis. 1995;21:1048-9. https://doi.org/10.1093/clinids/21.4.1048

26. Raggio B. Primary cutaneous histoplasmosis. Ear Nose Throat J. 2018;97:346-8. https://doi.org/10.1177/0145561318097010-1108

27. Batista JM, Martins MAP, Bertollo CM. Primary cutaneous histoplasmosis difficult to treat in immunocompetent patient: Case report and literature review. Einstein (Sao Paulo). 2021;19:eRC5488. https://doi.org/10.31744/einstein_journal/2021RC5488

28. Garza-Garza R, González-González SE, Ocampo-Candiani J. Manifestaciones cutáneas del VIH. Gaceta Med Méx. 2014;150(Supp.2):S194-221.

29. Gómez-Santana LV, Torre AC, Hernández BA, Volonteri VI, Laura B, Luis-Galimberti R. Mucocutaneous manifestations of infection by *Histoplasma capsulatum* in HIV-negative immunosuppressed patients. Actas Dermosifiliogr (Engl Ed). 2018;109:e27-32. https://doi.org/10.1016/j.adengl.2018.03.006

30. Bianchi MH, Santiso G, Lehmann E, Walker L, Arechavala A, Maiolo E *et al.* Utilidad del citodiagnóstico de Tzanck en un hospital de enfermedades infecciosas de la ciudad de Buenos Aires. Dermatol argent. 2012;18:42-6.

31. Gupta N, Arora SK, Rajwanshi A, Nijhawan R, Srinivasan R. Histoplasmosis: Cytodiagnosis and review of literature with special emphasis on differential diagnosis on cytomorphology. Cytopathology. 2010;21:240-4. https://doi.org/10.1111/j.1365-2303.2009.00693.x

32. Tkach AD, Moreno JD, Bava AJ. Diagnóstico presuntivo de histoplasmosis en un frotis sanguíneo. Acta Bioquim Clin Latinoam. 2012;46.

33. Toscanini MA, Nusblat AD, Cuestas ML. Diagnosis of histoplasmosis: Current status and perspectives. Appl Microbiol Biotechnol. 2021;105:1837-59. https://doi.org/10.1007/s00253-021-11170-9

34. Azar MM, Loyd JL, Relich RF, Wheat LJ, Hage CA. Current concepts in the epidemiology, diagnosis, and management of histoplasmosis syndromes. Semin Respir Crit Care Med. 2020;41:13-30. https://doi.org/10.1055/s-0039-1698429

35. Nacher M, Blanchet D, Bongomin F, Chakrabarti A, Couppié P, Demar M, *et al. Histoplasma capsulatum* antigen detection tests as an essential diagnostic tool for patients with advanced HIV disease in low and middle income countries: A systematic review of diagnostic accuracy studies. PLoS Negl Trop Dis. 2018;12:e0006802. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006802

36. Falci DR, Monteiro AA, Braz Caurio CF, Magalhães TCO, Xavier MO, Basso RP, *et al.* Histoplasmosis, an underdiagnosed disease affecting people living with HIV/AIDS in brazil: Results of a multicenter prospective cohort study using both classical mycology tests and histoplasma urine antigen detection. Open Forum Infect Dis. 2019;3:ofz073. https://doi.org/10.1093/ofid/ofz073

37. Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia. Guía de práctica clínica basada en la evidencia científica para la atención de la infección por VIH/SIDA en personas adultas, gestantes y adolescentes. Guía para profesionales de la salud. Guía N° 39-2021. Fecha de consulta: 25 de octubre de 2022. Disponible en: https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/ET/gpc-vih-adultos-version-profesionales-salud.pdf

38. Cáceres DH, Gómez BL, Tobón ÁM, Minderman M, Bridges N, Chiller T, *et al.* Validation and concordance analysis of a new lateral flow assay for detection of *Histoplasma* antigen in urine. J Fungi. 2021;7:799. https://doi.org/10.3390/jof7100799

39. Vasconcellos ICDS, Dalla Lana DF, Pasqualotto AC. The role of molecular tests in the diagnosis of disseminated histoplasmosis. J Fungi (Basel). 2019;6:1. https://doi.org/10.3390/jof6010001

40. Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud. Directrices para el diagnóstico y el manejo de la histoplasmosis diseminada en las personas con infección por el VIH. Washington, D.C.: OPS-OMS; 2020. Fecha de consulta: 3 de octubre del 2022. Disponible en: https://www.paho.org/es/node/71472

41. Huhn GD, Austin C, Carr M, Heyer D, Boudreau P, Gilbert G, *et al.* Two outbreaks of occupational acquired histoplasmosis: More than workers at risk. Environ Health Perspect. 2005;113:585-9. https://doi.org/10.1289/ehp.7484

42. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 5th edition. 2009. Fecha de consulta: 5 de junio de 2022. Disponible en: https://www.cdc.gov/labs/pdf/CDC-BiosafetymicrobiologicalBiomedicalLaboratories-2009-P.pdf

Biomédica 2023;43(Supl.1):32-40
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.6779

Presentación de caso

Geotricosis: fungemia en paciente con leucemia linfoblástica aguda

José Camilo Álvarez-Rodríguez[1,2], María Paula Blanco-Bustos[1,3], Sonia Isabel Cuervo-Maldonado[1,2,3], Julio César Gómez-Rincón[1,2], Ángela Reyes[4]

[1] Grupo en Enfermedades Infecciosas en Cáncer y Alteraciones Hematológicas, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia
[2] Grupo de Infectología, Instituto Nacional de Cancerología E.S.E, Bogotá, D.C., Colombia
[3] Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia
[4] Grupo de Microbiología, Laboratorio Clínico, Instituto Nacional de Cancerología E.S.E, Bogotá, Colombia

La fungemia por *Geotrichum* spp. es poco frecuente y altamente letal. En el Instituto Nacional de Cancerología de Bogotá solo se han reportado dos casos: uno entre el 2001 y el 2007, y el otro entre el 2012 y el 2018. Este tipo de infección es más común en pacientes con algún grado de compromiso del sistema inmunitario, por lo que puede presentarse en pacientes con neoplasias hematológicas malignas.
Se presenta el caso de un hombre de 27 años con recaída de leucemia linfoblástica aguda, que ingresó con poliartralgias de cinco días de duración. También cursaba con neutropenia febril, celulitis sin abscesos y bacteriemia por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina para lo cual recibió terapia con oxacilina y cefepime. Sin embargo, persistía la neutropenia febril por lo que se sospechó una infección fúngica invasora. Se tomó un nuevo set de hemocultivos y se inició tratamiento antifúngico.
En los hemocultivos se identificaron artroconidias y mediante espectrometría de masas por láser de matriz asistida de ionización-desorción se confirmó la presencia de *Geotrichum* spp. Se ajustó el tratamiento antifúngico con deoxicolato de anfotericina B por 14 días y voriconazol por cuatro semanas. Luego de una estancia prolongada se le dio de alta.
Aunque la incidencia de la fungemia por *Geotrichum* spp. es baja, en pacientes con neoplasias hematológicas malignas debe considerarse en el contexto de una neutropenia febril que es persistente a pesar del tratamiento antimicrobiano de amplio espectro. La identificación de los agentes causantes de fungemias con herramientas de proteómica, como la espectrometría de masas mencionada, permite ajustar el tratamiento dirigido y reducir las complicaciones, la estancia hospitalaria y la mortalidad.

Palabras clave: geotricosis; fungemia; leucemia-linfoma linfoblástico de células precursoras; anfotericina B; voriconazol; espectrometría de masa por láser de matriz asistida de ionización desorción.

Geotrichosis: fungemia in a patient with acute lymphoblastic leukemia

Fungemia caused by *Geotrichum* spp. is rare and highly lethal. The *Instituto Nacional de Cancerología* in Bogotá reported just two cases: one in the period 2001-2007 and the other in 2012-2018. This type of infection is more common in any kind of immunocompromised patients, so it can occur in those with hematological malignancies.
Here we present the case of a 27-year-old man, diagnosed with acute lymphoblastic leukemia in relapse and admitted with polyarthralgia for five days, febrile neutropenia, non-abscessed cellulitis, and bacteremia due to methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*. The patient received therapy with oxacillin and cefepime, but the febrile neutropenia persisted. A new set of blood cultures was taken, and antifungal treatment was started because of the suspicion of invasive fungal infection. Arthroconidia were identified in blood cultures and *Geotrichum* spp. was confirmed using matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry. The antifungal treatment was adjusted with amphotericin B deoxycholate for 14 days and voriconazole for four weeks, and after a prolonged stay, the patient was discharged.
Although the incidence of fungemia caused by *Geotrichum* spp. is low, it must be considered in patients with hematological malignancies and persistent febrile neutropenia despite the broadspectrum antimicrobial treatment. The confirmation of fungemia causing agents, with proteomic tools such as the mentioned mass spectrometry, allows treatment adjustment and decreases complications, hospital stay, and mortality.

Key words: Geotrichosis; fungemia; precursor cell lymphoblastic leukemialymphoma; amphotericin B; voriconazole; spectrometry, mass, matrix-assisted laser desorption-ionization.

Recibido: 22/11/2022
Aceptado: 03/05/2023
Publicado: 05/05/2023

Citación:
Álvarez-Rodríguez JC, Blanco-Bustos MP, Cuervo-Maldonado SI, Gómez-Rincón JC, Reyes Á. Geotricosis: fungemia en paciente con leucemia linfoblástica aguda. Biomédica. 2023;43(Supl.1):32-40. https://doi.org/10.7705/biomedica.6779

Correspondencia:
Sonia Isabel Cuervo-Maldonado, Carrera 30 N°45-03, edificio 471, oficina 510, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: (0571) 316 5000, extensión 15012.
sicuervom@unal.edu.co; scuervo@cancer.gov.co

Contribución de los autores:
José Camilo Álvarez-Rodríguez, Sonia Isabel Cuervo-Maldonado, Julio César Gómez-Rincón: diagnóstico y tratamiento del paciente, y resumen del caso clínico
María Paula Blanco-Bustos: búsqueda de la literatura
Ángela Reyes: procesamiento e identificación de la muestra clínica en el laboratorio, toma de las fotografías del hongo en el examen directo y en el cultivo
Todos los autores participaron en la revisión de la literatura y escritura del manuscrito.

Financiación:
El proyecto de investigación, identificado con el código C-19010300473 y del cual se extrae la información para la publicación de este caso clínico, contó con la financiación de recursos de inversión de la nación.

Conflicto de intereses:
Se declara que los autores no presentan conflictos de interés.

La fungemia por *Geotrichum* spp. es poco frecuente y altamente letal. En el Instituto Nacional de Cancerología de Bogotá solo se han presentado dos casos: uno entre los años 2001 a 2007 (Cortés JA, Cuervo SI, Rivas P. Fungemia por hongos diferentes a *Candida* spp. en pacientes con cáncer en el Instituto Nacional de Cancerología, 1999-2006. En: V Encuentro Nacional de Investigación en Enfermedades Infecciosas, Armenia, 2006. Bogotá: Asociación Colombiana de Infectología; 2006. p.104) y el otro, en el periodo comprendido entre el 2012 y el 2018 en el estudio realizado en varias instituciones prestadoras de servicios oncológicos de Bogotá (1). En la serie de casos reportados por Chitasombat *et al.*, *Geotrichum* spp. representa el cuarto agente patógeno en frecuencia (5 % de los casos), con un cociente de riesgo de mortalidad de 111,3 (9,9-1255,2). Los dos aislamientos fueron sensibles a los azoles, resistentes a las equinocandinas y uno resistente a la anfotericina B (2).

Caso clínico

Se presenta el caso de un hombre de 27 años, procedente de Bogotá, vendedor de autopartes, con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda de precursores de células B, de tipo común CD20+, de alto riesgo. Recibió dos ciclos de HyperCVAD y consultó al Instituto Nacional de Cancerología por recaída y poliartralgias de cinco días de evolución, por lo que se le inició el protocolo establecido en el 2003 por el Grupo de Investigación de Leucemia Linfoblástica Aguda en Adultos (GRAALL-2003).

Posteriormente, el paciente cursó con neutropenia febril, celulitis en la mano izquierda –sin abscesos– y bacteriemia por *Staphylococcus aureus* sensible a la meticilina. Se le administró cefapime y oxacilina y se resolvió la bacteriemia.

En el día 21 de hospitalización, el paciente presentó lesiones en el dorso de la mano izquierda, de tipo placa eritemato-edematosa, con descamación leve y fina en la superficie y costra hemática central, así como lesiones en la región escapular e infraescapular derecha con presencia de pápulas de 3 mm, no foliculares, agrupadas, algunas eritematosas y otras eritemato-parduzcas, sin cambio epidérmico. Las lesiones fueron valoradas por el Servicio de Dermatología y dadas las características de aquellas en el dorso de la mano se tomó biopsia de piel para estudio histopatológico. Los resultados no fueron concluyentes para el diagnóstico de micosis y no se hizo cultivo para hongos de la biopsia.

Debido a la persistencia de la neutropenia febril y a la aparición de las lesiones en piel, se sospechó una infección fúngica invasora, por lo que se inició tratamiento con caspofungina. Las tomografías computarizadas (TC) de tórax y de senos paranasales, así como la detección de galactomanano sérico fueron negativas para aspergilosis invasora.

No obstante, a pesar del tratamiento antimicrobiano y antifúngico, el paciente no presentaba mejoría significativa, ya que persistía con fiebre hasta de 40 °C, sin otros síntomas localizadores. El paciente continuó en regular estado general, somnoliento, con palidez mucocutánea leve y con nódulos de 1 cm, blandos, depresibles, indoloros y en los sitios previos de venopunción, sin otros hallazgos de importancia.

Se decidió tomar nuevas muestras para hemocultivo y se solicitó otra biopsia de las lesiones cutáneas. El hemograma evidenció una neutropenia profunda (20 glóbulos blancos por µl) y linfopenia persistente; la proteína C

reactiva fue de 6,15 mg/dl, la albúmina estaba en 1,94 g/dl y la creatinina y las transaminasas fueron normales. En la TC de control de senos paranasales se evidenciaron cambios inflamatorios crónicos incipientes en el seno maxilar derecho; la TC de tórax fue normal, pero en la de abdomen se documentó hepatoesplenomegalia.

En los tres hemocultivos y en el urocultivo del día 28 de hospitalización se visualizaron estructuras levaduriformes, no identificadas en el panel automatizado Yeast ID (BD Phoenix™ 100). Por microscopía se observaron artroconidias y se documentaron colonias compatibles con *Geotrichum* spp. (figura 1), diagnóstico confirmado por espectrometría de masas por láser de matriz asistida de ionización desorción (MALDI-TOF).

Se formuló tratamiento con deoxicolato de anfotericina B en una dosis diaria de 1 mg/kg por 14 días y 400 mg/día de voriconazol por cuatro semanas. Los síntomas clínicos se resolvieron y el paciente se recuperó de la neutropenia en el día 24 del tratamiento antifúngico combinado. Por mejoría clínica, el paciente egresó en el día 101 de hospitalización.

Consideraciones éticas

La descripción del caso clínico corresponde a uno de los casos registrados en el proyecto de investigación “Fungemia en pacientes con neoplasias hematológicas y neutropenia febril postquimioterapia 2012-2018, en instituciones de Bogotá”, aprobado por el Comité de Ética de Investigaciones del Instituto Nacional de Cancerología, identificado con el código C1901300473.

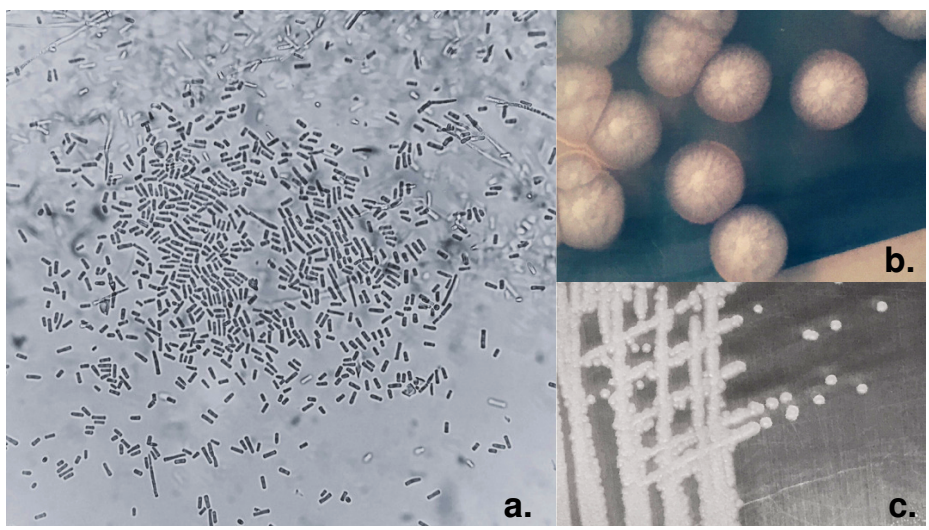


Figura 1. a. Hemocultivo de *Geotrichum* spp., se observan artroconidias hialinas rectangulares, Gram, 100X. b. En el cultivo se observa una colonia de aspecto algodonoso, de color blanco o crema. c. Colonias de *Geotrichum* spp. en agar Sabouraud.

Discusión

El género *Geotrichum* está conformado por 108 especies, pertenece al filo *A*scomycota, orden Saccharomycetales, familia Diposdascaceae (3) y forma artroconidias. El estadio sexual de *Geotrichum candidum* es *Galactomyces candidus*, que inicialmente se pensó que era una especie diferente, pero por secuenciación se confirmó que no era así. *Geotrichum candidum* se encuentra en la tierra, en los detritos vegetales y en la arena de playa; también es utilizado en la fabricación de productos lácteos como quesos y yogurt, entre otros (4). En el ser humano puede colonizar el sistema digestivo, la cavidad oral, el sistema respiratorio, la piel y el cabello (5). Las especies que se consideran potencialmente patógenas para el ser humano son *G. candidum*, *G. capitatum* y *G. clavatum* (4).

La identificación de *Geotrichum* spp. se hace por las características macroscópicas de las colonias –que son blanco-amarillentas– y por los aspectos bioquímicos: *G. capitatum* puede crecer en presencia de cicloheximida mientras que *G. candidum* no puede hacerlo (5). *Geotrichum* spp. se diferencia de *Trichosporon* spp. por la ausencia en la detección de actividad de la enzima ureasa y porque necesita una temperatura óptima de crecimiento de 30 °C (6). Por microscopía se observa que las hifas de las especies de *Geotrichum* se dividen en artrosporas alargadas, por lo que se confunde fácilmente con *Trichosporon* spp. (7), dificultando su identificación por medio de los sistemas automatizados. Sin embargo, los análisis proteómicos mediante MALDITO-F permiten diferenciar *Geotrichum* spp. de otros ascomicetos y basidiomicetos (8,9).

En los pacientes inmunosuprimidos, la infección fúngica invasora por lo general ocurre por hongos de los géneros *Candida* y *Aspergillus*, aunque también por otros emergentes como *Geotrichum* (10), que es el caso del presente reporte clínico. Estas infecciones son frecuentes en pacientes con neoplasias hematológicas malignas, neutropenia y trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (7). A pesar de su baja frecuencia, esta infección fúngica causa alta mortalidad principalmente en los casos de leucemia mieloide aguda (11). En la revisión de Gao *et al*., se describen, en un periodo de 46 años (1965 a 2011), 202 casos de infección fúngica invasora con mortalidad del 50 % (7). Esto es semejante a lo que se presenta en el Instituto Nacional de Cancerología, en donde en un periodo de siete años sólo se encontró un caso de infección fúngica invasora por *Geotrichum* spp.

La infección fúngica invasora por especies de *Geotrichum* también se ha descrito en casos de pacientes con diversos factores de riesgo como el tratamiento con corticoides o antibióticos de amplio espectro, el uso de dispositivos vasculares, la alimentación parenteral y la alteración localizada de la inmunidad por alteración de la piel y las mucosas (úlceras) (10-12).

El registro de infecciones fúngicas invasoras, causadas por levaduras y hongos filamentosos emergentes, ha aumentado porque los laboratorios clínicos disponen de nuevas herramientas diagnósticas para su identificación como los métodos automatizados y proteómicos como MALDITO-F (13). En las Américas, las tasas de morbilidad y mortalidad por infección fúngica invasora están entre el 65 y el 90 % en el grupo de pacientes con neoplasias hematológicas malignas (14).

Dado que la presentación clínica de la infección por levaduras y otros hongos emergentes se puede confundir con la candidiasis invasora (14),

usualmente se prescribe un tratamiento empírico para *Candida* spp. Sin embargo, este tratamiento es inefectivo para los organismos emergentes ya que tienen un comportamiento agresivo y su diagnóstico tardío junto con un tratamiento inadecuado puede ser fulminante (14). En la revisión del registro de FungiScope desde 1976 hasta 2016, en Colombia no se reportaron casos de infección fúngica invasora por *Geotrichum* spp. o *Saprochaete* spp. En Latinoamérica, existe registro hasta el año 2016 de uno a diez casos en Argentina, y uno en Brasil (15). En el Instituto Nacional de Cancerología, como ejemplo de los casos descritos en Colombia sobre infección fúngica invasora por *Geotrichum,* solo se ha informado un caso entre los años 2001 y 2007 (16).

Las rutas de infección son por vía respiratoria, digestiva, gastrointestinal o tegumentaria, especialmente en pacientes con leucemias agudas linfoides o mieloides, con una tasa de infección de 0,5 % (11). La mortalidad que se informa en estudios multicéntricos es mayor del 50 %. En pacientes con neoplasia hematológica maligna y neutropenia las manifestaciones clínicas son similares a las de otras infecciones fúngicas y es difícil diferenciarlas por la clínica del agente causal (14). La mayoría presenta fiebre, a pesar del tratamiento con antimicrobianos de amplio espectro, compromiso de diferentes órganos y pueden aparecer lesiones cutáneas máculo-papulares generalizadas como las que tuvo el paciente de este caso. Según otros reportes clínicos, también se manifiestan como lesiones pápulo-vesiculares o purpúricas que pueden afectar mucosas como la de la faringe (4); el compromiso de la vía aérea puede ser bronquial o pulmonar, caracterizado por tos, dolor pleurítico, derrame pleural y neumotórax espontáneo; en el sistema digestivo puede afectarse la boca, el intestino, el hígado y el bazo, manifestaciones similares a las de la candidiasis crónica diseminada. También se ha descrito compromiso ótico.

Los factores de riesgo descritos en la literatura para el desarrollo de una infección fúngica invasora incluyen neutropenia, inmunodeficiencia, dispositivos vasculares permanentes, tratamiento con agentes inmunosupresores, quimioterapia y antibióticos de amplio espectro (1,17). El control de estos factores de riesgo es una estrategia adecuada para reducir la tasa de mortalidad que, no obstante, sigue siendo alta. En una serie de 26 casos, se reportó el 52 % de mortalidad. Los pacientes presentaron una mejoría en la supervivencia cuando se les retiraron los dispositivos vasculares centrales. Esto evidenció que en un paciente con buen estado funcional y con terapia antifúngica empírica o profiláctica se puede reducir la probabilidad de mortalidad (18). Por otro lado, García-Ruiz y colegas reportaron una serie de cinco de casos de infección por *G. capitatum*: cuatro en pacientes con leucemia aguda y uno con linfoma de Burkitt. Los pacientes presentaban neutropenia profunda y prolongada, y estaban bajo un esquema de quimioterapia de inducción o rescate. Su mortalidad fue del 60 % (19) dada la persistencia de factores de riesgo como la neutropenia y la quimioterapia.

Para el diagnóstico etiológico de *Geotrichum* spp., la primera herramienta por mencionar es la histopatología, útil en la descripción del tipo de infiltrado y la identificación de la morfología y el tamaño de las hifas mediante la tinción de Grocott-Gomori a base de plata con metenamina (17). No obstante, existen características fenotípicas compartidas con otras especies de hongos que no permiten determinar puntualmente el agente etiológico. Por otro lado, el hemocultivo usualmente es positivo en el 70 % de los pacientes con enfermedad por *Geotrichum* spp.*,* mientras que para *Candida* spp. es menor del 50 %. También se puede identificar por medio de un cultivo de esputo

y en el caso de diseminación cutánea se puede evaluar con los hallazgos histopatológicos y el cultivo de piel en medio específico para hongos. Cuando el compromiso es pulmonar, en la TC se pueden observar nódulos con aumento de la densidad de los tejidos blandos.

Las pruebas inmunológicas para identificar anticuerpos dirigidos contra moléculas de la pared del hongo, como el 1,3 beta-D-glucano y el galactomanano, son de uso frecuente en pacientes inmunosuprimidos como aquellos con neoplasias hematológicas malignas. El 1,3 beta-D-glucano es usado cuando se sospechan infecciones por *Aspergillus* spp. y *Candida* spp., pero tiene poco impacto para identificar especies de *Geotrichum* spp. El galactomanano se recomienda como parte de la estrategia para la prescripción de tratamiento antifúngico anticipado, aunque un resultado positivo puede indicar la presencia de otros hongos. El seguimiento en el tiempo de los resultados de esta prueba es más aplicable para detectar infección por *Aspergillus* spp. y puede ser de utilidad en infecciones por *Geotrichum* spp. (20). El interés por identificar la especie se fundamenta en su utilidad para la selección del tratamiento antifúngico adecuado, por lo que la aplicación de la espectrometría de masas MALDI-TOF es de gran utilidad en estos casos (17).

Para el tratamiento se debe tener en cuenta la sensibilidad *in vitro* de *Geotrichum* spp. para anfotericina B, flucitosina, fluconazol, itraconazol y voriconazol (21). La concentración inhibitoria mínima de fluconazol va de 16 a 32 µg/ml, siendo categorizada por el *National Committee for Clinical Laboratory Standards* como sensible dependiendo de la dosis. Varias cepas fueron sensibles *in vitro* a la flucitosina, aunque su toxicidad hematológica hace que este antifúngico sea poco atractivo para el tratamiento en pacientes con neoplasias hematológicas malignas. Además, el voriconazol muestra una alta actividad *in vitro* comparable al itraconazol (22). Pocos estudios clínicos describen la sensibilidad de *Geotrichum* spp. a los antifúngicos; Miglietta *et al*. describen en un caso clínico de *G. capitatum,* una concentración inhibitoria mínima de 0,5 µg/ml para anfotericina B y voriconazol; de 0,12 µg/ml para voriconazol e itraconazol; de 2 µg/ml para anidulafungina; de 8 µg/ml para caspofungina y micofungina, y de 16 µg/ml para flucitosina y fluconazol (17).

Los reportes de caso sugieren que la eficacia de la anfotericina B y el voriconazol es mayor que la reportada para el fluconazol, el itraconazol o la flucitosina (4,7), tal y como lo confirma el caso clínico en cuestión, donde el paciente logró control de la infección fúngica invasora con el tratamiento mencionado. La ventaja de esta combinación también se evidenció en un grupo de 13 pacientes, de los cuales 12 se curaron con el uso de la anfotericina B: cinco fueron tratados con anfotericina en monoterapia, mientras que los restantes recibieron una combinación de anfotericina B con otro antifúngico (23). En otra serie de casos, a uno de los 6 pacientes reportados se le suministró terapia combinada de anfotericina B y voriconazol, siendo el único sobreviviente, junto con otro paciente que recibió monoterapia con fluconazol (4,24).

La disponibilidad de nuevos antifúngicos, como el posaconazol y el isavuconazol, en la profilaxis antifúngica en pacientes con alto riesgo de presentar infección invasora puede ser una estrategia efectiva para disminuir su incidencia (7,24). El isavuconazol tiene una acción potente *in vitro* frente a especies atípicas de levaduras como *Trichosporon*, *Saccharomyces*, *Geotrichum*, *Pichia* y *Rhodotorula* con valores de concentración inhibitoria

mínima similares al del voriconazol y el posaconazol (24). De igual forma, el posaconazol no está directamente indicado para *Geotrichum* spp., aunque es un antifúngico que ha demostrado tener una concentración mínima inhibitoria semejante a la del isavuconazol para esta levadura, por lo que puede ser una alternativa terapéutica cuando se requiera (24,25).

El tratamiento recomendado por la *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* y, posteriormente, por la *European Confederation of Medical Mycology* para la fungemia por *Geotrichum* spp. es la anfotericina B en liposomas, que se prefiere sobre la no liposómica ya que esta última presenta mayor actividad nefrotóxica (12). También se recomienda el deoxicolato de anfotericina B con flucitosina o sin ella, así como la terapia con voriconazol (26,27), con la que se ha logrado una experiencia terapéutica positiva (28), evidenciada en este reporte de caso.

Por otro lado, no se recomienda el uso de equinocandinas (caspofungina o micafungina) ni de fluconazol, ya que los valores altos de sus concentraciones inhibitorias mínimas para *Geotrichum* spp. y *Trichosporon* spp. sugieren una pobre respuesta terapéutica; en caso de que el paciente esté en tratamiento con alguno de estos antifúngicos sin presentar mejoría, podría aumentar la sospecha de infección fúngica invasora por hongos naturalmente resistentes a equinocandinas, como por ejemplo, *Geotrichum* spp. (24).

En conclusión, la infección por *Geotrichum* spp. en pacientes con neoplasias hematológicas malignas, especialmente aquellos con leucemia aguda, genera una alta probabilidad de mortalidad. Por lo tanto, la búsqueda de microorganismos oportunistas emergentes como *Geotrichum* spp. en pacientes con malignidad hematológica, sin respuesta al tratamiento antimicrobiano, como a equinocandinas, permitiría sospechar de una infección por hongos y levaduras emergentes.

La identificación de los agentes etiológicos infecciosos requiere, además de la sospecha clínica, del uso de diferentes tipos de herramientas como hemocultivos, pruebas para la detección de lipopolisacáridos de hongos (galactomanano), análisis proteómicos, imágenes de tomografía y estudios histopatológicos. Una correcta identificación de la especie patógena permitirá prescribir un tratamiento antifúngico adecuado que, en conjunto con la recuperación de la neutropenia en los pacientes con leucemia aguda, puede tener un impacto positivo en la supervivencia de este grupo de pacientes.

Referencias

1. Vargas-Espíndola LA, Cuervo-Maldonado SI, Enciso-Olivera JL, Gómez-Rincón JC, Jiménez-Cetina L, Sánchez-Pedraza R, *et al.* Fungemia in hospitalized adult patients with hematological malignancies: epidemiology and risk factors. J Fungi. 2023;9:400. https://doi.org/10.3390/jof9040400
2. Chitasombat MN, Kofteridis DP, Jiang Y, Tarrand J, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Rare opportunistic (non-*Candida,* non-*Cryptococcus)* yeast bloodstream infections in patients with cancer. J Infect. 2012;64:68-75. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2011.11.002
3. Link HF. Geotrichum. Mycobank Database. Fecha de consulta: 22 agosto de 2022. Disponible en: https://www.mycobank.org/page/Name%20details%20page/39099
4. Trabelsi H, Néji S, Gargouri L, Sellami H, Guidara R, Cheikhrouhou F, *et al. Geotrichum capitatum* septicemia: case report and review of the literature. Mycopathologia. 2015;179:465-9. https://doi.org/10.1007/s11046-015-9869-2
5. Bonifaz Trujillo A. Geotricosis e infecciones por *Saprochaete* spp. En: Serrano H, editor. Micología médica básica. Cuarta edición. Ciudad de México: McGraw-Hill; 2012. p. 366-72.

6. Miguel-Martínez I, Pintos-Fonseca AM, Rosario-Quintana C, Ojeda-Vargas M. Infección sistémica en paciente inmunodeprimido. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011;29:545-6. https://doi.org/10.1016/j.eimc.2010.11.008

7. Gao G-X, Tang H-L, Zhang X, Xin X-L, Feng J, Chen X-Q. Invasive fungal infection caused by *Geotrichum capitatum* in patients with acute lymphoblastic leukemia: a case study and literature review. Int J Clin Exp Med. 2015;8:14228-35.

8. Velk A, Kolecka A, Khayhan K, Theelen B, Groenewald M, Boel E, *et al.* Interlaboratory comparison of sample preparation methods, database expansions, and cutoff values for identification of yeasts by matrix-assisted laser desorption ionizationtime of flight mass spectrometry using a yeast test panel. J Clin Microbiol. 2014;52:3023-9. https://doi.org/10.1128/JCM.00563-14

9. Pasteraro B, Ruggeri A, De Carolis E, Torelli R, Vella A, De Maio F, *et al.* Comparative evaluation of BD Phoenix and Vitek 2 systems for species identification of common and uncommon pathogenic yeasts. J Clin Microbiol. 2013;51:3841-5. https://doi.org/10.1128/JCM.01581-13

10. Pastor-Tudela AI, Pérez-González D, Jiménez-Montero B, de Malet Pintos-Fonseca A. Fungemia relacionada con catéter por *Geotrichum capitatum* en una paciente pediátrica inmunocompetente. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2021;39:363-4. https://doi.org/10.1016/j.eimc.2020.09.018

11. Schuermans C, van Bergen M, Coorevits L, Verhaegen J, Lagrou K, Surmont I, *et al.* Breakthrough *Saprochaete capitata* infections in patients receiving echinocandins: case report and review of the literature. Med Mycol. 2011;49:414-8. https://doi.org/10.3109/13693786.2010.535179

12. Schiemann R, Glasmacher A, Bailly E, Horré R, Molitor E, Leutner C, *et al. Geotrichum capitatum* septicaemia in neutropenic patients: case report and review of the literature. Mycoses. 1998;41:113-6. https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.1998.tb00311.x

13. Pagano L, Caira M, Nosari A, Van Lint MT, Candoni A, Offidani M, *et al.* Fungal infections in recipients of hematopoietic stem cell transplants: results of the SEIFEM B-2004 study--Sorveglianza Epidemiologica Infezioni Fungine Nelle Emopatie Maligne. Clin Infect Dis. 2007;45:1161-70. https://doi.org/10.1086/522189

14. Vallejo Llamas JC, Ruiz-Camps I. Infección fúngica invasora en los pacientes hematológicos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2012;30:572-9. https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.08.003

15. Durán Graeff L, Seidel D, Vehreschild MJ, Hamprecht A, Kindo A, Racil Z, *et al.* Invasive infections due to *Saprochaete* and *Geotrichum* species: Report of 23 cases from the FungiScope Registry. Mycoses. 2017;60:273-9. https://doi.org/10.1111/myc.12595

16. Cortés JA, Reyes P, Gómez C, Buitrago G, Leal AL. Fungal bloodstreams infections in tertiary care hospitals in Colombia. Rev Iberoam Micol. 2011;28:74-8. https://doi.org/10.1016/j.riam.2010.12.002

17. Miglietta F, Vella A, Faneschi ML, Lobreglio G, Rizzo A, Palumbo C, *et al. Geotrichum capitatum* septicaemia in a haematological patient after acute myeloid leukaemia relapse: identification using MALDI-TOF mass spectrometry and review of the literature. Infez Med. 2015;23:161-7.

18. Martino R, Salavert M, Parody R, Tomás JF, De la Cámara R, Vásquez L, *et al. Blastoschizomyces capitatus* Infection in patients with leukemia: report of 26 cases. Clin Infect Dis. 2004;38:335-41. https://doi.org/10.1086/380643

19. García-Ruiz JC, López-Soria L, Olazábal I, Amutio E, Arrieta-Aguirre I, Velasco-Benito V, *et al.* Invasive infections caused by *Saprochaete capitata* in patients with haematological malignancies: Report of five cases and review of the antifungal therapy. Rev Iberoam Micol. 2013;30:248-55. https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.02.004

20. Giacchino M, Chiapello N, Bezzio S, Fagioli F, Saracco P, Alfarano A, *et al. Aspergillus* galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay cross-reactivity caused by invasive *Geotrichum capitatum*. J Clin Microbiol. 2006;44:3432-4. https://doi.org/10.1128/JCM.00856-06

21. Girmenia C, Pagano L, Martino B, D'Antonio D, Fanci R, Specchia G, *et al.* Invasive infections caused by *Trichosporon* species and *Geotrichum capitatum* in patients with hematological malignancies: a retrospective multicenter study from Italy and review of the literature. J Clin Microbiol. 2005;43:1818-28. https://doi.org/10.1128/JCM.43.4.1818-1828.2005

22. Gadea I, Cuenca-Estrella M, Prieto E, Díaz-Guerra TM, García-Cia JI, Mellado E, *et al.* Genotyping and antifungal susceptibility profile of *Dipodascus capitatus* isolates causing disseminated infection in seven hematological patients of a tertiary hospital. J Clin Microbiol. 2004;42:1832-6. https://doi.org/10.1128/JCM.42.4.1832-1836.2004

23. Fianchi L, Montini L, Caira M, Voso MT, Maviglia R, Posteraro B, *et al.* Combined voriconazole plus caspofungin therapy for the treatment of probable *Geotrichum* pneumonia in a leukemia patient. Infection. 2008;36:65-7. https://doi.org/10.1007/s15010-007-6235-4

24. Thompson GR 3rd, Wiederhold NP, Sutton DA, Fothergill A, Patterson TF. *In vitro* activity of isavuconazole against *Trichosporon*, *Rhodotorula*, *Geotrichum*, *Saccharomyces* and *Pichia* species. J Antimicrob Chemother. 2009;64:79-83. https://doi.org/10.1093/jac/dkp138

25. Carrillo-Munoz AJ, Tur-Tur C, Hernández-Molina JM, Quindós G, Marcos-Arias C, Eraso E, *et al.* Antifungal activity of posaconazole against Candida spp. and non-Candida clinical yeasts isolates. Rev Esp Quimioter. 2010;23:122-5.

26. Arendrup MC, Boekhout T, Akova M, Meis JF, Cornely OA, Lortholary O, *et al.* ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of rare invasive yeast infections. Clin Microbiol Infect. 2014;20:76-98. https://doi.org/10.1111/1469-0691.12360

27. Chen SC, Perfect J, Colombo AL, Cornely OA, Groll AH, Seidel D, *et al.* Global guideline for the diagnosis and management of rare yeast infections: an initiative of the ECMM in cooperation with ISHAM and ASM. Lancet Infect Dis. 2021;21:375-86. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00203-6

28. Saghrouni F, Abdeljelil J Ben, Youssef Y Ben, Abdeljelil N Ben, Gheith S, Fathallah A, *et al.* *Geotrichum capitatum* septicemia in patients with acute myeloid leukemia. Report of three cases. Med Mycol Case Rep. 2012;1:88-90. https://doi.org/10.1016/j.mmcr.2012.09.003

Biomédica 2023;43(Supl.1):41-56
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.6925

Presentación de caso

Fusariosis en pacientes con cáncer: serie de 13 casos y revisión de la literatura

Sonia Isabel Cuervo-Maldonado[1,2,3], José Camilo Álvarez-Rodríguez[2,3], Cristian Leonardo Cubides[2,3], Juan Camilo Barrera[2,3], Juan Diego Montañez-Abril[1,3], Erika Paola Vergara-Vela[1], Carlos Humberto Saavedra-Trujillo[1,4], María José López-Mora[3,5], Gloria Elena Mora-Figueroa[5], Adriana Celis-Ramírez[6], Rose Mary Jaramillo-Calle[2], Rafael Parra-Medina [7]

[1] Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia
[2] Grupo de Infectología, Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá, D.C., Colombia
[3] Grupo de Investigación en Enfermedades Infecciosas en Cáncer y Alteraciones Hematológicas (GREICAH), Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia
[4] Grupo de Enfermedades Infecciosas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia
[5] Grupo de Infectología, Clínica de Marly, Bogotá, D.C., Colombia
[6] Grupo de Investigación Celular y Molecular de Microorganismos Patógenos (CeMoP), Universidad de los Andes, Bogotá, D.C., Colombia
[7] Grupo de Investigación Patología Oncológica INC, Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá, D.C., Colombia

La fusariosis es una micosis oportunista producida por *Fusarium* spp. Su presentación clínica depende del estado inmunológico del huésped, especialmente, el de aquellos con enfermedades hematooncológicas, cuyas manifestaciones varían desde formas localizadas hasta infección fúngica invasora. El cultivo de piel o de sangre permite orientar el tratamiento antifúngico combinado con anfotericina B y voriconazol.
Se presentan 13 casos de pacientes con cáncer en un periodo de once años que desarrollaron fusariosis diseminada; asimismo, se hizo con una revisión extensa de la literatura.
En esta serie de casos, la mortalidad fue del 61,5 % (8/13), a pesar del uso del antifúngico. De los 13 pacientes, 11 tenían neoplasia hematológica y 2 neoplasia sólida. El factor de riesgo más importante fue la neutropenia profunda. El compromiso de la piel y los hemocultivos positivos facilitaron la prescripción del tratamiento combinado en la mayoría de los casos. La neutropenia febril persistente asociada a lesiones cutáneas, la onicomicosis, los nódulos o las masas pulmonares permitieron sospechar una infección fúngica invasora por *Fusarium* spp.
El objetivo de la presentación de esta serie de casos es recordar el diagnóstico de fusariosis a la comunidad médica en contacto con pacientes oncológicos, con neutropenia febril profunda y persistentes.

Palabras clave: *Fusarium*; fungemia; anfotericina B; voriconazol; espectrometría de masa por láser de matriz asistida de ionización desorción.

Fusariosis in cancer patients: 13 case series report and literature review

The fusariosis is an opportunistic mycosis caused by *Fusarium* spp. Its clinical presentation depends on the immunological status of the host, especially in patients with hemato-oncological diseases, whose manifestations vary from localized to invasive fungal infections. Skin or blood culture helps to guide combined antifungal treatment with amphotericin B and voriconazole.
Here, we present 13 cases in a period of eleven years of patients with cancer who developed disseminated fusariosis and their outcomes, together with a review of the related literature.
In this series of cases, mortality was 61.5 % (8/13), despite the use of the antifungal. Out of the 13 cases, 11 had hematological neoplasia and 2 solid neoplasia. The most determinant risk factor was profound neutropenia. Skin involvement and positive blood cultures in most cases allowed combined treatment prescription. Persistent febrile neutropenia associated with skin lesions, onychomycosis, nodules, or lung masses lead to suspicion of *Fusarium* spp. fungal invasive infection.
The aim of this series of cases is to remind healthcare professionals that oncological patients with deep and persistent febrile neutropenia can develop fusariosis.

Key words: *Fusarium*; fungemia; amphotericin B; voriconazole; spectrometry, mass, matrix-assisted laser desorption-ionization.

Recibido: 17/03/2023
Aceptado: 07/06/2023
Publicado: 07/06/2023

Citación:
Cuervo-Maldonado SI, Álvarez-Rodríguez JC, Cubides CL, Barrera JC, Montañez-Abril JD, Vergara-Vela EP, *et al*. Biomédica. 2023;43(Supl.1):41-56.
https://doi.org/10.7705/biomedica.6925

Correspondencia:
Sonia Isabel Cuervo-Maldonado, Carrera 30 N°45-03, edificio 471, oficina 510, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: (057-1) 316 5000, extensión 15012
sicuervom@unal.edu.co; scuervo@cancer.gov.co

Contribución de los autores:
Sonia Isabel Cuervo-Maldonado: concepción del trabajo de investigación y del informe de casos, diseño, redacción, revisión crítica y aprobación final de la versión para publicar
José Camilo Álvarez-Rodríguez: revisión crítica y redacción del manuscrito
Cristian Leonardo Cubides: búsqueda de la información, elaboración de las figuras y redacción del manuscrito
Juan Camilo Barrera: revisión de la información clínica de las lesiones en la piel y redacción del manuscrito
Juan Diego Montañez-Abril: búsqueda de las referencias bibliográficas y redacción del manuscrito
Erika Paola Vergara-Vela, Carlos Humberto Saavedra-Trujillo, María José López Mora y Gloria Elena Mora-Figueroa: búsqueda de casos y redacción del manuscrito
Adriana Celis-Ramírez y Rose Mary Jaramillo-Calle: estudio en el laboratorio de muestras de pacientes, recolección de datos y redacción del manuscrito
Rafael Parra-Medina: estudio histopatológico de las lesiones de piel y redacción del manuscrito
Todos los autores declaramos que hemos participado en la concepción, el diseño y la redacción del manuscrito.

Financiación:
Este estudio no contó con financiación para su realización.

Conflicto de intereses:
María José López Mora es conferencista de Pfizer y del grupo Biotoscana, recibe patrocinio para asistir a congresos de Pfizer, Biotoscana y MSD. Los demás autores declaran no tener conflictos de interés.

Fusarium spp. es un hongo ubicuo en la naturaleza, filamentoso, hialino y tabicado que hace parte de las hialohifomicosis y produce enfermedad en las plantas, los animales y el hombre.

La infección puede ser localizada o diseminada (infección fúngica invasora). Esta última es la forma predominante en pacientes inmunocomprometidos como aquellos con neoplasias hematológicas, leucemias agudas, o que han sido sometidos a trasplante de progenitores hematopoyéticos o de órgano sólido. En estos pacientes, la mortalidad puede alcanzar el 45 %. Una neutropenia grave –con menos de 100 células por µl– con una duración mayor de siete días, altas dosis de corticoides y linfopenia se han identificado como factores de riesgo para el desarrollo de fusariosis.

En Colombia, la infección fúngica invasora se ha informado esporádicamente como reporte de caso, sin que a la fecha y en conocimiento de los autores se disponga de una revisión sistemática o de un informe de serie de casos que permita identificar sus particularidades.

Esta serie de casos presenta las características epidemiológicas, clínicas, diagnósticas y terapéuticas en pacientes con cáncer para orientar a la comunidad médica, que trata este grupo de pacientes, sobre la búsqueda activa de la infección fúngica invasora por *Fusarium*.

Casos clínicos

De la base de datos de un estudio de investigación sobre fungemia en pacientes con neoplasias hematológicas en instituciones de Bogotá, desarrollado entre el 2012 y el 2019 (código C19010300-473), y con la información del sistema de vigilancia activa institucional desde el 2020 en adelante, se identificaron 13 pacientes con cáncer y diagnóstico de fusariosis entre el 2012 hasta el 2022. La investigación fue aprobada por los comités de ética de las instituciones participantes y debido a las características del estudio retrospectivo no se necesitó de consentimiento informado.

Las características demográficas, clínicas, micológicas y terapéuticas, y los desenlaces se presentan en el cuadro 1.

De los 13 casos, 6 eran mujeres, la mediana de edad fue 41 años; 11 tenían diagnóstico de neoplasia hematológica: 8 con leucemia aguda y 3 con linfoma; solo 2 pacientes tenían cáncer sólido: 1 con tumor germinal no seminomatoso y antecedentes de trasplante de progenitores hematopoyéticos autólogo y 1 con sarcoma fusocelular retroperitoneal de alto grado. Doce pacientes estaban en tratamiento activo del cáncer con quimioterapia antes del diagnóstico de fusariosis y cuatro estaban en diferentes tiempos posterior al trasplante de progenitores hematopoyéticos. La mediana del recuento absoluto de neutrófilos fue de 20 células por µl en el momento del diagnóstico de la fusariosis, con excepción de un paciente con sarcoma fusocelular retroperitoneal, que presentó un recuento absoluto de neutrófilos de 15.322 células por µl.

Entre las características clínicas para el diagnóstico de fusariosis, se encontró el compromiso de la piel, con lesiones tipo mácula, pápula o nódulos eritematosos de distribución aleatoria en 7 de los 13 casos y uno de los pacientes presentó compromiso oftálmico (endoftalmitis) (figura 1A-1F). La prueba de galactomanano sérico –presente en la pared celular fúngica– se practicó en 5 de los 13 pacientes y sólo uno tuvo un valor de galactomanano de 1,3 ng/ml (considerado elevado) en el momento del diagnóstico de fusariosis.

Cuadro 1. Descripción de casos clínicos de pacientes con infección por *Fusarium* spp.

	Edad	Sexo	Neoplasia	Estado del cáncer	Esquema de quimioterapia	Recuento absoluto de neutrófilos	Especie	Cultivo	Coinfección	Profilaxis antifúngica	Tratamiento	Galactomanano	Desenlace
1	53+	M	LMA	Progresión	7+3	10	*Fusarium* spp.	Piel y sangre (hemocultivo positivo a los 3 días, 5 horas y 4 minutos de incubación)	*Corynebacterium striatum*	Posaconazol (previo al ingreso y durante 26 días intrahospitalarios)	Anf B liposómica (16 días) + VCZ (6 días); Al egreso con VCZ	0,062	Vivo
2	27++	H	Linfoma/LLA	Recaída	HyperCVAD	0	*Fusarium solani*	Piel y sangre (hemocultivos 2/2 positivos a las 44,15 horas y a las 32,14 horas de incubación)	*Corynebacterium jeikeium*	Fluconazol (al inicio de la quimioterapia)	Anf B (14 días) + VCZ (10 días)	No	Fallece
3	21	H	LLA PreB	Resistente al tratamiento	GRAALL	20	*Fusarium* spp.	Piel y sangre	*Enterococcus faecium*		Anf B liposómica + VCZ	0,051	Fallece
4	25	H	Tumor germinal no seminomatoso	Progresión	PosTPH hematopoyéticos autólogo, preinjerto (día +8)	30	*Fusarium* spp.	Piel y sangre	*Escherichia coli*		Anf B liposómica +VCZ	No	Fallece
5	33	M	Linfoma Hodgkin clásico, tipo esclerosis nodular	Postrasplante preinjerto (día +14)	TPH alogénico	30	*Fusarium oxysporum*	Sangre a través de catéter y periférica (hemocultivos positivos a las 49,4 horas y a las 85,21 horas respectivamente)	No documentadas	Fluconazol (al inicio de la quimioterapia)	Anf B liposómica (18 días) + VCZ (32 días); al egreso con VCZ	0,068	Vivo
6	54	H	LMA	Tercera recaída	Postrasplante de progenitores hematopoyéticos alogénico haploidéntico, pre-injerto (día+19)	1	*Fusarium* spp.	Piel y sangre	No documentadas		Anf B liposómica +VCZ	No	Fallece
7	49*	H	Linfoma NK extraganglionar	Recaída	TPH alogénico en recaída - GDP	0	*Fusarium solani*	Sangre y SPN (hemocultivo positivo a los 71,25 horas)	*Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa	Voriconazol 100 mg/cada 12 horas (previo al ingreso y durante la quimioterapia)	Anf B (8 días) +VCZ (8 días a dosis de 200 mg/12 horas)	No	Fallece
8	17	H	LLA PreB	Resistente al tratamiento	ALL-R3	50	*Fusarium* spp.	Piel y sangre	No documentadas		Anf B +VCZ	0,053	Fallece
9	41	M	LMA (M3)	Recaída	7+3	20	*Fusarium* spp.	Piel y sangre	Actinomyces		VCZ	No	Fallece
10	64	M	Sarcoma fusocelular de alto grado retroperitoneal	Progresión	Ninguno	15322	*Fusarium solani*	Sangre (hemocultivo positivo a las 78,16 horas	No documentadas		Ninguno (diagnóstico post mortem)	No	Fallece
11	49	H	LLA	Progresión	Hyper CVAD	30	*Fusarium* spp.	Orina (Sin reporte de tiempo de positividad)	No documentadas		VCZ (7 días intrahospitalario)	No	Vivo
12	44	M	LLA PreB	Progresión	IDA FLAG	20	*Fusarium* spp.	Sangre (hemocultivos positivos a los 84,3 horas y a las 96,89 horas)	No documentadas	Fluconazol (previo al inicio de la quimioterapia)	Anf B (24 días) + VCZ (27 días)	No	Vivo
13	19	M	LLA PreB	Recaída	IDA FLAG	18	*Fusarium* spp.	Sangre (hemocultivos positivos a los 101,45 horas y a las 90,40 horas)	No documentadas	Fluconazol (previo al inicio de la quimioterapia)	VCZ (34 días)	1,3	Vivo

LMA: leucemia mieloide aguda; LLA: leucemia linfoblástica aguda; TPH: trasplante de progenitores hematopoyéticos; SPN: senos paranasales; Anf B: anfotericina B; VCZ: voriconazol

\+ Pacientes a quienes se les realizó biopsia de piel

++ Descripción de la biopsia de piel correspondiente a la figura.



Figura 1. Hallazgos clínicos de los pacientes con manifestaciones cutáneas u oftálmicas por *Fusarium* spp. **A.** Lesiones nodulares eritematosas, algunas en fase costrosa con compromiso de miembros inferiores (caso 8). B**.** Lesiones pápulo-nodulares diseminadas en cabeza, tronco y extremidades (caso 2). **C.** Paroniquia del dedo gordo del pie izquierdo (caso 4). **D.** Endoftalmitis aguda unilateral (caso 6) **E.** Máculas, pápulas y placas eritematosas en toda la región abdominal con distribución aleatoria, algunas con costra necrótica central. **F.** Lesión nodular eritematosa en el hombro izquierdo (caso 4).

En 12 casos, la identificación de *Fusarium* spp. se hizo a partir de hemocultivos (figura 2A) y en 6 de hemocultivos y piel; en 6 pacientes se documentó coinfección bacteriana, dos con *Corynebacterium* spp., uno con *Actinomyce*s spp., otro con *Enterococcus faecium* y dos con *Enterobacterales*.

En tres casos se obtuvo biopsia de piel (figura 3A y 3B). Los hallazgos de la biopsia, teñida con hematoxilina y eosina, mostraron piel revestida por epidermis de espesor usual, dermis con mínimo infiltrado inflamatorio mononuclear sin atipia, ni otros hallazgos relevantes. Las coloraciones con ácido peryódico de Schiff y la de Gomori resaltaron escasas estructuras micóticas en forma de hifas ramificadas en las luces vasculares. Los hallazgos histopatológicos sugirieron infección por *Fusarium* spp. como primera posibilidad. En cuatro aislamientos, mediante la espectrometría de masa de desorción-ionización láser, asistida por matriz (MALDI-TOF) (figura 4), se identificó la especie: en tres casos fue *Fusarium solani* y en uno, *F. oxysporum*; los nueve restantes se clasificaron como *Fusarium* spp.

En nueve casos, el tratamiento antifúngico fue una combinación de anfotericina B y voriconazol; tres pacientes recibieron monoterapia con voriconazol y uno no alcanzó a recibir tratamiento porque el diagnóstico fue *post mortem*. Finalmente, solo en cinco pacientes la supervivenca superó los 28 días.

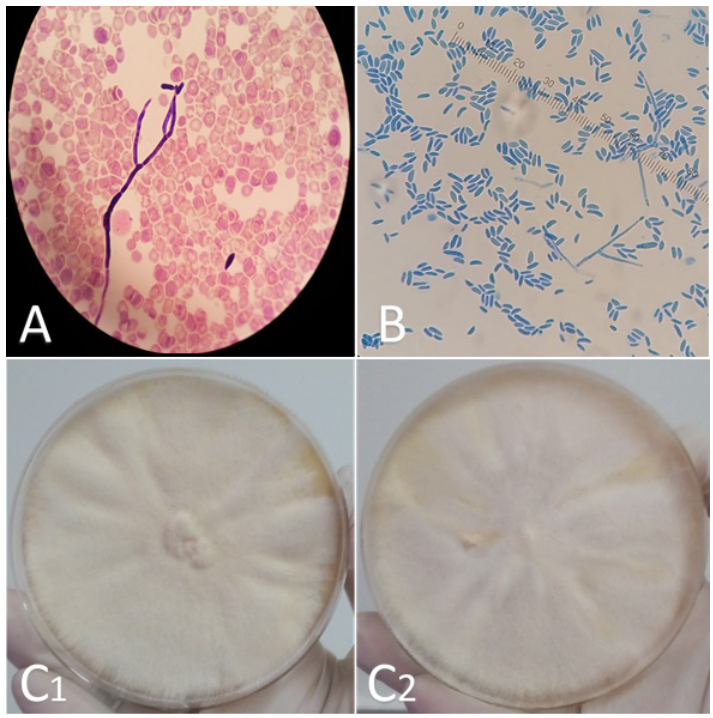


Figura 2. Diagnóstico micológico: **A.** Coloración de Gram de un hemocultivo, 100X. Se observa hifa septada o tabicada y macroconidias en forma de banana. **B.** Examen directo de cultivo con coloración de azul de lactofenol, 400X. Se observan macroconidias de *Fusarium* spp. en hemocultivo. **C.** Apariencia de las colonias crecidas en agar Sabouraud (anverso). C1. Cultivo de *Fusarium solani*; C2. Cultivo de *Fusarium oxysporum.*

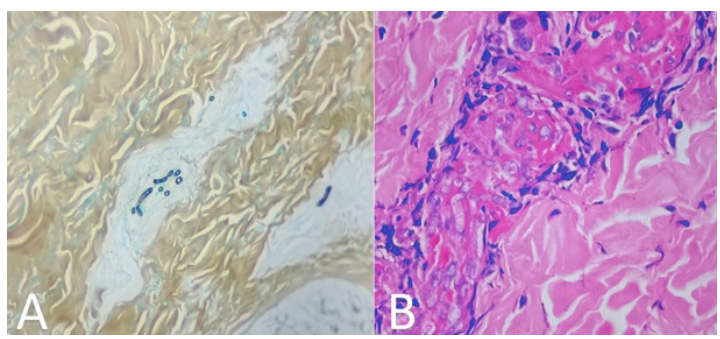
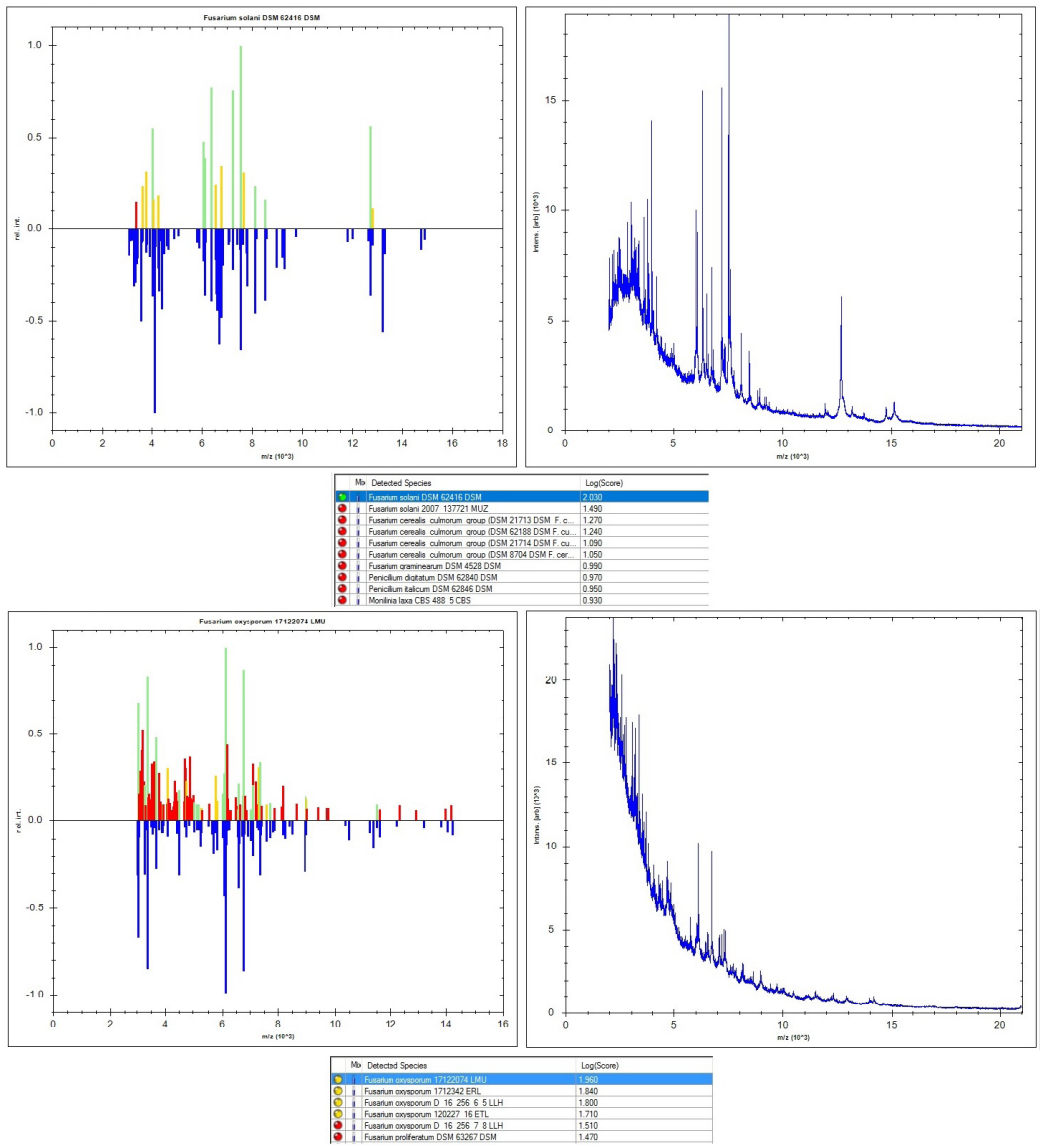


Figura 3. Hallazgos histopatológicos en biopsia de piel: **A.** Se resalta la presencia de escasas estructuras micóticas en forma de hifas ramificadas en las luces vasculares. Gomori, 10X. Los hallazgos histopatológicos sugieren infección por *Fusarium* spp. como primera posibilidad. **B.** Se observa piel revestida por epidermis de espesor usual, dermis con mínimo infiltrado inflamatorio mononuclear, sin atipia ni otros hallazgos relevantes. Hematoxilina y eosina, 20X.



Arriba: *Fusarium solani*; abajo: *Fusarium oxysporum*

Figura 4. Identificación de especies de *Fusarium* mediante espectrometría de masas de desorción-ionización láser, asistida por matriz (MALDI-TOF).

Epidemiología

La fusariosis invasiva es una enfermedad infrecuente (1) que afecta niños y adultos (2). Está asociada a neoplasia hematológica en el 87 % de los casos (1). Aunque es un hongo ubicuo en la naturaleza, la prevalencia de la infección invasiva es bastante baja, estimada entre el 0,06 y el 0,13 % en pacientes con neoplasias hematológicas (3). También se ha asociado a trasplante de órgano sólido con una incidencia de 5,97 casos por 1.000 trasplantes de órgano sólido (2). En el *MD Anderson Cancer Center*, entre 1998 y 2009, se encontraron 44 casos de fusariosis invasiva: el 84 % se presentó en pacientes con leucemias agudas o síndromes mielodisplásicos y el 16 % en pacientes con leucemias crónicas o linfomas (4). Del total, el 48 % fue sometido a trasplante de progenitores hematopoyéticos y el 52 % a dosis altas de esteroides en los 30 días anteriores al diagnóstico (4), datos similares a los encontrados en esta serie de casos.

La prevalencia de fusariosis en pacientes con trasplante de progenitores hematopoyéticos y leucemia mieloide aguda en Estados Unidos y Europa es menor del 1 %, mientras que en Sudamérica es del 5 % en pacientes con trasplante de progenitores hematopoyéticos (5). La especie varía por región; por ejemplo, el complejo de especies *Fusarium fujikuroi* es predominante en Europa (6), mientras que el complejo de especies *Fusarium solani* es común en Brasil (7). En Colombia, a la fecha no se dispone de información al respecto, los casos clínicos descritos se informan como *Fusarium* spp (8) y solo en un caso se identificó la especie *F. verticilloides* (9).

Etiología y factores de riesgo

Las especies de *Fusarium* son mohos ubicuos (4), filamentosos, tabicados, que se bifurcan en ángulo agudo; son comunes en el suelo (10) y el agua (2). El género *Fusarium* está comprendido por 78 especies y 10 complejos de especies. Los complejos más frecuentes que causan infección en humanos son: *F. solani, F. oxysporum, F. incarnatum-equiseti, F. chlamydosporum, F. tricinctum, F. dimerum* y *F. fujikuroi* (6,11).

Las especies de *Fusarium* causantes de infecciones invasivas y diseminadas en humanos son del complejo *Fusarium solani* (50 % de los casos notificados) (3,8), *Fusarium oxysporum* (20 %) y *Fusarium verticillioides,* que forma parte del complejo *Fusarium fujikuroi* (responsable del 20 % de las infecciones).

De los once años en los que se recopiló la serie de casos, solo en los últimos cuatro las instituciones participantes dispusieron de MALDI-TOF con la que lograron la identificación de especies en cuatro casos: las especies *F. solani* y *F. oxysporum* (figura 4) fueron las más frecuentes y causantes de infección fúngica invasora, lo cual concuerda con lo descrito en la literatura.

Las especies de *Fusarium* poseen varios factores de virulencia, como la producción de micotoxinas capaces de suprimir la inmunidad humoral y celular, para causar descomposición de los tejidos y también para producir proteasas y colagenasas (12).

Otros factores de riesgo reportados en la literatura evidencian la presencia de neutropenia profunda y prolongada mucho más frecuente en pacientes con neoplasias hematológicas o en quienes reciben esquemas de quimioterapia que causan aplasias, en pacientes con leucemia mieloide aguda, consumidores de cigarrillo (4/7) y receptores de trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos. El uso de la globulina antitimocítica en el esquema de acondicionamiento se asoció significativamente al desarrollo de fusariosis ($p<0,001$) al igual que la hiperglucemia –con requerimiento terapéutico de insulina–, pero con la forma de fusariosis invasiva. La presencia de enfermedad injerto contra huésped, grado III o IV, también se asoció con mayor riesgo de infección fúngica invasora por *Fusarium* spp. en el periodo temprano después del trasplante (13).

Patogénesis

El hongo ingresa principalmente por las vías respiratorias, pero también puede hacerlo por el tracto gastrointestinal, la piel o mediante dispositivos como catéteres venosos centrales (10). Cuando la vía de ingreso es pulmonar, los conidios se transforman en hifas, dando origen a la infección invasiva (10). Cuando la puerta de entrada es cutánea, la infección suele iniciar como paroniquia, onicomicosis o celulitis, desde donde se extiende

por vía hematógena a sitios distantes de la piel y a los órganos internos, ocasionando infección invasiva (10). Esta última se caracteriza por el tropismo del hongo a los vasos sanguíneos, lo que lleva a isquemia e infarto de los tejidos afectados (10).

El compromiso de la inmunidad innata es un requisito importante para que se desarrolle la enfermedad invasora, ya que las hifas son destruidas por los macrófagos y los neutrófilos en condiciones normales (14), mediante mecanismos citotóxicos oxidativos (10). Se ha reportado que el 82 % de los pacientes con fusariosis presenta neutropenia (neutrófilos absolutos inferiores a 1.000 células por ml), y de estos, el 61 % tienen menos de 100 células por ml (4). La mediana de duración de la neutropenia antes del diagnóstico de fusariosis es de 15 días. Sin embargo, el rango va desde 0 hasta 71 días (4).

Otro fenómeno que resalta la importancia de la neutropenia en la patogénesis de la enfermedad es la relación entre la respuesta al tratamiento y la función de los granulocitos (10). Los linfocitos T también cumplen un papel en la infección por *Fusarium* spp., como queda evidenciado en los casos de fusariosis en pacientes inmunodeprimidos no neutropénicos (14). Campo y colaboradores encontraron linfopenia en el 93 % de sus pacientes, aunque con mayor prevalencia de la neutropenia (4). Aun así, la incidencia de fusariosis en pacientes con VIH es baja, excepto cuando hay enfermedad neoplásica asociada (10).

Los factores de riesgo más frecuentes, identificados en esta serie de casos, fueron la neoplasia hematológica y la neutropenia profunda (con un recuento absoluto de neutrófilos menor de 100 por µl). La puerta de entrada del hongo se pudo inferir en los pacientes que presentaron onicomicosis y en aquel que portaba un dispositivo vascular, a partir del cual se identificó la entidad fúngica. En ninguno de los pacientes se confirmó compromiso pulmonar o de otros órganos diferentes a la piel.

Fusarium spp. también puede causar infecciones en personas inmunocompetentes, pero en esos casos se presentan cuadros clínicos limitados a un órgano o sistema, como onicomicosis, queratitis o artritis (10). En pacientes inmunosuprimidos, las infecciones localizadas progresan rápidamente a infección invasiva diseminada (10).

Manifestaciones clínicas

Las infecciones por *Fusarium* spp. tienen un espectro amplio de presentación (2) con manifestaciones que dependen del estado inmune del huésped y de las distintas vías de entrada: respiratoria, gastrointestinal o traumatismos en la piel (dispositivos vasculares) (15).

Puede producir infecciones localizadas y diseminadas (2). Las infecciones localizadas pueden corresponder a queratitis micóticas, otomicosis, onicomicosis y celulitis, aunque se han reportado incluso eumicetomas (2,15,16).

En la enfermedad diseminada, las lesiones cutáneas se presentan en el 73 % de los pacientes (17) y se caracterizan por ser pápulas o nódulos eritematosos, dolorosos, que evolucionan rápidamente a lesiones con necrosis central, semejante a lesiones en diana, debido a la invasión de la luz de los vasos sanguíneos por las hifas de *Fusarium* spp. Las lesiones se pueden localizar en cara, tronco o extremidades (2,4,18), y tienen como

diagnóstico diferencial otras infecciones micóticas como por *Candida* spp., *Histoplasma* spp. y *Cryptococcus* spp.

Otras manifestaciones cutáneas de la enfermedad diseminada son las vesículas o ampollas hemorrágicas (3 % de los casos) (19) y los abscesos (7 % de los casos) (4). Las lesiones de tipo ectima se deben a trombosis e infarto causados por la invasión de la luz de los vasos sanguíneos por las hifas de *Fusarium*. Las lesiones aparecen rápidamente dentro de uno a cinco días, en varias etapas de evolución. En la figura 1 se muestran diferentes manifestaciones clínicas en la piel que algunos de los pacientes de esta serie presentaron y que por sus características semiológicas –nódulos subcutáneos, pápulas con centro necrótico, distribución generalizada sin compromiso de mucosa– y el hallazgo de onicomicosis en uno de los pacientes (figura 1C), fueron clave para la sospecha de infección fúngica invasora por *Fusarium* spp.

El compromiso pulmonar, o fungomas, se presenta en casos limitados. También puede manifestarse con consolidaciones, infiltrados intersticiales, nódulos, cavitaciones y de manera infrecuente, hemorragia alveolar difusa. (2,8). Sin embargo, en ninguno de los pacientes de la serie se confirmó compromiso pulmonar. Otra forma de compromiso respiratorio es la sinusitis crónica (2,8).

La infección diseminada es la forma clínica más frecuente y se define como la afección de diversos órganos o sistemas, entre los que se destacan el sistema respiratorio y la piel, afectada en el 68 % de los casos (4). Sin embargo, también puede alterar las articulaciones, los huesos, el peritoneo, los globos oculares y el sistema nervioso central (1). La fiebre es un rasgo típico de esta forma de la enfermedad (15). La fungemia es un rasgo distintivo (más frecuente que en la candidiasis) y refleja una forma crítica de la enfermedad (1,2). En la mayoría de los casos se presenta cinco días después de la aparición de las lesiones en piel (20).

En los casos aquí presentados, más del 90 % de los hemocultivos fueron positivos. La infección diseminada por *Fusarium* spp. es extremadamente rara en pacientes con trasplante de órgano sólido y con HIV, lo que sugiere que en este grupo de pacientes los neutrófilos y los linfocitos T son claves para delimitar la infección y explica por qué la infección es localizada.

Fusarium spp. también produce infección pulmonar en receptores de trasplante de progenitores hematopoyéticos y trasplante hepático (21,22), especialmente en quienes adquieren el hongo por vía aérea (12). La fusariosis ocasionalmente se describe en personas inmunocompetentes, como el caso de siete pacientes que presentaron fungemia por *F. verticilloides* debido a la exposición a esporas durante las actividades de construcción en un hospital (23).

Las infecciones oculares como queratitis y endoftalmitis, tanto en individuos inmunocompetentes como inmunodeprimidos, se han reportado en personas usuarias de lentes de contacto por el uso de una solución específica tópica contaminada con *Fusarium* spp. (24). Uno de los pacientes de la serie presentó compromiso ocular por endoftalmitis aguda unilateral no asociada al uso de lentes de contacto (Figura 1D).

Las manifestaciones del sistema nervioso central en la infección diseminada por *Fusarium* spp. incluyen meningoencefalitis y abscesos cerebrales, pero estos son relativamente raros en comparación con los otros

síntomas clínicos en la piel, la región sinonasal y los pulmones (11). Cuando se presenta compromiso del sistema nervioso, se atribuye a diseminación hematógena (11). En esta serie no se documentó compromiso del sistema nervioso central.

Diagnóstico diferencial

Uno de los diagnósticos diferenciales más importantes de la fusariosis es la infección invasora por otros hongos filamentosos, especialmente por *Aspergillus* spp. Para diferenciarla de la fusariosis hay varias herramientas clínicas; como lo demostraron Nucci y colaboradores (17), la fiebre es más frecuente en la fusariosis (96,2 % versus 63,9 %, p=0,003), al igual que las lesiones cutáneas y la fungemia (17). En esta serie se encontraron hallazgos semejantes. Por otro lado, la neumonía (88,9 % versus 50 %, p=0,001) y la sinusitis (63,9 % versus 38,5 %, p=0,048) son más comunes en la aspergilosis (17). Cuando hay compromiso pulmonar, es más común ver el signo de halo en la aspergilosis (62,5 % versus 23,1 %, p=0,02) (17).

Cuando hay afectación cutánea, el principal diagnóstico diferencial es el ectima (8,10). Incluso, algunos autores han propuesto a *Fusarium* spp. como parte de una lista de agentes patógenos implicados como agentes etiológicos de algunos casos de ectima (25).

Diagnóstico

El diagnóstico de fusariosis requiere correlacionar elementos de la clínica, la histología, la microbiología e, incluso, la epidemiología de la institución. Aunque el diagnóstico definitivo es la identificación del hongo (8), esto no siempre se consigue. En estos casos, los factores de riesgo y las manifestaciones clínicas pueden orientar el diagnóstico. Las guías de la *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* (ESCMID) y la *European Confederation of Medical Mycology* (ECMM) recomiendan fuertemente que, entre los estudios para fusariosis, se realice microscopía directa, cultivos, estudio de patología y tomografía computarizada de tórax (26).

El diagnóstico de infección por *Fusarium* spp. requiere el cultivo de tejido para una identificación precisa como se ejemplifica en esta serie, ya que el aislamiento del hongo se hizo con mayor frecuencia en hemocultivos (12/13) y en piel (6/13). *Fusarium* spp. aparece en forma de hifas hialinas tabicadas, con ramificación en ángulo agudo, en la tinción de plata metenamina de Gomori. La apariencia de los macroconidios en forma de canoa o de plátano en la tinción de azul de lactofenol (figura 2B), es una característica patognomónica de *Fusarium* spp.

Cultivo

Una característica de la fusariosis, que la diferencia de las aspergilosis, son los hemocultivos (14). Los hemocultivos son positivos en hasta el 60 % (figura 2A) de los pacientes con fusariosis diseminada, en contraste con aquellos con aspergilosis y otras infecciones invasivas por mohos, donde rara vez son positivos (2,8). Los cultivos de piel también son útiles y pueden llevar a un diagnóstico temprano, pues las lesiones cutáneas suelen preceder a los hemocultivos positivos en cinco días (8).

Fusarium spp. tiene un crecimiento rápido de 3 a 7 días (2,15) en medios como agar papa dextrosa o Sabouraud dextrosa-sacarosa, entre otros. La temperatura ideal de incubación es de 25 a 28 °C y no debe utilizarse

cicloheximida porque puede inhibir su síntesis proteica (15). Las colonias son blanco-vellosas (figura 2C) con pigmentos que varían según la especie, y por microscopía se observan hifas delgadas y tabicadas con microconidios y macroconidios fusiformes, cuyas características cambian según la especie (2).

Histología

El estudio de patología muestra hifas hialinas y tabicadas que son indistinguibles de *Aspergillus* spp. u otros agentes patológicos de hialohifomicosis (2). En la histología también se observa invasión vascular y trombosis, evidencia definitiva de enfermedad fúngica invasiva (11,15), como los hallazgos que se muestran en el caso dos (figura 3B). Aunque la descripción histológica y las coloraciones con ácido peryódico de Schiff y de Gomori muestran el compromiso de la luz de los vasos sanguíneos y las estructuras micóticas, es necesario correlacionar estas deducciones con hallazgos clínicos y paraclínicos, además de estudios microbiológicos para una hacer clasificación definitiva.

Otros estudios

Entre las herramientas diagnósticas que permiten configurar el diagnóstico de infección fúngica invasora están las pruebas de reacción antígeno-anticuerpo en suero como el galactomanano y el (1,3)-β-D-glucano. En la literatura, usualmente se describe que las infecciones por *Fusarium* spp. son positivas para (1,3)-β D-glucano, aunque no es una prueba específica y puede ser positiva en infecciones por otros hongos como *Candida* spp., *Aspergillus* spp. y *Trichosporon* spp.

En revisiones recientes sobre la positividad de estas pruebas en infecciones por *Fusarium* spp., la positividad del (1,3)-β-D-glucano y del galactomano fue del 36 y el 9 %, respectivamente (1). El galactomanano hace parte de la pared de muchas especies de hongos que pueden causar enfermedad en el ser humano y es más frecuente encontrarlo en infecciones invasivas por *Aspergillus* spp. Sin embargo, hay evidencia de que también puede encontrarse en enfermedades causadas por hongos como *Penicillium* spp.*, Fusarium* spp.*, Paecilomyces* spp. e *Histoplasma capsulatum* (8). Algunos autores no han encontrado diferencias estadísticamente significativas en la prueba de galactomanano entre la fusariosis y la aspergilosis (positividad de 73,3 % versus 88,6 %, p=0,18) (14).

Otras pruebas reportadas son la PCR y la hibridación *in situ*, esta última con valor predictivo positivo del 100 % (15). En esta serie, en el paciente 13 el valor del galactomanano sérico en el momento del diagnóstico de la fusariosis fue de 1,3 ng/ml.

Imágenes diagnósticas

Como el compromiso primario por *Fusarium* spp. se presenta usualmente por la vía aérea superior (inhalación de esporas) o por pérdida de la barrera cutánea, su manifestación clínica incluye cuadros de neumonía, sinusitis e infecciones en catéteres endovenosos y traumas abiertos. De la misma manera, es común el desarrollo de nódulos o masas (únicas o múltiples) con compromiso aleatorio. Entre los hallazgos en la tomografía de tórax se encuentran: enfermedad de espacio aéreo único y unilateral (29 %), enfermedad de espacio aéreo múltiple y bilateral (24 %), lesiones nodulares (15 %) y lesiones cavitarias (9 %) (4). La presencia de nódulos con “signo del halo” solo se reporta en el 20 % de los casos (27).

Tratamiento

El tratamiento agresivo temprano es crítico dada la rápida progresión de la infección y las altas tasas de mortalidad, que alcanzan del 50 al 80 % en casos de fungemia (3). El tratamiento de la fusariosis implica una combinación de estrategias: la terapia antifúngica, el desbridamiento quirúrgico, el retiro de dispositivos vasculares –cuando sea necesario– y la recuperación de la neutropenia (3).

La sensibilidad *in vitro* de *Fusarium* spp. a las equinocandinas varía entre especies (28-30). Varios estudios (31-33) encontraron que tres equinocandinas (caspofungina, micafungina y anidulafungina) fueron inactivas en 10 cepas de *Fusarium* spp. con una concentración inhibitoria mínima de 8 mg/L (31). *Fusarium solan*i, en particular, es intrínsecamente resistente a las equinocandinas, por lo que su uso no está recomendado en infección fúngica invasora por *Fusarium* spp.

La anfotericina B se considera el tratamiento de primera opción para la fusariosis invasiva, aunque las concentraciones inhibitorias mínimas entre 1 y 4 mg/L son generalmente sugestivas de resistencia.

Una encuesta epidemiológica reciente sobre infecciones invasivas por *Fusarium* spp. en Europa demostró que los azoles (posaconazol, voriconazol e itraconazol) tienen una concentración inhibitoria mínima más baja contra cepas de *F. verticillioides*, mientras que 14 aislamientos de *F. solani* fueron resistentes a los tres azoles probados (26).

El *Clinical and Laboratory Standards Institute* propone valores epidemiológicos de corte de los antifúngicos disponibles para el tratamiento de los complejos de *Fusarium* spp. más frecuentemente aislados, pero no para todas las especies (3), y no pueden predecir la respuesta clínica al tratamiento.

El tratamiento de la fusariosis invasiva es un reto por las siguientes razones: *Fusarium* spp. es uno de los hongos más resistentes a los medicamentos; su sensibilidad antifúngica tiende a variar entre las diferentes especies de *Fusarium,* por ejemplo*, F. solani* suele ser más resistente a los agentes antifúngicos en comparación con las otras especies. Por otra parte, no hay reportes de estudios controlados, así que el tratamiento no está bien establecido.

La recomendación para la infección fúngica invasora es la combinación de anfotericina B lipídica y voriconazol. Sin embargo, la efectividad de esta combinación se desconoce porque la información disponible es limitada. Hay algunos informes de casos aislados sobre el resultado exitoso con la combinación de anfotericina B y voriconazol, al menos, por 12 semanas y con recuperación inmunológica (34).

La terapia antifúngica combinada es bien tolerada con toxicidad menor y teóricamente puede estabilizar la infección y prevenir la progresión fatal (35). En una serie de casos de 26 pacientes y en la revisión simultánea de 97 casos reportados en la literatura desde el año 2000 (23), se encontró que algunos recibieron monoterapia con anfotericina o voriconazol y en otros se utilizaron terapias combinadas. Al comparar las frecuencias de mortalidad en los pacientes incluidos en la serie con monoterapia (66 %) versus las terapias combinadas (0 %), y los casos registrados de la revisión de la literatura (31 % en terapia combinada versus 10 % en monoterapia) no se puede concluir cuál es la mejor terapia. No obstante, los pacientes en los que se utilizó más

de un fármaco se encontraban más críticamente enfermos, pero a la fecha no se dispone de estudios clínicos que apoyen esta observación.

La dosis recomendada de voriconazol en adultos es de 6 mg/kg, vía endovenosa, cada 12 horas como dosis de carga y después una dosis de mantenimiento de 4 mg/kg cada 12 horas (26). La dosis diaria recomendada de anfotericina B liposómica es de 5 a 10 mg/kg (15). Algunos autores recomiendan adicionar el factor estimulante de colonia de granulocitos-macrófagos, a una dosis diaria de 5 µg/kg, como adyuvante en pacientes neutropénicos (15,26).

La sinergia entre terbinafina y antifúngicos azoles ha sido demostrada en estudios *in vitro*. Sin embargo, se requieren más datos al respecto (1). El posaconazol se ha propuesto como terapia de rescate para quienes no responden al tratamiento convencional o presenten intolerancia a la anfotericina B (36).

El tratamiento quirúrgico asociado al uso de antifúngicos puede ser necesario. Se ha descrito en informes de caso como un tratamiento agresivo, pero exitoso y como la mejor oportunidad de supervivencia cuando la fusariosis involucra órganos como el pulmón o el hueso y hay compromiso neurológico con riesgo de herniación (37-39). En los casos de las neoplasias hematológicas, la recuperación de la neutropenia es fundamental para el control de la infección fúngica invasora porque disminuye la mortalidad.

En pacientes no neutropénicos, cuya única manifestación sea la fungemia asociada al catéter venoso, suele ser suficiente el retiro del dispositivo (14). En esta serie, se retiró el dispositivo vascular central de un paciente, por ser el foco de la infección fúngica invasora y se acompañó con tratamiento antifúngico combinado. Dadas las dificultades en la identificación de la especie de *Fusarium*, la necesidad de un inicio precoz de la terapia antifúngica –en el contexto de pacientes con neoplasias hematológicas y la presencia de neutropenias profundas y prolongadas– se considera que la terapia inicial combinada de voriconazol y anfotericina B es una opción razonable mientras se define la especie de *Fusarium* (40-42).

Prevención

La prevención de la enfermedad diseminada es un aspecto importante del tratamiento, ya que los senos paranasales y el aparato pulmonar son la puerta de entrada más frecuente, seguidos de la zona periungular y los tejidos blandos. Se deben implementar procedimientos de limpieza ambiental para reducir la posibilidad de infección por moho en pacientes inmunocomprometidos, en particular, en aquellos con neutropenia profunda (12).

Como la piel y las uñas son fuentes de la infección diseminada, es conveniente hacer un adecuado examen dermatológico antes de someter a un paciente a algún tratamiento inmunosupresor e instruirlo para que evite la manipulación inapropiada de las uñas (8).

Pronóstico

Stempel *et al.* encontraron que la probabilidad de supervivencia a las seis semanas es del 66,7 % y a las 12 semanas es del 53,3 % (1). El pronóstico depende del estado inmunológico del huésped (4,33). Los pacientes neutropénicos suelen tener un curso rápido y letal (4); la supervivencia de los pacientes con neutropenia persistente es de alrededor del 4 % a pesar de

un tratamiento agresivo (43). De ahí que la recuperación de la neutropenia sea un factor protector para la supervivencia (razón de probabilidad=0,12; p=0.006) (4,7). Otro factor protector es el compromiso exclusivo de la piel y los tejidos blandos (4).

Por otro lado, la hipoalbuminemia, la presencia de fungemia, el desarrollo de la infección fúngica invasora en la unidad de cuidados intensivos o el tratamiento allí después del diagnóstico de la infección fúngica invasora son variables asociadas con la mortalidad (4). La mortalidad en esta serie fue mayor del 60 % a pesar del tratamiento antifúngico combinado en los pacientes afectados.

Conclusión

En los pacientes con cáncer, y en especial en aquellos con neoplasia hematológica, se debe sospechar una infección fúngica invasora cuando a pesar del tratamiento antimicrobiano de amplio espectro persista la neutropenia febril, haya compromiso de piel por la presencia de lesiones polimorfas, de distribución generalizada o de lesiones periungulares, como la paroniquia caracterizada por el compromiso del dedo gordo del pie. En estos pacientes se indica el cultivo de sangre y de biopsia de piel como herramientas diagnósticas para confirmar la fusariosis lo más pronto posible.

Ante la sospecha diagnóstica, es importante iniciar el tratamiento antifúngico basado en el conocimiento epidemiológico de los patrones de sensibilidad. Teniendo en cuenta que *F. solani* es la especie más frecuentemente identificada y que presenta resistencia a todos los azoles, se recomienda la terapia antifúngica combinada con anfotericina B liposómica y voriconazol. La recuperación de la neutropenia es definitiva para el control de la infección fúngica invasora por *Fusarium* spp. ya que puede disminuir la mortalidad.

Referencias

1. Stempel JM, Hammond SP, Sutton DA, Weiser LM, Marty FM. Invasive fusariosis in the voriconazole era: Single-center 13-year experience. Open forum Infect Dis. 2015;2:1-5. https://doi.org/10.1093/ofid/ofv099
2. Bonifaz-Trujillo A. Hialohifomicosis y otras micosis poco frecuentes. En: Serrano H, editor. Micología médica básica. 4ª edición. Ciudad de México: McGraw-Hill; 2012. p. 440-60.
3. Verbeke V, Bourgeois T, Lodewyck T, van Praet J, Lagrou K, Reynders M, *et al.* Successful outcome of disseminated *Fusarium musae* fungemia with skin localization treated with liposomal amphotericin B and voriconazole in a patient with acute myeloid leukemia. Mycopathologia. 2020;185:1085-9. https://doi.org/10.1007/s11046-020-00499-w
4. Campo M, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Invasive fusariosis in patients with hematologic malignancies at a cancer center: 1998-2009. J Infect. 2010;60:331-7. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2010.01.010
5. Kontoyiannis D, Marr K, Park B, Alexander B, Anaissie E, Walsh T, *et al.* Prospective surveillance for invasive fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients, 2001-2006: Overview of the TransplantAssociated Infection Surveillance Network (TRANSNET) database. Clin Infect Dis. 2010;50:1091-1100. https://doi.org/10.3410/f.2555970.2208073
6. Tortorano AM, Prigitano A, Esposto MC, Arsic Arsenijevic V, Kolarovic J, Ivanovic D, *et al.* European Confederation of Medical Mycology (ECMM) epidemiological survey on invasive infections due to *Fusarium* species in Europe. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014;33:1623-30. https://doi.org/10.1007/s10096-014-2111-1
7. Herkert PF, Al-Hatmi AMS, de-Oliveira GL, Muro MD, Pinheiro RL, Nucci M, *et al.* Molecular characterization and antifungal susceptibility of clinical *Fusarium* species from Brazil. Front Microbiol. 2019;10:737. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00737

8. Vélez JD, Fernández L, Cadavid D, Herrera S, Vallejo S. Fusariosis diseminada con hemoptisis masiva en un paciente con leucemia linfoblástica aguda. Infectio. 2012;16:104-7. https://doi.org/10.1016/s0123-9392(12)70034-6
9. Lobatón-Ramírez J, Coronado-Negrete A, Ramírez-Barranco R, Rocha-Reyes E, Pinto-Angarita JC, Borré-Naranjo D. Fusariosis diseminada por *Fusarium verticillioides* en un paciente con leucemia mieloide aguda. Rev Cienc Biomed. 2016;7:316-22. https://doi.org/10.32997/rcb-2016-2862
10. Hernández-Cruz C, Núñez-Quintana A, Rodríguez-Fraga Y, Carnot-Uria J, Muñío-Perurena J, Pérez-Román G, *et al.* Sepsis sistémica por *Fusarium solani* en pacientes con leucemias agudas. Reporte de dos casos. Rev Hematol Mex. 2011;12:287-92.
11. Garcia RR, Min Z, Narasimhan S, Bhanot N. *Fusarium* brain abscess: Case report and literature review. Mycoses. 2014;58:22-6. https://doi.org/10.1111/myc.12271
12. Delia M, Monno R, Giannelli G, Stabile-Ianora AA, Dalfino L, Pastore D, *et al.* Fusariosis in a patient with acute myeloid leukemia: A case report and review of the literature. Mycopathologia. 2016;181:457-63. https://doi.org/10.1007/s11046-016-9987-5
13. Garnica M, Oliveira-da-Cunha M, Portugal R, Maiolino A, Colombo AL, Nucci M. Risk factors for invasive fusariosis in patients with acute myeloid leukemia and in hematopoietic cell transplant recipients. Clin Infect Dis 2015;60:875-80. https://doi.org/10.1093/cid/ciu947
14. Nucci M, Anaissie E. *Fusarium* infections in immunocompromised patients. Clin Microbiol Rev. 2007;20:695-704. https://doi.org/10.1128/cmr.00014-07
15. Arenas R. Hialohifomicosis y contaminantes de laboratorio. En: de León J, editor. Micología médica iiustrada. 5ª edición. Ciudad de México: McGrawHill; 2014. p. 345-64.
16. Al-Hatmi AMS, Bonifaz A, Tirado-Sánchez A, Meis JF, de-Hoog GS, Ahmed SA. *Fusarium* species causing eumycetoma: Report of two cases and comprehensive review of the literature. Mycoses. 2017;60:204-12. https://doi.org/10.1111/myc.12590
17. Nucci F, Nouér SA, Capone D, Nucci M. Invasive mould disease in haematologic patients: Comparison between fusariosis and aspergillosis. Clin Microbiol Infect. 2018;24:1105. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.05.006
18. Olivares R, Alfaro J, Díaz MC, Thompson L. Fusariosis diseminada por *Fusarium oxysporum* en un paciente adulto con leucemia mieloide aguda y neutropenia severa febril. Rev Chil Infectol. 2005;22:356-60. https://doi.org/10.4067/s0716-10182005000600009
19. West EK, Mehta M, Patel V, Chamberland R. Skin lesion in a patient after hematopoietic stem cell transplant. Transpl Infect Dis. 2017;19:e12753. https://doi.org/10.1111/tid.12753
20. Ersal T, Al-Hatmi ASM, Dalyan-Cilo B, Curfs-Breuker I, Meis JF, Özkalemkaş F, *et al.* Fatal disseminated infection with *Fusarium petroliphilum*. Mycopathologia. 2014;179:119-24. https://doi.org/10.1007/s11046-014-9813-x
21. Avelino-Silva VI, Ramos JF, Leal FE, Testagrossa L, Novis YS. Disseminated *Fusarium* infection in autologous stem cell transplant recipient. Braz J Infect Dis. 2015;19:90-3. https://doi.org/10.1016/j.bjid.2014.08.009
22. Sganga G, Bianco G, Frongillo F, Lirosi MC, Nure E, Agnes S. Fungal infections after liver transplantation: incidence and outcome. Transplant Proc. 2014;46:2314-8. https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2014.07.056
23. Georgiadou SP, Velegraki A, Arabatzis M, Neonakis I, Chatzipanagiotou S, Dalekos GN, *et al.* Cluster of *Fusarium verticillioides* bloodstream infections among immunocompetent patients in an internal medicine department after reconstruction works in Larissa, Central Greece. J Hosp Infect. 2014;86:267-71. https://doi.org/10.1016/j.jhin.2014.01.011
24. Chang DC, Grant GB, O'Donnell K, Wannemuehler KA, Noble-Wang J, Rao CY, *et al.* Multistate outbreak of *Fusarium* keratitis associated with use of a contact lens solution. JAMA. 2006;296:953-63. https://doi.org/10.1001/jama.296.8.953
25. Weiel J, Zhang C, Smith J, Wang W, DuPont J, Lian F. Clinicopathologic aspects of ecthyma gangrenosum in pediatric patients a case series and review of the literature. J Clin Anat Pathol. 2013;1:1-5. https://doi.org/10.17303/jcap.2013.101
26. Tortorano AM, Richardson M, Roilides E, Van-Diepeningen A, Caira M, Munoz P, *et al.* ESCMID and ECMM joint guidelines on diagnosis and management of hyalohyphomycosis: *Fusarium spp.*, *Scedosporium spp.* and others. Clin Microbiol Infect. 2014;20:27-46. https://doi.org/10.1111/1469-0691.12465

27. Marom EM, Holmes AM, Bruzzi JF, Truong MT, O'Sullivan PJ, Kontoyiannis DP. Imaging of pulmonary fusariosis in patients with hematologic malignancies. AJR Am J Roentgenol. 2008;190:1605-9. https://doi.org/10.2214/AJR.07.3278

28. Arikan S, Lozano-Chiu M, Paetznick V, Rex JH. In vitro susceptibility testing methods for caspofungin against *Aspergillus* and *Fusarium* isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45:327-30. https://doi.org/10.1128/aac.45.1.327-330.2001

29. Aperis G, Alivanis P. Posaconazole: a new antifungal weapon. Rev Recent Clin Trials. 2011;6:204-19. https://doi.org/10.2174/157488711796575595

30. Chen SC, Slavin MA, Sorrell TC. Echinocandin antifungal drusi fungal infections: a comparison. Drugs. 2011;71:11-41. https://doi.org/10.2165/11585270-000000000-00000

31. Martos AI, Romero A, González MT, Gonzáles A, Serrano C, Castro C, *et al.* Evaluation of the E-test method for susceptibility testing of *Aspergillus* spp. and *Fusarium* spp. to three echinocandins. Med Mycol. 2010;48:858-61. https://doi.org/10.3109/13693781003586943

32. Drogari-Apiranthitou M, Mantopoulou FD, Skiada A, Kanioura L, Grammatikou M, Vrioni G, *et al. In vitro* antifungal susceptibility of filamentous fungi causing rare infections: Synergy testing of amphotericin B, posaconazole and anidulafungin in pairs. J Antimicrob Chemother. 2012;67:1937-40. https://doi.org/10.1093/jac/dks137

33. Iqbal NJ, Boey A, Park BJ, Brandt ME. Determination of *in vitro* susceptibility of ocular *Fusarium* spp. isolates from keratitis cases and comparison of Clinical and Laboratory Standards Institute M38-A2 and E test methods. Diagn Microbiol Infect Dis. 2008;62:348-50. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.07.003

34. Stanzani M, Vianelli N, Bandini G, Paolini S, Arpinati M, Bonifazi F, *et al.* Successful treatment disseminated fusariosis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with the combination of voriconazole and liposomal amphotericin B. J Infect. 2006;53:E243-6. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2006.02.011

35. Rojas R, Molina JR, Jarque I, Montes C, Serrano J, Sanz J, *et al.* Outcome of antifungal combination therapy for invasive mold infections in hematological patients is independent of the chosen combination. Mediterr J Hematol Infect Dis. 2012;4:e2012011. https://doi.org/10.4084/MJHID.2012.011

36. Al-Hatmi AMS, Bonifaz A, Ranque S, Sybren-de-Hoog G, Verweij PE, Meis JF. Current antifungal treatment of fusariosis. Int J Antimicrob Agents. 2018;51:326-32. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.06.017

37. Lupinetti FM, Giller RH, Trigg MR. Operative treatment of *Fusarium* fungal infection of the lung. Ann Thorac Surg. 1990;49:991-2. https://doi.org/10.1016/0003-4975(90)90885-a

38. Strom TO, Burmeister RA, Rothenberg GM, Priesand SJ. Treatment of *Fusarium* osteomyelitis in a diabetic foot ulcer complicated by antineoplastic chemotherapy. Wounds. 2022;34:e37-e41. https://doi.org/10.25270/wnds/2022.e37e41

39. Vadhan JD, Alyssa JM, Shogan JC, Singh V, Carrillo M. Fast and Fusariosis: A systematic review and case report of a rapidly fatal central nervous system infection. J Emerg Crit Care Med. 2022;6:24. https://doi.org/10.21037/jeccm-21-125

40. Guzman-Cottrill JA, Zheng X, Chadwick EG. *Fusarium solani* endocarditis successfully treated with liposomal amphotericin B and voriconazole. Pediatr Infect Dis J. 2004;23:1059-61. https://doi.org/10.1097/01.inf.0000143649.90952.41

41. Durand-Joly I, Alfandari S, Benchikh Z, Rodrigue M, Espinel-Ingroff A, Catteau B, *et al.* Successful outcome of disseminated *Fusarium* infection with skin localization treated with voriconazole and amphotericin B-lipid complex in a patient with acute leukemia. J Clin Microbiol. 2003;41:4898-900. https://doi.org/10.1128/JCM.41.10.4898-4900.2003

42. Ho DY, Lee JD, Rosso F, Montoya JG. Treating disseminated fusariosis: amphotericin B, voriconazole or both? Mycoses. 2007;50:227-31. https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2006.01346.xz

43. Nucci M, Anaissie EJ, Queiroz-Telles F, Martins CA, Trabasso P, Solza C, *et al.* Outcome predictors of 84 patients with hematologic malignancies and *Fusarium* infection. Cancer. 2003;98:315-9. https://doi.org/10.1002/cncr.11510

Biomédica 2023;43(Supl.1):57-68
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.6793

Presentación de caso

Brote de *tinea capitis* tricofítica en un grupo de niños escolares en un área rural del departamento del Cauca, Colombia

Fabiola Eugenia González[1], José Alejandro Rodríguez[1], Lina María Muñoz[1], Giovanny Apráez[2,3], Luis Reinel Vásquez[1]

[1] Facultad Ciencias de la Salud, Universidad del Cauca, Popayán, Colombia
[2] Secretaría Departamental de Salud, Gobernación del Cauca, Popayán, Colombia
[3] Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. La tiña de la cabeza es una micosis que se presenta en el tejido queratinizado, afecta al cuero cabelludo y puede causar alopecia, prurito y descamación. Este tipo de micosis es más frecuente en niños de edad escolar, por lo que puede desencadenar un problema de salud pública. En Colombia, los principales agentes etiológicos reportados son los dermatofitos zoofílicos.
Objetivo. En el presente estudio se buscó caracterizar un brote de *tinea capitis* en 32 niños de un colegio de la zona rural del departamento del Cauca.
Materiales y métodos. Se llevó a cabo una investigación epidemiológica de campo en la que se aplicó una encuesta estructurada para caracterizar aspectos sociodemográficos y factores predisponentes para su ocurrencia. Se recolectaron muestras de escamas de cuero cabelludo y cabellos afectados para estudios micológicos. Finalmente, por medio de la Secretaría Departamental del Cauca y del hospital local, se manejó el brote de *tinea capitis* y se hicieron recomendaciones a los niños, los padres de familia y la población en general para prevenir estas micosis. Este estudio contó con el consentimiento informado verbal por parte de los padres de familia y los niños.
Resultados. El agente etiológico aislado en el 63 % de las muestras recolectadas fue *Trichophyton tonsurans* y el principal factor predisponente para esta micosis fue compartir máquinas rasuradoras (87,5 %). El agente etiológico de este brote de *tinea capitis* no inflamatoria fue un dermatofito antropofílico.
Conclusión. Idealmente, se deben practicar los estudios micológicos con el fin de establecer el agente etiológico y, así, plantear las terapéuticas y recomendaciones según las guías de manejo. Además, se debe realizar un trabajo multidisciplinario para el control del brote y la educación de la población respecto a esta micosis.

Palabras clave: micología; tiña del cuero cabelludo; salud pública.

An outbreak of trichophytic *tinea capitis* in a group of schoolchildren in a rural area of the department of Cauca, Colombia

Introduction. *Tinea capitis* is a mycosis of keratinized tissue, which affects the scalp and may cause alopecia, pruritus, and desquamation. This type of mycosis is more frequent in school-age children, and it may represent a public health problem; the main etiological agents reported for Colombia are zoophilic dermatophytes.
Objective. To characterize an outbreak of *Tinea capitis* in 32 children from a rural school in the department of Cauca.
Materials and methods. We conducted an epidemiological field study using a structured survey to characterize sociodemographic aspects and predisposing factors for this mycosis. We collected samples of affected scalp scales and hair for mycological studies. The children and the general population received recommendations, about these mycoses' prevention, from Cauca's health authorities and the local hospital. The parents verbally approved the informed consent.
Results. The etiological agent isolated in 63% of the collected samples was *Trichophyton tonsurans*, an anthropophilic dermatophyte, and the main predisposing factor was sharing razors (87.5%).
Conclusions. Ideally, mycological studies define the etiological agent to propose therapeutics and recommendations in agreement with management guidelines. Implementation of multidisciplinary measures to control the outbreak and educate the population is required.

Key words: mycology; *tinea capitis*; public health.

Recibido: 25/11/2022
Aceptado: 08/06/2023
Publicado: 13/06/2023

Citación:
González FE, Rodríguez JA, Muñoz LM, Apráez G, Vásquez LR. Brote de *tinea capitis* tricofítica en un grupo de niños escolares en un área rural del departamento del Cauca, Colombia. Biomédica. 2023;43(Supl.1):57-68.
https://doi.org/10.7705/biomedica.6793

Correspondencia:
Fabiola Eugenia González, Facultad Ciencia de la Salud, Universidad del Cauca, Carrera 6 N°13N-50, Popayán, Colombia
Teléfono: (314) 610 6381
fegonza@unicauca.edu.co

Contribución de los autores:
Fabiola Eugenia González: trabajo de campo, recolección de las muestras, estudios micológicos, revisión de la literatura y escritura del manuscrito
José Alejandro Rodríguez: revisión de literatura y escritura del manuscrito
Lina María Muñoz: trabajo de campo, recolección de las muestras, revisión de literatura y escritura del manuscrito
Giovanny Apráez: trabajo de campo, aplicación de encuestas y escritura del manuscrito
Reinel Vásquez: trabajo de campo y aplicación de encuestas

Financiación:
El trabajo de investigación se apoyó en uno de los tres pilares institucionales: la proyección social; por lo tanto, para el procesamiento de las muestras se utilizaron materiales de los que dispone el Laboratorio de Micología de la Facultad Ciencias de la Salud de la Universidad del Cauca y, para la salida de campo, se contó con el apoyo de la Secretaría Departamental de Salud del Cauca.

Conflicto de intereses:
Los autores declaran no tener conflictos de interés para esta publicación.

Un brote es el aumento inusual del número de casos relacionados epidemiológicamente, aparece súbitamente y tiene diseminación localizada (1). Las micosis que afectan el cuero cabelludo son causadas por hongos filamentosos del grupo de los dermatofitos, que tienen la capacidad de degradar la queratina e infectar el estrato córneo, incluido el cabello.

Recientemente, los estudios filogenéticos de los dermatofitos, realizados mediante técnicas moleculares, han contribuido a su identificación y clasificación en siete clados: clado A, *Trichophyton*; clado B, *Epidermophyton*; clado C, *Nannizzia*; clado D, *Paraphyton*; clado E, *Lophophyton*; clado F, *Microsporum*, y clado G, *Arthroderma* (2). La transmisión del hongo se produce por contacto directo o microtraumas con material queratinizado y contaminado con las formas infectivas del hongo (artroconidios). Esta puede darse de persona a persona, a partir de animales o del suelo, e indirectamente, mediante fómites como sombreros, cepillos para el cabello, etc. (3).

La *tinea capitis* es causada habitualmente por especies de *Microsporum*, *Nannizia* y *Trichophyton*. Existen cinco formas de presentación clínica, así como un estado de portador asintomático. La manifestación clínica más frecuente consiste en parches descamativos con alopecia –puede ser uno solo o múltiples– que es una característica común de la infección de tipo ectotrix (parasitismo externo); también, pueden variar de pocos a varios centímetros y se pueden asociar con eritema (3-5).

La segunda presentación frecuente consta de parches alopécicos con puntos negros visibles, típica de una infección de tipo endotrix (parasitismo interno). Estos puntos se ven negros porque la terminación distal del cabello se rompió en la superficie del cuero cabelludo, como resultado del debilitamiento del tallo del cabello, secundario a la infección endotrix. Los puntos negros se presentan en los folículos dentro de las áreas alopécicas, las cuales varían de tamaño –desde unos pocos centímetros a varios centímetros de diámetro– y pueden ser una sola lesión o múltiples lesiones (4,5).

La tercera forma clínica es una descamación generalizada con poca pérdida de cabello o sin existencia de zonas alopécicas evidentes, por lo que puede ser fácilmente confundida con una dermatitis seborreica (4,5).

El favo o tiña fávica (*tinea favus*) resulta de la infección por *Trycophyton schoenleinii* y rara vez por otros dermatofitos. Se presenta como un eritema perifolicular que progresa a la formación de costras amarillas, en forma de copa, llamadas escútulas, con un olor característicamente desagradable; son lesiones que podrían presentar coalescencia y formar masas adherentes alrededor de zonas alopécicas con inflamación intensa, con un posible proceso fibroso o cicatricial, asociado con la consecuente alopecia permanente (6).

El querión de Celso es la manifestación más seria de la *tinea capitis* y resulta de una importante reacción inmunológica contra la infección. Inicialmente, puede presentarse como una foliculitis supurativa, asociada con sensibilidad o dolor en la zona afectada, pero, luego, se forman placas pustulosas y costras gruesas supurativas, que en casos raros podrían asociarse con eritema nodoso (7).

Otros hallazgos en el examen físico son las adenopatías cervicales, especialmente con las presentaciones clínicas más graves, en las cuales también pueden coexistir reacciones eccematosas diseminadas o también llamadas reacciones de “autoeccematización”, secundarias a erupciones por

dermatitis. Estas últimas consisten en una erupción eritematosa y pruriginosa generalizada, con pápulas que podrían comprometer la cabeza, el cuello, el tronco o las extremidades. Según su fisiopatología, se sugiere que es una reacción inmunológica a antígenos fúngicos o que podría corresponder a una reacción de hipersensibilidad tardía, posterior a la terapia antimicótica o incluso antes de ella (4-7).

Las infecciones de tiña de la cabeza se presentan con dos tipos de invasión capilar: la invasión de tipo ectotrix y la de tipo endotrix. La invasión de tipo ectotrix es comúnmente causada por *Microsporum canis* –dermatofito zoofílico– y *Nannizzia gypsea* –dermatofito geofílico–, los cuales desarrollan artroconidios, en forma de vaina, en la superficie del tallo del pelo, en donde la cutícula o base del pelo se destruye; en la tiña por *M. canis,* cuando el hongo es expuesto a la luz ultravioleta de la lámpara de Wood, se genera una fluorescencia verde-amarilla (3-6). La infección de tipo endotrix es causada por las especies antropofílicas *Trichophyton tonsurans* y *T. violaceum*, y se manifiesta con formación de artroconidios redondeados dentro del tallo del pelo; la cutícula no se destruye y la fluorescencia con luz de Wood es negativa. La evolución de este tipo de tiña es crónica y puede persistir hasta la edad adulta (3-6).

Las otras especies de dermatofitos zoofílicos, como *T. mentagrophytes* y *T. verrucosum*, suelen producir tiñas inflamatorias con presencia de pústulas, abscesos y supuración; presentación que se conoce como querión de Celso. Asimismo, puede haber inflamación, dolor y adenopatías regionales, el cabello se arranca con facilidad y puede dar lugar a una alopecia cicatricial (3-7).

En cuanto a su epidemiología, la *tinea capitis* afecta principalmente a los niños con edades entre los tres y los doce años, y está asociada con múltiples factores, como la falta de higiene personal, el hacinamiento, el bajo nivel socioeconómico, y las condiciones ambientales como el calor y la humedad (8).

La prevalencia de la *tinea capitis* varía notablemente alrededor del mundo, desde menos del 1 % en España hasta más del 50 % en países africanos como Nigeria, Etiopía y Ghana (8-11).

En Europa, el agente causal más común en humanos es *M. canis*, que se distribuye principalmente en el Mediterráneo y, también, en países como Austria, Hungría, Alemania y Polonia (11,12). La aparición de infecciones antropofílicas parece estar geográficamente restringida y se vincula a la inmigración desde países africanos (11). En el este y sur de África, el agente etiológico más común en humanos es *T. violaceum*, con una prevalencia que oscila entre el 56,7 y el 95 % (10,11). Sin embargo, en los últimos 10 a 20 años, la situación ha cambiado con la propagación de organismos como *T. tonsurans* en las Américas, Europa y África (13).

En el continente americano, Estados Unidos reporta que el 90 % de los casos de *tinea capitis* es causado por el dermatofito antropofílico *T. tonsurans* y se considera un trastorno endémico en escolares afroamericanos: 3 % presentan infección activa y 14 % son portadores asintomáticos (8-14).

En países como México, Perú y Chile, el agente etiológico asociado con la *tinea capitis* más frecuente es *M. canis*, seguido de *T. tonsurans* (14-17). En lo que respecta a Colombia, las micosis no son de notificación obligatoria, por lo que se desconoce su frecuencia. En un estudio retrospectivo (1994-2013),

realizado en un laboratorio de referencia de Colombia, con 415 pacientes con sospecha clínica de *tinea capitis*, se confirmaron 136 casos y se hicieron pruebas de laboratorio a 118. Se encontró que el principal agente etiológico fue *M. canis* en el 86 % (102/118) de los casos, seguido de *N. gypsea* en el 4 % (5/118) y *T. tonsurans* en el 3 % (4/118) (17). Sin embargo, no existen otros reportes que brinden más información sobre la prevalencia de *tinea capitis* en Colombia, lo que dificulta la actualización de los datos epidemiológicos en el país.

El presente estudio tuvo como objetivo caracterizar un brote de *tinea capitis* en un grupo de niños afrocolombianos de un colegio rural del departamento del Cauca, a partir de un caso índice. Se llevó a cabo por solicitud de la comunidad, de la secretaría de salud municipal y del personal del área de salud ambiental adscrito a la Secretaría Departamental de Salud del Cauca; y, por el interés del grupo investigador en identificar el agente etiológico, describir los factores asociados con su ocurrencia, y plantear estrategias de intervención y de educación que faciliten su control, en el marco de acciones de vigilancia epidemiológica ambiental, que puedan servir de base para el manejo de este tipo de brotes en Colombia.

Presentación del caso

Se trata de un estudio de investigación de un brote de *tinea capitis*, en el que se utilizan métodos y técnicas diagnósticas ya aprobadas en el marco del sistema de salud y que hacen parte de las acciones de vigilancia epidemiológica de salud ambiental de la Secretaría Departamental de Salud del Cauca.

Se estableció el protocolo para el manejo de un brote, el cual se planteó a partir de un caso índice que llegó remitido por el personal del laboratorio rural al Laboratorio de Micología de la Facultad Ciencias de la Salud de la Universidad del Cauca, en septiembre de 2017.

El caso índice fue un niño, estudiante, de ocho años (figura 1), con sintomatología clínica indicativa de *tinea capitis* inflamatoria. El acudiente informó que los signos y síntomas llevaban tres años de evolución, sin diagnóstico micológico y que había recibido tratamientos esporádicos sin mejoría aparente; además, advirtió que, en la institución educativa del usuario ubicada en la zona rural del municipio de Suárez (Cauca), había más escolares con la misma sintomatología, lo que hizo sospechar un posible brote de *tinea capitis*.

Se llevó a cabo un trabajo de campo en la institución educativa con la participación del personal del área de salud ambiental de la Secretaría Departamental de Salud del departamento del Cauca y del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Salud de la Universidad del Cauca.

Por tratarse de un brote de interés en salud pública, se solicitó el consentimiento informado verbal a los padres de familia para aplicar una encuesta estructurada, e identificar los datos sociodemográficos y las condiciones predisponentes para la ocurrencia de la micosis. Se les explicó a los niños la técnica para recolectar las muestras clínicas de las lesiones y se les solicitó su permiso en forma verbal para seguir con el procedimiento.

Se recolectaron escamas del cuero cabelludo por raspado con hojas de bisturí y se cortaron cabellos de los 32 niños con signos y síntomas leves (figura 2). También, se recolectaron muestras de lesiones en proceso de recuperación del caso índice, quien se encontraba recibiendo tratamiento

antimicótico con terbinafina. Se observó que dos de los niños presentaban máculas hipocrómicas en el tórax, por lo que se recolectaron muestras de esas lesiones con la técnica de la cinta engomada.

Las muestras clínicas fueron depositadas en frascos estériles pequeños (figura 3), trasladadas con las adecuadas medidas de bioseguridad y procesadas el mismo día en el Laboratorio de Microbiología. Se hizo el análisis microscópico, con solución de hidróxido de potasio al 40 % (figura 4), y siembras en medios agar Sabouraud, enriquecido con glucosa y que contenía cloranfenicol (0,05 mg/ml) (Oxoid, UK) y agar Mycosel™ (BBL, Becton Dickinson).

Los cultivos se incubaron a 28 °C hasta la observación de colonias de los 8 a los 15 días, en promedio. Las colonias se identificaron mediante la descripción macroscópica (18). En todos los cultivos positivos se observaron colonias de aspecto gamuzado, de color beige pálido, con ranuras radiales y, al reverso, de color marrón amarillento (figura 5).

Para la confirmación, se les practicó microcultivo, prueba de hidrólisis de la urea y prueba de perforación del cabello. A los cinco días de esporulación en el microcultivo, se observaron las características micromorfológicas de la conidiogénesis: hifas anchas irregulares, ramificadas, con numerosos tabiques, microconidios de varios tamaños y clamidosporas terminales (figura 6).

Las pruebas de hidrólisis de urea fueron positivas a los cinco días y las pruebas de perforación del cabello fueron positivas a los 14 días.



Figura 1. Niño, caso índice



Figura 2. Paciente 8

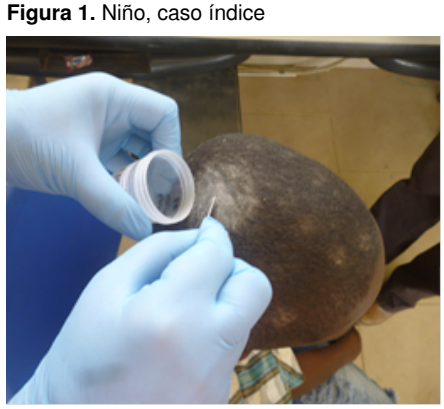


Figura 3. Recolección de muestras

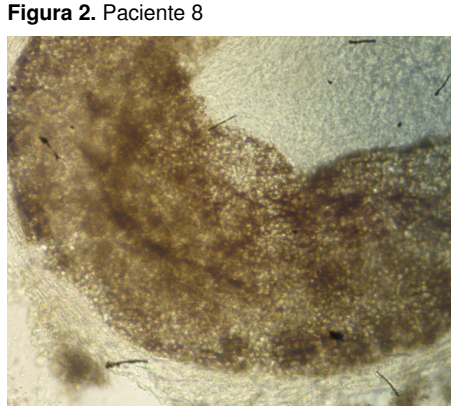


Figura 4. Parasitismo de tipo pilar, endotrix: las esporas y las hifas del hongo han invadido el interior de la estructura del pelo.

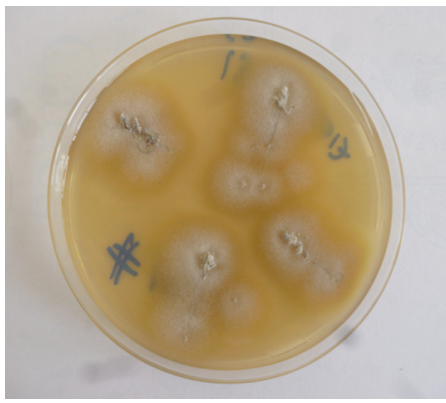


Figura 5. Cultivo de *Trichophyton tonsurans*

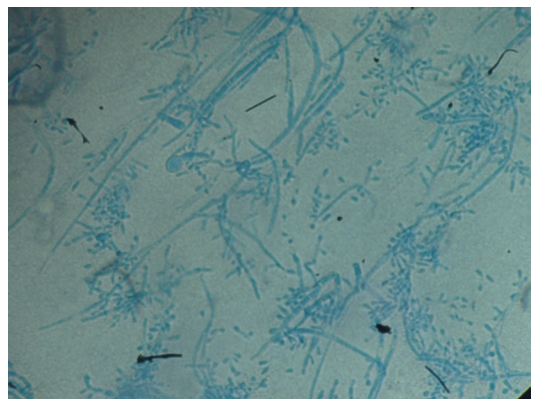


Figura 6. Montaje en azul de lactofenol: micromorfología de *Trichophiton tonsurans* a partir del microcultivo

Cuadro 1. Condiciones que favorecen la transmisión de las micosis cutáneas en la población estudiada.

Categoría	Elementos o fómites	N=32	Porcentaje
Comparten elementos de uso personal o prendas de vestir	Máquina rasuradora	28	87,5
	Toallas	18	56,3
	Cepillos o peines	16	50,0
	Gorras	15	46,9
Mascotas en casa	Tienen mascotas (perros y gatos)	30	93,8
	Permiten que la mascota se suba a los muebles	3	9,4
Comparten cama	Con una persona	13	40,6
	Con dos o más personas	8	25,0

Se construyó una base de datos con la información recolectada en las encuestas y se hizo un análisis descriptivo utilizando el paquete estadístico SPSS™, versión 23 para Windows.

Para adelantar este estudio, se tuvieron en cuenta las consideraciones éticas pertinentes para salvaguardar el interés de la ciencia y el respeto de la privacidad de los participantes. Por tanto, los resultados se reportan de manera agrupada.

En cuanto a las características sociodemográficas de la población, la mayoría de los casos eran de sexo masculino 27/32 (84 %), con una media de edad de nueve años y datos extremos de 2 y 16 años. El nivel de escolaridad varió desde el grado de jardín hasta el séptimo. La *tinea capitis* fue más frecuente entre los niños del grado tercero de primaria en un 37,5 % (12/32), grupo en el que se encontraba el caso índice. Con respecto a la zona de residencia, la vivienda rural dispersa fue más frecuente, 65,6 % (21/32), que la residencia en el caserío de la vereda.

Como factor de riesgo epidemiológico, el más frecuente fue el uso compartido de máquinas rasuradoras en un 87,5 % (28/32). De estos, 15 niños frecuentaban a dos peluqueros que visitaban regularmente la zona veredal y 13 compartían la máquina rasuradora con sus familiares en casa (cuadro 1).

En el examen físico, se encontraron 32 niños con lesiones alopécicas, descamativas, no inflamatorias, en punto negro. Dos de ellos presentaban lesiones en el tórax, indicativas de pitiriasis versicolor. La observación microscópica de las muestras de escamas de estas lesiones torácicas resultó positiva para *tinea capitis*. Las 32 muestras de cabellos se analizaron

mediante microscopía, previo tratamiento con preparación de hidróxido de potasio (KOH al 40 %) y, en el 78 % (26/32), se detectó parasitismo pilar de tipo endotrix tricofítico (figura 4). De estos, cinco cultivos fueron negativos, mientras que, en los restantes, se aisló e identificó *T. tonsurans* (63 %; 21/32).

Cabe destacar que, al momento de la toma de las muestras, cinco de los escolares habían recibido tratamientos empíricos de forma intermitente: dos con clotrimazol (6,3 %), dos con terbinafina (6,3 %) y uno con una combinación de clotrimazol más un corticosteroide (3,1 %). Los estudios micológicos del caso índice, que ya estaba en tratamiento, resultaron negativos.

Una vez se identificó el agente etiológico, se remitió el reporte de laboratorio a la oficina de Salud Ambiental de la Secretaría Departamental de Salud, encargada de contactar a la Entidad Promotora de Salud de los niños para acceder a los tratamientos antimicóticos. Igualmente, los resultados se enviaron al responsable del programa de salud ambiental del Hospital de Suárez (Cauca) para el manejo del brote epidémico de *tinea capitis* y demás actividades relacionadas con promoción de la salud y prevención de la enfermedad, como charlas informativas en la escuela para los niños, profesores, familias y los peluqueros de la zona.

Pasados seis meses, se investigó si los niños habían recibido tratamiento y, desde el hospital del municipio de Suárez (Cauca), se informó que tan solo tres niños (9,4 %) recibieron tratamiento completo, ocho (25 %) tratamiento incompleto y 21 de ellos (65 %) no recibieron ningún tratamiento.

Es de aclarar que no se tomaron muestras clínicas para estudios micológicos para demostrar la resolución de la micosis en los pacientes.

Consideraciones éticas

Como parte de las acciones de vigilancia epidemiológica de salud ambiental de la Secretaría Departamental de Salud del Cauca, se estableció el protocolo para el manejo de un brote en una escuela rural y se solicitó consentimiento informado verbal a los padres de familia y a los niños que tenían signos y síntomas de la micosis cutánea en el cuero cabelludo.

Discusión

En el presente estudio se pudo observar, por sus características, que los 32 niños presentaban un cuadro clínico sugestivo de *tinea capitis* seca. En el examen directo, por microscopía, se detectó parasitismo pilar de tipo endotrix tricofítico en el 78 % (25/32) de los casos. Esto indica que solo en el interior del cabello se encontraron artroconidios del hongo, con un diámetro superior a 8 µm, sin destrucción de la cutícula y congruente con el tipo de parasitismo pilar que desarrolla *T. tonsurans* (18-20).

La sensibilidad del examen directo varía según la experiencia del observador y la capacitación de la persona que toma la muestra, de quien dependen su cantidad y calidad. Habitualmente, el examen directo se efectúa en fresco utilizando sustancias que favorecen la disgregación de la queratina y aclaran la preparación, como el clásico hidróxido de potasio. Estas sustancias facilitan la visualización de las estructuras micóticas (hifas, conidios o blastoconidias) por su alto índice de refracción (18,19). Asimismo, los cultivos suelen tener una sensibilidad de más del 90 % cuando los pacientes no han recibido tratamientos y se considera la prueba de referencia para el diagnóstico definitivo (18,19).

En este caso, por el tipo de colonias, las pruebas confirmatorias y el desarrollo de parasitismo pilar de tipo endotrix, se confirmó que el hongo aislado en todos los cultivos era *T. tonsurans*. Se encontró una gran concordancia entre los cultivos positivos y la observación del tipo de parasitismo pilar al examen microscópico, en una relación de 1,2:1.

En este trabajo, se evidenció que cinco de los niños ya tenían tratamientos parciales en forma empírica con antimicóticos, los demás con resultados negativos pudieron haber tenido una carga baja o nula de esporas del hongo, lo que no permitió su detección en los cultivos.

Este brote de *tinea capitis* afectó más frecuentemente a la población infantil masculina, similar a lo que indican algunas revisiones sobre el tema (13), trabajos de investigación y otros brotes de *tinea capitis*, en países como España (9), Chile (16), Paraguay (21), Turquía (22), India y Egipto (23). Sin embargo, un estudio realizado en Guatemala indicó que el sexo femenino fue el más afectado (24). Algunas investigaciones indican que los hombres tienen una mayor predisposición a la tiña del cuero cabelludo y se postula que está parcialmente relacionada con una longitud de cabello más corta. Además, pueden quedar como portadores asintomáticos, constituyéndose en un reservorio persistente (25).

En el presente estudio, se identificó *T. tonsurans* como único agente etiológico del brote de *tinea capitis* en un grupo de escolares afrodescendientes, similar a lo reportado en Norteamérica y en países de la costa del Caribe, como República Dominicana y Puerto Rico (26,27).

No hay una explicación clara sobre la predilección de *T. tonsurans* por la población afrodescendiente (9). Se conoce que, en esta población, las características del folículo y el tallo piloso son curvados o en espiral, y su disposición paralela a la superficie cutánea hacen que el pelo sea más frágil y quebradizo, lo que podría sugerir mayor vulnerabilidad a enfermedades cutáneas asociadas con discromías, hiperpigmentación o hipopigmentación (28,29).

Un estudio en población infantil con *tinea capitis* por *T. tonsurans* en Estados Unidos, indicó que hay genes implicados en la propensión a estas infecciones cutáneas en la población afroamericana (30). Recientemente, se reportó una predilección genética de sufrir dermatofitosis relacionada con la deficiencia de la proteína de tipo caspasa CARD9, la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad HLA-DR4 y HLA-DR8, la baja expresión de la interleucina 22, β-defensina 2 y 4, así como mutaciones en la dectina 1, lo que aumenta la prevalencia de la enfermedad en miembros de una misma familia (31). Además, las migraciones de poblaciones influyen en la distribución de la enfermedad, lo que ha ocasionado un cambio en su perfil epidemiológico (9,12,16,23,32,33)

Trychophyton tonsurans es un dermatofito antropofílico y un agente patógeno oportunista, considerado como especie emergente en Colombia (34). Causa brotes epidémicos en escuelas, hogares infantiles e intrafamiliares donde se mantiene contacto cercano con compañeros y familiares, y en los que prevalece el uso de elementos comunes como las máquinas rasuradoras de este caso, en el que los niños frecuentaban dos peluqueros que atendían en la misma vereda o compartían la misma máquina rasuradora en la familia.

Este sería el segundo registro de un brote de *tinea capitis* por *T. tonsurans* en Colombia desde que, en 1981, Castañeda *et al.* reportaron un brote epidémico en cuatro niños de una aldea para huérfanos en Bogotá (35). Otros brotes en población escolar y causados por este mismo agente etiológico, se han reportado en Valparaíso (Chile) (16), en Madrid (España) (36) y en París (Francia) (37).

Debe considerarse que el municipio de Suárez se encuentra ubicado al noroccidente del departamento del Cauca, con una altura de 1.081 msnm y una temperatura media de 27 °C (38), condiciones que determinan un ambiente cálido y húmedo, favorable para el desarrollo de hongos. A esto se suman factores predisponentes, como la edad de los pacientes, las condiciones sociodemográficas, la falta de agua potable en las casas, la deficiencia del aseo personal diario y la costumbre de compartir objetos de aseo personal, como las máquinas rasuradoras, los cepillos de cabello y las gorras, los cuales permiten la contaminación con los artroconidios de *T. tonsurans.* Se debe hacer una descontaminación previa de los fómites para su uso entre persona y persona, situación ya identificada en otros países, donde se asocia la presentación de esta micosis con deficiencias en el cuidado del aseo personal, los objetos personales compartidos y los estratos socioeconómicos bajos (3,32-33).

Trychophyton tonsurans es muy contagioso y puede causar infecciones graves y crónicas (39), como sucedió en el caso índice, el niño que llevaba más de tres años con los síntomas y en quien se observó parasitismo pilar de tipo endotrix, pero no se logró aislar el hongo por encontrarse, en ese momento, en tratamiento antimicótico.

Por lo tanto, es importante establecer medidas educativas encaminadas a disminuir la frecuencia y la prevalencia de esta dermatofitosis, así como a prevenir su transmisión y sus recidivas en la población general, en especial, en la población más afectada que son los niños en edad escolar (40).

Actualmente, se recomienda el estudio clínico y el de laboratorio: la sensibilidad disminuida o la resistencia *in vitro* de los dermatofitos a los antimicóticos de uso común (terbinafina, itraconazol, voriconazol y amorolfina), y la resistencia del paciente, ya que el tratamiento de estas afecciones no depende únicamente de la concentración inhibitoria mínima del hongo, sino también, de la reacción del huésped (41-45).

En cuanto a la prevención, debe considerarse que los artroconidios de los dermatofitos pueden ser viables por meses o años en el medio ambiente, por lo que se recomienda hacer la desinfección regular de fómites como cepillos, peines y máquinas de peluquería con una solución acuosa de hipoclorito de sodio al 2 %; además, se debe remover todo el material que contenga queratina, como piel muerta y pelos, lo que facilita la desinfección. Cuando sea posible, se debe asear con aspiradora todos los posibles fómites en el hogar, como sillas y otros muebles (40). Como el 50 % de los miembros de la familia de un caso pueden verse afectados en forma asintomática, se recomienda hacer búsqueda activa entre todos ellos y, por supuesto, tratar los que resulten positivos.

En portadores asintomáticos con una gran carga de esporas, la terapia oral suele justificarse. Si la carga de esporas es poca, los hongos pueden erradicarse con tratamiento tópico único, pero deben hacerse un seguimiento cercano y estudios de micología repetidos, para asegurarse de que el

tratamiento haya sido eficaz. Idealmente, la erradicación fúngica, completa y eficaz, en los portadores asintomáticos, requiere del apoyo y la participación de los trabajadores sanitarios comunitarios, incluidas las enfermeras (40).

Como conclusión, se determinó que el agente etiológico del brote de *tinea capitis* no inflamatoria en el grupo de estudiantes del área rural del municipio de Suárez fue *T. tonsurans*. Se identificaron condiciones epidemiológicas predisponentes para la transmisión del hongo, principalmente, el uso compartido de elementos como las rasuradoras y la deficiencia en la higiene personal.

Es importante resaltar que, antes de iniciar un tratamiento farmacológico, sistémico o tópico, se deberían practicar las respectivas pruebas de laboratorio para identificar el agente etiológico de la infección y, así, tener una aproximación diagnóstica más acertada y elegir la mejor alternativa terapéutica. Se requiere confirmar la curación de la micosis, para lo cual es necesario hacer seguimiento a los niños después del tratamiento. El tratamiento para la infección debe ser sistémico, con la coadyuvancia de medicamentos tópicos en las áreas afectadas.

En cuanto a la ocurrencia de brotes epidémicos, se requiere una intervención multidisciplinaria para su control, con acciones que involucren a profesionales de la salud (asistenciales y de salud ambiental), visita inmediata al sitio del brote, recolección de muestras clínicas, estudios micológicos y, finalmente, educación sobre la prevención de la micosis a la población involucrada, familiares, instituciones educativas y agentes responsables de las salas de peluquería.

Agradecimientos

A los niños y sus padres de familia.

Referencias

1. Organización Panamericana de la Salud. Módulo de principios de epidemiología para el control de enfermedades (MOPECE). Segunda edición revisada. Investigación epidemiológica de campo: aplicación al estudio de brotes. Washington D.C.: OPS; 2002. p. 91.
2. De Hoog GS, Dukik K, Monod M, Packeu A, Stubbe D, Hendrickx M, *et al.* Toward a novel multilocus phylogenetic taxonomy for the dermatophytes. Mycopathologia. 2017;182:5-31. https://doi.org/10.1007/s11046-016-0073-9
3. Pires CA, da Cruz NF, Lobato AM, de Sousa PO, Carneiro FR, Mendes AM. Clinical, epidemiological, and therapeutic profile of dermatophytosis. An Bras Dermatol. 2014;89:259-64. https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20142569
4. Molina De Diego A. Aspectos clínicos, diagnósticos y terapéuticos de las dermatofitosis. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011;29(Suppl.3):S33-9. https://doi.org/10.1016/S0213-005X(11)70025-8
5. Patel GA, Schwartz RA. *Tinea capitis*: Still an unsolved problem? Mycoses. 2011;54:183-8. https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2009.01819.x
6. Al Aboud AM, Crane JS. Tinea capitis. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023. Consulted: August 8, 2023. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK536909/
7. John AM, Schwartz RA, Janniger CK. The kerion: An angry *tinea capitis*. Int J Dermatol. 2018;57:3-9. https://doi.org/10.1111/ijd.13423
8. Dascalu J, Zaaroura H, Renert-Yuval Y, Khamaysi Z, Avitan-Hersh E, Friedland R. Pediatric *Tinea Capitis*: A retrospective cohort study from 2010 to 2021. J Fungi. 2023;9:366. https://doi.org/10.3390/jof9030366
9. Cuétara MS, Del Palacio A, Pereiro M, Noriega AR. Prevalence of undetected *tinea capitis* in a prospective school survey in Madrid: Emergence of new causative fungi. Br J Dermatol. 1998;138:658-60. https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.1998.02181.x

10. Adesiji YO, Omolade FB, Aderibigbe IA, Ogungbe O, Adefioye OA, Adedokun SA, *et al*. Prevalence of *Tinea Capitis* among children in Osogbo, Nigeria, and the associated risk factors. Diseases. 2019;7:13. https://doi.org/10.3390/diseases7010013
11. Bongomin F, Gago S, Oladele RO, Denning DW. Global and multi-national prevalence of fungal diseases—estimate precision. J Fungi. 2017;3:57. https://doi.org/10.3390/jof3040057
12. Fuller LC. Changing face of *tinea capitis* in Europe. Curr Opin Infect Dis. 2009;22:115-8. https://doi.org/10.1007/sl1046-016-0058-8
13. Hay RJ. *Tinea Capitis*. Mycopathologia. 2017;182:87-93. https://doi.org/10.1007/s11046-016-0058-8
14. Petrucelli MF, de Abreu MH, Cantelli BAM, Segura GG, Nishimura FG, Bitencourt TA, *et al*. Epidemiology and diagnostic perspectives of dermatophytoses. J Fungi. 2020;6:1-15. https://doi.org/10.3390/jof6040310
15. Sánchez-Saldaña L, Matos-Sánchez R, Kumakawa H. Infecciones micóticas superficiales. Dermatol Peru. 2009;19:226-66.
16. Cruz R, Yáñez C, Carvajal L, Vieille P, Barrientos C. Brote de tiña por *Trichophyton tonsurans* en una escuela básica de Valparaíso, Chile. Período 2007-2009. Rev Chil Infectol. 2019;36:513-7. https://doi.org/10.4067/S0716-10182019000400513
17. Zuluaga A, Cáceres DH, Arango K, de Bedout C, Cano LE. Epidemiología de la *tinea capitis*: 19 años de experiencia en un laboratorio clínico especializado en Colombia. Infectio. 2016;20:225-30. https://doi.org/10.1016/j.infect.2015.11.004
18. Asociación Española de Micología. Procesamiento de las muestras superficiales. Rev Iberoam Micol. 2007:1-12. Fecha de consulta: 20 de mayo del 2023. Disponible en: http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo4.pdf
19. Morales N, Cardona-Castro N. Métodos de diagnóstico en micología. CES Med. 2018;1:41-52. https://doi.org/10.21615/
20. Rebollo N, López AP, Arena R. Tiña de la cabeza. Actas Dermosifiloorgr. 2008;99:91-100.
21. Aldama-Negrete MTM, Meza-Aquino MY, Insfrán-Duarte LS, Aldama-Olmedo OM, Aldama A, Pereira-Brunelli JG. Tinea *capitis*: Epidemiological characteristics of 132 cases. Rev Nac (Itauguá). 2019;11:19-29. http://doi.org/10.18004/rdn2019.0011.02.019-029
22. Akpolat NÖ, Akdeniz S, Elci S, Atmaca S, Özekinci T. *Tinea capitis* in Diyarbakir, Turkey. Mycoses. 2005;48:8-1. http://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2004.01065.x
23. Vargas-Navia N, Monroy GAA, Rúa CF, Caicedo JPM, Hernández JPR. Tinea *capitis* in children. Rev Chil Pediatr. 2020;91:773-83. http://doi.org/10.32641/rchped.vi91i5.1345
24. Elewski BE. *Tinea capitis*: A current perspective. J Am Acad Dermatol. 2000;42:1-20. http://doi.org/10.1016/s0190-9622(00)90001-x
25. Bassyouni RH, El-Sherbiny NA, Abd El Raheem TA, Mohammed BH. Changing in the epidemiology of *tinea capitis* among school children in Egypt. Ann Dermatol. 2017;29:13-9. http://doi.org/10.5021/ad.2017.29.1.13
26. Martínez E, León S de, Pérez E, Pacheco A, Rivas E, Borjas C, *et al*. *Tinea capitis*. Dermatologia Cosmet Medica y Quir. 2009;7:98-101.
27. Aharaz A, Jemec GBE, Hay RJ, Saunte DML. *Tinea capitis* asymptomatic carriers: What Is the evidence behind treatment? J Eur Acad Dermatol Venereol. 2021;35:2199-207. https://doi.org/10.1111/jdv.17462
28. Rodríguez C, Martínez E, Szepietowski JC, Pinto R, Frías-De León MG, Espinosa VM, *et al*. A systematic review of worldwide data on *tinea capitis*: Analysis of the last 20 years. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2021;35:844-83. https://doi.org/10.1111/jdv.16951
29. Arrazona J, Isa R, Torres E, Arena R. Tiña de la cabeza: descripción de los hallazgos dermatoscópicos en 37 pacientes. Rev Iberoam Micol. 2015;32:242-6. https://doi.org/10.1016/j.riam.2014.09.002
30. Silvia D, María F de, Aguirre R, Marcia D, Encinas S. Frecuencia de dermatosis en afrodescendientes bolivianos. Rev Med. 2010;16:17-25.
31. Ribera NM. Características y dermatosis propias de la piel oscura. Med Cutan Ibero Lat Am. 2016;44:11-23.

32. Abdel SM, Preuett BL. Genetic predictors of susceptibility to cutaneous fungal infections: A pilot genome wide association study to refine a candidate gene search. J Dermatol Sci. 2012;67:147-52. https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2012.05.003

33. Gnat S, Łagowski D, Nowakiewicz A. Genetic predisposition and its heredity in the context of increased prevalence of dermatophytoses. Mycopathologia. 2021;186:163-76. http://doi.org/10.1007/s11046-021-00529-1

34. Rippon JW. The changing epidemiology and emerging patterns of dermatophyte species. Curr Top Med Mycol. 1985;1:208-34. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-9547-8_8

35. Zhan P, Liu W. The changing face of dermatophytic infections worldwide. Mycopathologia. 2017;182:77-86. https://doi.org/ 10.1007/s11046-016-0082-8

36. Benavides J, Villanueva J. Tiña del cuero cabelludo por *Trichophyton tonsurans*: agente emergente en Colombia. Caso clínico. Rev Asoc Colomb Dermatol. 2019;18:99-101.

37. Castañeda E, Ordóñez N. Brote epidémico de *tinea capitis* por *Trichophyton tonsurans*. Biomedica. 1981;1:57. https://doi.org/10.7705/biomedica.v1i2.1780

38. Durán-Valle MT, Regodón-Domínguez M, Velasco-Rodríguez MJ, Aragón A, Gómez-Garcés JL. Epidemia de tiña por *Trichophyton tonsurans* en un área sanitaria de la Comunidad de Madrid (España). Rev Iberoam Micol. 2016;33:126-8. http://doi.org/10.1016/j.riam.2015.01.002

39. Viguié-Vallanet C, Serre M, Masliah L,Tourte-Schaefer C. Épidémie de teignes à *Trichophyton tonsurans* dans une école maternelle de la région parisienne. Ann Dermatol Venereol. 2005;132:432-8. https://doi.org/10.1016/s0151-9638(05)79304-2

40. Suárez en la región de Cauca - Municipio y alcaldía de Colombia. Fecha de consulta: 3 de noviembre de 2022. Disponible en: https://doi.org/10.1111/bjd.13196

41. Pilz JF, Koberle M, Kain A, Seidl P, Zink A, Biedermann T, *et al*. Increasing incidence of *Trichophyton tonsurans* in Munich—A single-centre observation. Mycoses. 2023;66:441-7. https://doi.org/10.1111/myc.13563

42. Fuller LC, Barton RC, Mohd-Mustapa MF, Proudfoot LE, Punjabi SP, Higgins EM. British Association of Dermatologists' guidelines for the management of *tinea capitis* 2014. Br J Dermatol. 2014;171:454-63. https://doi.org/10.1111/bjd.13196

43. Mereles-Rodríguez BE, Fiedler JN, Bruquetas A, Chade ME. Evaluación de la sensibilidad de hongos dermatofitos aislados de muestras clínicas a los antifúngicos. Rev Cienc Tecnol. 2020;34:101-6.

44. Chen X, Jiang X, Yang M, González U, Lin X, Hua X, *et al*. Systemic antifungal therapy for *tinea capitis* in children. Cochrane Database Syst Rev. 2016;5:CD00468. https://doi.org/10.1002/14651858.CD004685.pub3

45. Siopi M, Efstathiou I, Theodoropoulos K, Pournaras S, Meletiadis J. Molecular epidemiology and antifungal susceptibility of trichophyton isolates in Greece: Emergence of terbinafine-resistant *Trichophyton mentagrophytes* type VIII locally and globally. J Fungi (Basel). 2021;7:419. https://doi.org/10.3390/jof7060419

Biomédica 2023;43(Supl.1):69-76
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.6899

Presentación de caso

Hiperplasia pseudoepiteliomatosa: carcinoma escamocelular versus paracoccidioidomicosis oral, un caso con mirada dermatológica

Lina M. Osorio-Cock[1,2], Sandra Catalina Jaramillo-Pulgarín[3,4], Alba P. Ferrín-Bastidas[3], Diana Y. Molina-Colorado[1], Óscar M. Gómez-Guzmán[5], Alejandra Zuluaga[6], Juan G. McEwen-Ochoa[1,5], Martha E. Urán-Jiménez[1], María del Pilar Jiménez-Alzate[1]

[1] Grupo Micología Médica, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia
[2] Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia.
[3] Medicáncer, Medellín, Colombia
[4] Departamento de Dermatología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.
[5] Grupo de Biología Celular y Molecular, Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín, Colombia
[6] Grupo de Micología Médica y Experimental, Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín, Colombia

La paracoccidioidomicosis es una micosis sistémica endémica en Latinoamérica. La presentación más frecuente compromete crónicamente los pulmones, la piel y las mucosas. Al inicio, este paciente presentó, por varios años, una lesión única en la mucosa oral que, en ausencia de otros síntomas, se relacionó con una neoplasia maligna, específicamente con un carcinoma escamocelular.
La diferenciación entre los dos diagnósticos se hace mediante un examen directo, un estudio histopatológico y cultivos iniciales y subsecuentes. Sin embargo, tales estudios no fueron concluyentes. Después de varias consultas y pruebas, con los resultados del examen directo, la inmunodifusión y la PCR en tiempo real se confirmó el diagnóstico de paracoccidioidomicosis crónica multifocal.
Este caso alerta sobre la ausencia de sospecha clínica de micosis endémicas, dada la presencia de lesiones mucocutáneas que pueden ser producidas por hongos como *Paracoccidioides* spp, y la importancia de considerarlas entre los diagnósticos diferenciales.

Palabras clave: *Paracoccidioides*; paracoccidioidomicosis; carcinoma de células escamosas; diagnóstico diferencial; micosis; reacción en cadena en tiempo real de la polimerasa.

Pseudoepitheliomatous hyperplasia: Squamous cell carcinoma versus oral paracoccidioidomycosis, a case from a dermatological perspective

Paracoccidioidomycosis is a systemic mycosis endemic in Latin America. The most frequent form involves a chronic compromise of the lungs, skin, and mucosa. The patient started with a single oral lesion that lasted for several years. The absence of other symptoms pointed out a possible malignant neoplasm, specifically a squamous cell carcinoma.
Differentiation between both diagnoses –fungal infection and carcinoma– depends on the results of the direct examination, the histopathological study, and the initial and subsequent cultures. However, in this case, those findings were not conclusive. The coexistence of both diagnoses is frequent and increases the diagnostic challenge. After several consultations and tests, direct examination, immunodiffusion and real-time PCR findings the multifocal chronic paracoccidioidomycosis diagnosis was confirmed.
This case warns about a systematical absence of clinical suspicion of endemic mycoses before the appereance of mucocutaneous lesions, which can be produced by fungi like *Paracoccidioides* spp, and the importance of considering those mycoses among the differential diagnoses.

Keywords: *Paracoccidioides*; paracoccidioidomycosis; carcinoma, squamous cell; diagnosis, differential; mycoses; real-time polymerase chain reaction.

La paracoccidioidomicosis es una de las micosis sistémicas y endémicas más frecuentes en Latinoamérica (1,2). Aún no se conoce el hábitat preciso de *Paracoccidioides* spp., pero se sospecha que es el suelo de los entornos rurales. Los principales hospederos accidentales del hongo son el hombre y el armadillo, especialmente la especie *Dasypus novemcinctus*, aunque otros animales también han sido implicados, como aquellos que probablemente se infectan en ambientes rurales o periurbanos (2).

Recibido: 21/02/2023
Aceptado: 08/06/2023
Publicado: 13/06/2023

Citación:
Osorio-Cock LM, Jaramillo-Pulgarín SC, Ferrín-Bastidas AP, Molina-Colorado DY, Gómez-Guzmán OM, Zuluaga A, *et al.* Hiperplasia pseudoepiteliomatosa: carcinoma escamocelular versus paracoccidioidomicosis oral, un caso con mirada dermatológica. Biomédica. 2023;43(Supl.1):69-76.
https://doi.org/10.7705/biomedica.6899

Correspondencia:
María del Pilar Jiménez-Alzate, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Carrera 51 D N|62-29, laboratorio 218, Medellín, Colombia
Teléfonos: (604) 219 6053 y (313) 647 4333
delpilar.jimenez@udea.edu.co

Contribución de los autores:
Lina M. Osorio-Cock: apoyo en el seguimiento y consecución del tratamiento para el paciente, y preparación del manuscrito
Sandra Catalina Jaramillo-Pulgarín y Alba P. Ferrín-Bastidas: evaluación del paciente, remisión del paciente al Laboratorio de Micología Médica y revisión del manuscrito
Diana Y. Molina-Colorado y Martha E. Urán-Jiménez: procesamiento y evaluación de las muestras del paciente en el Laboratorio de Micología y revisión del manuscrito
Alejandra Zuluaga: realización de serologías del paciente (inmunodifusión y fijación de complemento) en la Corporación para Investigaciones Biológicas
Óscar M. Gómez-Guzmán y Juan G. McEwen-Ochoa: realización de las pruebas de biología molecular y revisión del manuscrito
María del Pilar Jiménez-Alzate: evaluación y toma de muestras del paciente en el Laboratorio de Micología Médica, prescripción del tratamiento, seguimiento del paciente y revisión del manuscrito

Financiación:
Universidad de Antioquia; proyecto financiado por el Comité para el Desarrollo de la Investigación (CODI); código: 2020-34153.

Conflicto de intereses:
Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

La enfermedad es más común en hombres agricultores (relación hombre-mujer de 11:1) (2) y se desarrolla principalmente en los pulmones, después de la inhalación de propágulos infectantes como aleurioconididas y fragmentos de hifas (1,2). Si la infección no es contenida, se pueden presentar dos formas clínicas: 1) aguda o subaguda, más común en niños, adolescentes y personas inmunocomprometidas; y 2) crónica, más frecuente en la población general (1,2). La presentación crónica compromete usualmente los pulmones, la piel y las mucosas; ocasionalmente, las glándulas suprarrenales, los ganglios linfáticos y el sistema nervioso, entre otros sitios (2). Los pulmones son el sitio primario de la infección que, con frecuencia, se manifiesta con tos y disnea (1,2), aunque los síntomas pueden pasar desapercibidos y los hallazgos de la auscultación pueden ser normales (3). La presentación típica en la piel y las mucosas son úlceras dolorosas, con fondo granulomatoso y puntos hemorrágicos en el rostro y la mucosa oral, nasal, faríngea o gastrointestinal (1,2).

La presentación de una lesión oral única en ausencia de otros síntomas hace que el principal diagnóstico diferencial sea una neoplasia maligna, particularmente un carcinoma escamocelular (4-6). En la literatura se han reportado algunos casos similares en los que la diferenciación se ha realizado mediante el examen directo y el estudio histopatológico.

En algunos casos el estudio histopatológico no es concluyente por lo cual se reportan los hallazgos como hiperplasia pseudoepiteliomatosa: una proliferación reactiva, resultado de un mecanismo de eliminación transepitelial del material que es reconocido como extraño por la respuesta inmunológica del hospedero.

La hiperplasia pseudoepiteliomatosa se observa en respuesta a una amplia variedad de condiciones como: infecciones (especialmente crónicas), neoplasias (el carcinoma escamocelular es una de ellas), inflamación y trauma (7). No obstante, en este caso el examen directo, el estudio histopatológico y los cultivos iniciales y subsecuentes no fueron concluyentes.

Presentación de caso

Se presenta el caso de un hombre de 56 años, residente en el suroeste antioqueño, agricultor, que consultó al Servicio de Dermatología por una lesión dolorosa en la mucosa oral, de nueve años de evolución (figura 1). Refiere como antecedente personal alto consumo de tabaco (30 paquetes al año).

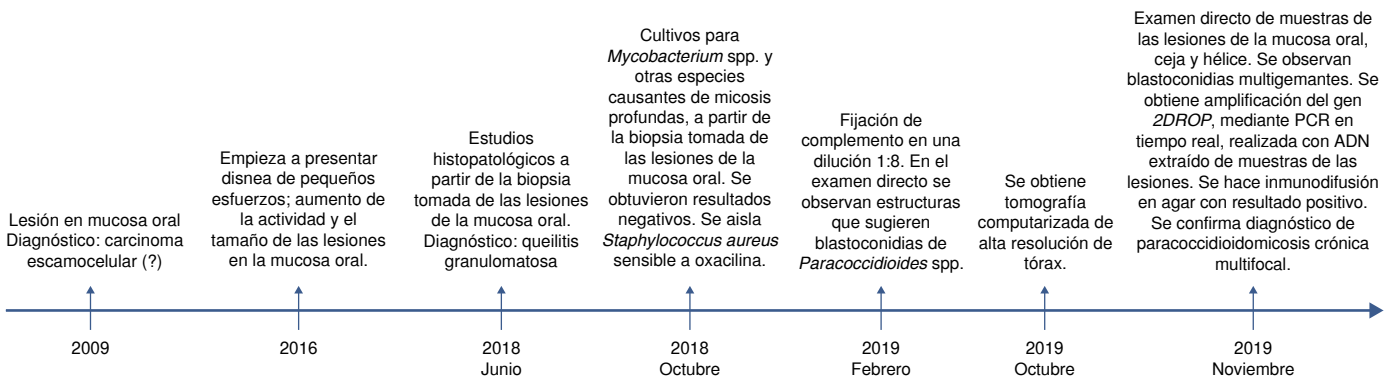


Figura 1. Línea de tiempo del diagnóstico de paracoccidioidomicosis crónica multifocal en el paciente del caso presentado



Figura 2. Se aprecia la lesión de la lengua, la mucosa oral y los labios, en forma de placa violácea infiltrada con úlcera central granulomatosa, con compromiso de la mucosa oral y el mentón; cambios fibrocicatriciales en la lengua y las encías, y pérdida de numerosas piezas dentales y cerca de la mitad del cuerpo lingual.

En el examen físico, se observó una placa violácea infiltrada con úlcera central granulomatosa con amplio compromiso de la mucosa oral y el mentón, con presencia de cambios fibrocicatriciales en la lengua y las encías, pérdida de numerosas piezas dentales y cerca de la mitad del cuerpo lingual (figura 2). La impresión diagnóstica inicial fue un carcinoma escamocelular.

El paciente regresó a consulta nueve años más tarde por presentar disnea y aumento del tamaño de las lesiones de la mucosa oral, razón por la cual se obtuvo una biopsia. El estudio histopatológico evidenció un proceso inflamatorio de tipo granulomatoso supurativo. La sospecha diagnóstica cambió a una micosis profunda o una enfermedad por micobacterias. Se solicitaron las tinciones de Ziehl-Neelsen, Ziehl-Neelsen modificado, ácido peryódico de Schiff y metenamina de plata (Grocott-Gomori), para la identificación de microorganismos, pero los resultados fueron negativos.

El paciente volvió a consulta cuatro meses más tarde y se practicaron nuevas biopsias de las lesiones con las cuales se hicieron cultivos para bacterias, *Mycobacterium* spp. y agentes causales de micosis profundas. Los cultivos para *Mycobacterium tuberculosis* y los de hongos de micosis profundas fueron negativos después de ocho semanas de incubación; únicamente se aisló *Staphylococcus aureus,* sensible a oxacilina, para lo cual se le prescribió trimetoprim-sulfametoxazol por siete días. La conclusión de este primer estudio histopatológico fue queilitis granulomatosa.

El paciente volvió a consultar dos años después ya que su condición clínica progresó con presencia de nueva placa violácea, infiltrada, con costra serohemática, dolorosa en la ceja derecha (figura 3) sumada a las lesiones de la mucosa oral que se describieron anteriormente. Se le realizó un hemograma tipo III (cuadro 1), prueba para el virus de la inmunodeficiencia humana (negativa), serología para la detección de treponema causante de sífilis (no reactiva), creatinina en suero con valor de 1,42 mg/dl y una tomografía de tórax de alta resolución (TACAR).

La sospecha diagnóstica de una micosis profunda persistió, por lo cual el paciente se remitió al Laboratorio de Micología Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia, en donde se profundizó en la historia clínica: el paciente refirió disnea de medianos esfuerzos, sudoración nocturna,

pérdida de peso y tos. Además, no presentó mejoría de las lesiones a pesar del tratamiento antibiótico. Se tomaron nuevas muestras de las lesiones para estudio. En la microscopía directa se observaron estructuras compatibles con blastoconidias grandes, de contornos irregulares y sin contenido en su interior, sugestivas de *Paracoccidioides* spp. Sin embargo, en el cultivo solo se obtuvo el crecimiento de colonias de *Candida albicans*. Se realizó fijación del complemento para *Paracoccidioides* spp. y se encontró reactividad en una dilución de 1:8 que reforzó el diagnóstico probable de paracoccidioidomicosis.

Luego del diagnóstico probable de paracoccidioidomicosis se continuó con la valoración clínica del paciente durante nueve meses, quien asistió al seguimiento con una nueva placa violácea dolorosa en la hélice izquierda (figura 4), aumento de la extensión de la lesión de la mucosa oral y persistencia de la lesión de la ceja izquierda. Además, se encontraron adenopatías cervicales e inguinales y se auscultó hipoventilación en las bases pulmonares con crepitación en la base pulmonar izquierda y sibilancias de predominio superior. En el reporte de la tomografía se describieron múltiples granulomas calcificados, distribuidos en todos los segmentos y los lóbulos pulmonares, con predominio en las bases y la región parahiliar, asociados a cambios fibrocicatriciales. También se observaron algunos granulomas calcificados en los lóbulos superiores. Al valorar las lesiones más calcificadas en los lóbulos inferiores, se observó que algunas de ellas contenían material no calcificado en los bronquios dilatados, lo que sugirió la posibilidad de bronquiectasias (figuras 5A y 5B). Se repitió la toma de muestras para estudio con raspado exhaustivo de las lesiones de la mucosa oral, la ceja y la hélice izquierda, y se hizo venopunción para la obtención de suero.



Figura 3. Lesión granulomatosa en la ceja derecha: placa infiltrada cubierta con costra serohemática

Cuadro 1. Resultados del hemograma tipo III realizado al paciente.

Serie blanca	**Serie roja**
Leucocitos: 11,4 x 103/µl**	Eritrocitos: 5,74 x 106/µl**
Linfocitos: 25,4 % (2,9 x 103/µl)	Hemoglobina: 16,5 g/dL
Monocitos: 10,7 % (1,2 x 103/µl)**	Hematocrito: 48,8 %
Granulocitos: 63,9 % (7,3 x 103/µl)**	Volumen corpuscular medio: 85,1 fl
Plaquetas	Hemoglobina corpuscular media: 28,7 pg
Plaquetas: 373 x 103/µl	Concentración de la hemoglobina corpuscular media: 33,8 g/dl
Volumen plaquetario medio: 7,1 fl**	RDW-CV: 10,5 %
Distribución plaquetaria: 10 fl	RDW-DE: 33,8 fl**
Plaquetocrito: 0,26 %	

RDW: *red cell distribution width* (amplitud de distribución eritrocitaria); CV: coeficiente de variación; DE: desviación estándar

** parámetros alterados



Figura 4. a. Lesión en la hélice izquierda: placa violácea ulcerada. **b.** Foto panorámica en la que se puede observar el compromiso de las lesiones en labio inferior y ceja derecha.

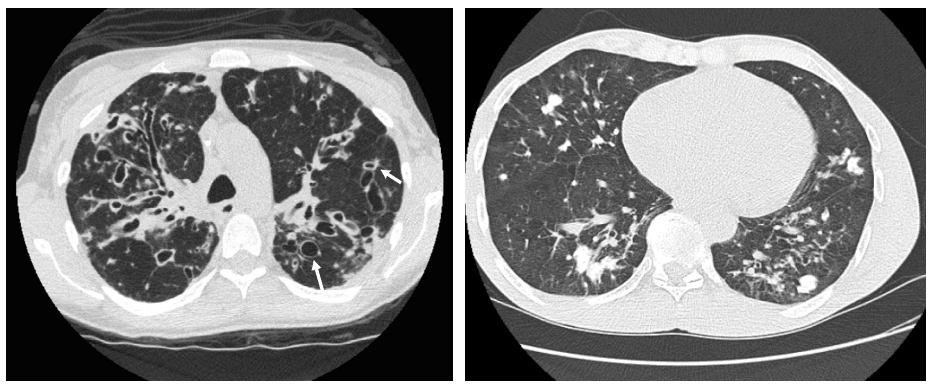


Figura 5. Tomografía computarizada de alta resolución de tórax (TACAR). Las flechas de la imagen izquierda indican múltiples granulomas calcificados distribuidos en todos los segmentos y los lóbulos pulmonares con predominio en las bases y la región parahiliar.

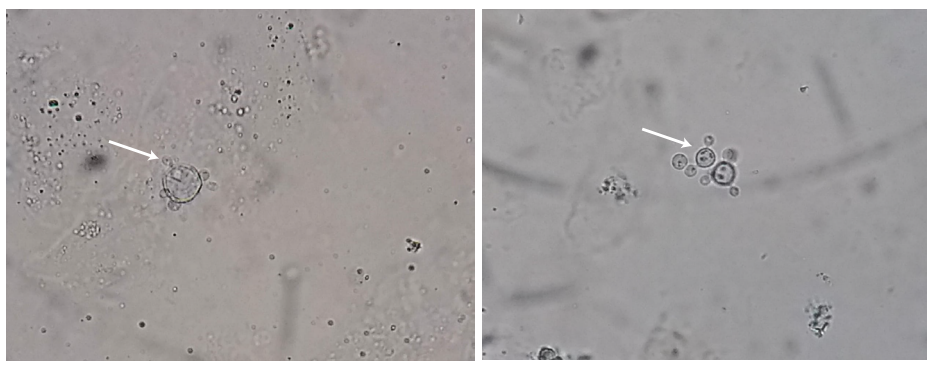


Figura 6. Examen directo de las muestras de raspado de la lesión de la lengua, la mucosa oral, el labio, la ceja y la hélice izquierda, tratadas con solución del 10 % de hidróxido de potasio (KOH) y 0,2 % de azul de Evans. Se observan blastoconidias multigemantes de pared gruesa con inclusiones intracitosplasmáticas.

Se realizó inmunodifusión en gel de doble agar para la detección de anticuerpos contra *Paracoccidioides* spp. con resultado positivo. En el examen directo, con solución del 10 % de hidróxido de potasio, se observaron blastoconidias multigemantes de pared gruesa con inclusiones citoplasmáticas (figura 6). Asimismo, se realizó PCR en tiempo real con SYBR Green y ADN extraído de las muestras tomadas por raspado de las lesiones. La PCR se realizó con iniciadores dirigidos a la amplificación específica de una región genómica única de *Paracoccidioides* spp. denominada *2DROP* (8). El ADN del hongo se amplificó en la PCR en tiempo real y se verificó con el análisis de la curva de fusión y por electroforesis en gel de agarosa.

Con los resultados tanto del examen directo, la inmunodifusión y la PCR en tiempo real se confirmó el diagnóstico de paracoccidioidomicosis crónica multifocal. Se prescribió tratamiento al paciente de 600 mg de itraconazol por día, durante tres días. Posteriormente se dosificó con 200 mg por día, mínimo por un año, previa verificación del perfil hepático normal. En los seguimientos mensuales que se le realizaron al paciente presentó mejoría clínica satisfactoria.

Consideraciones éticas

El Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia avaló el consentimiento informado, usado para la evaluación del paciente, la toma y el procesamiento de las muestras; asimismo, el uso de la información del paciente, de las fotografías de las lesiones y la publicación de los resultados fue autorizado por el paciente mediante su firma del consentimiento informado avalado.

Discusión

Este caso tiene algunas características representativas de la enfermedad. Por ejemplo, sobre la epidemiología de la paracoccidioidomicosis crónica, esta ocurre en su mayoría en personas mayores de 30 años (2), predominantemente en hombres, en una proporción de 11:1 (9) y afecta principalmente a individuos con labores relacionadas con la tierra, como agricultores (2).

En los pacientes, los sitios más frecuentemente involucrados son los pulmones (76,7 %) y las mucosas (63 %) (10). Sin embargo, en la auscultación se encontraron mínimas anormalidades en comparación con los hallazgos radiográficos, con una clara disociación entre los síntomas y los estudios radiológicos o de otras imágenes diagnósticas (2). La desatención a los escasos síntomas pulmonares por parte del paciente y del personal sanitario, sumado a la presencia de un alto factor de riesgo para enfermedades pulmonares como el alto consumo de tabaco, influyó inicialmente al considerar otras opciones diagnósticas. Más importante, la presencia de una única úlcera en la mucosa oral, en ausencia aparente de otros síntomas, y la exposición prolongada al tabaco, hizo que la primera impresión diagnóstica fuera una neoplasia maligna, correspondiente a un carcinoma escamocelular (4-6).

En la literatura se han documentado casos semejantes. Usualmente el diagnóstico diferencial se logra mediante el examen directo y el estudio histopatológico. El primero con una sensibilidad cercana al 74,5 %, que varía dependiendo de la muestra, y el segundo con una sensibilidad del

96,7 % (11). Además, los cultivos son positivos en el 80 % de los casos (12). Sin embargo, en este caso el diagnóstico no se logró, al principio, por estos métodos. Si bien se obtuvieron indicios de una infección micótica en la primera oportunidad, en una segunda ocasión se sospechó de *Paraccocidiodes* spp. al observar unas estructuras compatibles con blastoconidias grandes, de contornos irregulares y sin contenido en su interior.

Hallazgos similares se han descrito antes en el trabajo de Restrepo, en el 2000, en el cual se estudiaron aspectos morfológicos de *Paracoccidioides brasiliensis* en tejido de ganglios linfáticos de pacientes con enfermedad activa y otros con enfermedad latente. En esta última, observaron formas irregulares y atípicas del hongo (13). Solo se logró confirmar el diagnóstico en una tercera instancia, en un laboratorio especializado, donde se maximizaron las medidas para obtener una adecuada muestra y en donde se pudo incluir una prueba sensible de biología molecular como la PCR en tiempo real. La observación del hongo en el examen directo y la detección del ADN de *Paracoccidioide*s spp. en la muestra permitieron, de una forma rápida (menos de 24 horas después de tomada la muestra), confirmar la sospecha clínica de paracoccidioidomicosis.

Es importante tener en cuenta la dificultad del diagnóstico ante la similitud clínica entre la hiperplasia pseudoepiteliomatosa con otras enfermedades granulomatosas o incluso con un carcinoma escamocelular (4-6). Aun así, la displasia y las mitosis atípicas encontradas en el carcinoma escamocelular no se ven en la paracoccidioidomicosis (4-6), pero la coexistencia de ambos diagnósticos en el 58 % de los casos (14) impide llegar a un diagnóstico preciso.

Conclusión

En este caso se resalta la perseverancia requerida para lograr el diagnóstico de las presentaciones clínicas de las micosis sistémicas endémicas, la importancia de indagar por síntomas o signos que el paciente no manifiesta (como los pulmonares), la consideración de los diagnósticos diferenciales y la intensificación de las medidas para mejorar el desempeño diagnóstico de las pruebas. Aun así, los resultados pueden ser inconclusos o incluso fallar si no se trata de laboratorios con experiencia en este tipo de micosis.

Referencias

1. Hahn RC, Hagen F, Poncio Mendes R, Burger E, Ferreira Nery A, Pereira Siqueira N, *et al.* Paracoccidioidomycosis: current status and future trends. Clin Microbiol Rev. 2022;35:e0023321. https://doi.org/10.1128/cmr.00233-21
2. Restrepo-Moreno A, Tobón-Orozco AM, González-Marín A. Paracoccidioidomycosis. In: Bennett JE, Dolin R, and Blaser MJ, editors. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 9th edition. Philadelphia, PA: Elsevier; 2020. p. 3211-21.
3. Correa AL, Restrepo A, Franco L, Gómez I. Paracoccidioidomicosis: coexistencia de lesiones extrapulmonares y patología pulmonar silente. Descripción de 64 pacientes. Acta Méd Colomb. 1991;16:304-8.
4. De Oliveira Gondak R, Mariano FV, dos Santos Silva AR, Vargas PA, Ajudarte Lopes M. Single oral paracoccidioidomycosis mimicking other lesions: report of eight cases. Mycopathologia. 2012;173:47-52. https://doi.org/10.1007/s11046-011-9461-3
5. Kaminagakura E, Graner E, Paes de Almeida O, Di Hipolito Junior O, Ajudarte Lopes M. Oral paracoccidioidomycosis or squamous cell carcinoma? Gen Dent. 2004;52:48-50.
6. Meneses-García A, Mosqueda-Taylor A, Morales-de la Luz R, Ruiz-Godoy Rivera LM. Paracoccidioidomycosis: report of 2 cases mimicking squamous cell carcinoma. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2002;94:609-913. https://doi.org/10.1067/moe.2002.129179

7. Nayak VN, Uma K, Girish HC, Murgod S, Shyamala K and Naik RB. Pseudoepitheliomatous hyperplasia in oral lesions: A review. J Int Oral Health. 2015;7:148-52.

8. Gallo JE, Torres I, Gómez OM, Rishishwar L, Vannberg F, Jordan IK, McEwen JG, Clay OK. New Histoplasma diagnostic assays designed via whole genome comparisons. J Fungi. 2021;7:544. https://doi.org/10.3390/jof7070544

9. Queiros-Telles F, Hassan Fahal A, Falci DR, Caceres DH, Chiller T, Pasqualotto AC. Neglected endemic mycoses. Lancet Infect Dis. 2017;17:e367-77. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30306-7

10. Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. Clin Microbiol Rev. 1993;6:89-117. https://doi.org/10.1128/CMR.6.2.89

11. Moreto TC, Marques MEA, de Oliveira MLSC, Moris DV, de Carvalho LR, Mendes RP. Accuracy of routine diagnostic tests used in paracoccidioidomycosis patients at a university hospital. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2011;105:473-8. https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2011.03.001

12. Restrepo A, Tobón AM, Agudelo CA. Paracoccidioidomycosis. In: Hospenthal DR, Rinaldi MG, editors. Diagnosis and treatment of human mycoses. Totowa, NJ: Humana Press; 2008. p. 331-42.

13. Restrepo A. Morphological aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* in lymph nodes: implications for the prolonged latency of paracoccidioidomycosis. Med Mycol. 2000;38:317-22. https://doi.org/10.1080/mmy.38.4.317.322

14. Da Silva Rodrigues G, Bittencourt Severo C, de Mattos Oliveira F, da Silva Moreira J, Prolla JC, Severo LC. Association between paracoccidioidomycosis and cancer. J Bras Pneumol. 2010;36:356-62. https://doi.org/10.1590/s1806-37132010000300014

Biomédica 2023;43(Supl.1):77-88
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.6732

Artículo original

Evaluación de la formación de biopelículas en aislamientos bacterianos y fúngicos por el método semicuantitativo de microtitulación con cristal violeta y el cualitativo de agar con rojo Congo

Xiomara Moreno[1,2], Melanie Ventura[3], María Mercedes Panizo[4], María Fátima Garcés[5]

[1] Departamento de Microbiología, Instituto Médico La Floresta, Caracas, Venezuela
[2] Cátedra de Bacteriología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela
[3] Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela
[4] Servicios Hospitalarios MCG, Caracas, Venezuela
[5] Laboratorio de Investigaciones Básicas y Aplicadas, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

Introducción. El 65 % de las infecciones humanas son producidas por bacterias o levaduras, cuya capacidad de formar biopelículas las hace más resistentes a los antimicrobianos y antifúngicos.
Objetivo. Determinar la capacidad de formación de biopelículas en aislamientos bacterianos y fúngicos por medio de los métodos cuantitativo de microtitulación con cristal violeta y cualitativo de cultivo en agar con rojo Congo.
Materiales y métodos. Con el método cuantitativo, se utilizaron los medios de cultivo infusión cerebro-corazón, tripticasa de soya y Müeller-Hinton para aislamientos bacterianos; para levaduras, se usaron caldo infusión cerebro-corazón y Sabouraud dextrosa. Para el método cualitativo de cultivo en agar, se utilizaron los mismos medios de cultivo más una solución con 3 % de rojo Congo y 10 % de dextrosa. Cómo método de referencia, se utilizó la propuesta de Stepanovic *et al*.
Resultados. Se evaluaron 103 aislamientos bacterianos y 108 de levaduras. No es recomendable sustituir el caldo infusión cerebro-corazón por los caldos tripticasa de soya y Müeller-Hinton en el método cuantitativo, para evaluar la formación de biopelículas en los aislamientos bacterianos. El medio Sabouraud dextrosa, en caldo y agar, puede sustituir al de infusión de cerebro-corazón para evaluar la formación de biopelículas en levaduras, tanto por el método cuantitativo como por el cualitativo.
Conclusión. El estudio de las biopelículas en el laboratorio de microbiología, a partir del método cualitativo de cultivo en agar con rojo Congo, es un procedimiento sencillo, rápido y de bajo costo, que proporciona información útil para el diagnóstico y la terapéutica de infecciones persistentes causadas por bacterias y levaduras.

Palabras clave: biopelículas; bacterias grampositivas; bacterias gramnegativas; levaduras; rojo Congo.

Assessment of biofilms formation of bacterial and fungal isolates using qualitative Congo red agar and semiquantitative crystal violet microtiter methods

Introduction. Sixty-five percent of human infections are caused by bacteria or yeasts able to form biofilms. This feature makes them more resistant to antimicrobials and antifungals.
Objective. To determine biofilm formation capacity of bacterial and fungal isolates by quantitative crystal violet microtiter and qualitative Congo red agar methods.
Materials and methods. Brain-heart infusion, trypticase soy broth and Müeller-Hinton culture media were used in bacterial isolates for the quantitative method; brain-heart infusion broth and Sabouraud dextrose were used for yeasts. The same culture media plus 3% Congo red and 10% dextrose were used to apply the qualitative method in agar. The proposal by Stepanovic, *et al*. was used as a reference method.
Results. We evaluated 103 bacterial isolates and 108 yeasts isolates. We did not recommend substitute brain-heart infusion broth for trypticase soy and Müeller-Hinton broths for biofilm formation assessment in bacterial isolates using the quantitative method. Sabouraud dextrose medium, both broth and agar, can replace brain-heart infusion to assess biofilm formation in yeasts, quantitatively and qualitatively.
Conclusion. The study of biofilms in the microbiology laboratory, using Congo red agar qualitative method, is a simple, fast, and inexpensive procedure that provides precise information for the diagnosis and treatment of persistent infections caused by bacteria and yeasts.

Keywords: Biofilms; Gram-positive bacteria; Gram-negative bacteria; yeasts; Congo red.

Recibido: 19/09/2022
Aceptado: 15/11/2022
Publicado: 13/12/2022

Citación:
Moreno X, Ventura M, Panizo MM, Garcés MF. Evaluación de la formación de biopelículas en aislamientos bacterianos y fúngicos por los métodos semicuantitativo de microtitulación con cristal violeta y cualitativo de agar con rojo Congo. Biomédica. 2023;43(Supl.1):77-88.
https://doi.org/10.7705/biomedica.6732

Correspondencia:
Xiomara Moreno, Calle Santa Ana sótano 2, Departamento de Microbiología, Instituto Médico La Floresta, Caracas, Venezuela
Teléfono: (+58) 42 6121 3570
xmorenoc1356@gmail.com

Contribución de los autores:
Xiomara Moreno: conceptualización y diseño del estudio, investigación, análisis e interpretación de resultados y escritura del manuscrito
Melanie Ventura: investigación y escritura del manuscrito
María Mercedes Panizo: diseño estadístico, análisis e interpretación de resultados y escritura del manuscrito
María Fátima Garcés: investigación

Financiación:
El estudio no tuvo financiación externa.

Conflicto de intereses:
Los autores manifiestan no tener ningún conflicto de intereses que impida la publicación del artículo.

Las biopelículas son comunidades de microorganismos infiltrados en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a un substrato inerte o tejido vivo. Estas biopelículas están conformadas principalmente por bacterias y levaduras, son heterogéneas, aumentan la capacidad de sobrevivir de sus productores, presentan diversos microambientes en su interior, mantienen la comunicación entre los microorganismos e incrementan su resistencia a los antimicrobianos (1).

Los microorganismos productores de biopelículas han sido identificados como los agentes responsables de más del 65 % de las infecciones asociadas con la atención en salud y con las comunitarias, lo que representa un problema de salud pública mundial (2-4). La capacidad que tienen algunos microorganismos para formar biopelículas se ha asociado, también, con su capacidad para producir cuadros clínicos complejos. Diferentes infecciones, como la septicemia, la neumonía y la infección asociada con catéteres, prótesis y válvulas cardiacas, usualmente, son producto de la colonización por parte de microorganismos que contienen genes responsables de mecanismos de resistencia a los antimicrobianos (5,6).

Microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*, son responsables de neumonías hospitalarias e infecciones asociadas con dispositivos como prótesis y válvulas. Por otra parte, *K. pneumoniae*, además de las diversas especies de *Candida* y los estafilococos coagulasa negativos, suelen estar presentes en infecciones urinarias, vulvovaginales, dérmicas y de tejidos blandos. En todos los casos, estos microorganismos son capaces de generar cuadros clínicos graves de septicemia, difíciles de tratar con tratamientos antimicrobianos comunes (1,4,7,8). Por lo tanto, la detección de cepas productoras de biopelículas resulta de utilidad en el ámbito clínico, para orientar el tratamiento de elección de las enfermedades producidas por dichos microorganismos. Su detección temprana permite a los médicos tratantes establecer mejores estrategias terapéuticas, sabiendo que son patógenos persistentes y multirresistentes (9).

El método cuantitativo en microplaca con tinción de cristal violeta y el método cualitativo en agar Sabouraud dextrosa suplementado con rojo Congo, son dos de los más utilizados en el laboratorio de microbiología para la detección de biopelículas (4). El primero se considera de referencia, cuenta con gran sensibilidad, es semicuantitativo y permite clasificar las cepas como productoras fuertes, moderadas o débiles, o como no productoras de biopelículas. Sin embargo, es laborioso, consume mucho tiempo y requiere el uso de un espectrofotómetro (10,11). En cambio, el método de cultivo en agar con rojo Congo posee gran especificidad, es rápido, sencillo y de bajo costo. No obstante, presenta poca sensibilidad y, al ser cualitativo, no permite semicuantificar, ni clasificar la capacidad de formar biopelículas, como el método descrito anteriormente (3,4).

En diversos estudios se han comparado los resultados obtenidos con ambos métodos, con la finalidad de determinar si el agar con rojo Congo puede considerarse valioso para la detección temprana de cepas productoras de biopelículas (8,12-17).

En este sentido, el presente trabajo se propuso estudiar la capacidad de formación de biopelículas, mediante el método semicuantitativo de microtitulación con cristal violeta y el cualitativo por cultivo en agar con rojo Congo, de aislamientos bacterianos y fúngicos obtenidos a partir de muestras

clínicas de diferentes sitios anatómicos, procedentes de pacientes que acudieron al Departamento de Microbiología del Instituto Médico La Floresta en Caracas (Venezuela) solicitando estudios microbiológicos.

Materiales y métodos

Aislamientos bacterianos y fúngicos

Se recolectaron aislamientos clínicos de bacterias y levaduras obtenidos mediante cultivo de muestras de diferentes sitios anatómicos de pacientes que solicitaron estudios microbiológicos en el Departamento de Microbiología del Instituto Médico La Floresta, desde el primero de marzo hasta el 11 de diciembre de 2020.

Los aislamientos se caracterizaron por la metodología manual convencional y por el método automatizado VITEK-2-Compact®, conservándose en agar nutritivo a temperatura ambiente hasta su procesamiento. Posteriormente, los aislamientos se subcultivaron en agar MacConkey (MCK-Oxoid®, GA, USA) para bacilos gramnegativos, agar colistina con ácido nalidíxico (CNA-Oxoid®, GA, USA) para cocos grampositivos, y agar Sabouraud dextrosa (SDG-Oxoid®, GA, USA) más gentamicina para levaduras. Estos subcultivos fueron incubados a 35 °C, de 24 a 48 horas, con el objetivo de verificar su viabilidad y pureza.

Determinación de la capacidad de formación de biopelículas por el método semicuantitativo de microtitulación con cristal violeta

Los microorganismos en estudio se sometieron a diferentes medios de cultivo para comparar su rendimiento. Para las bacterias, se utilizó caldo infusión cerebro-corazón (BHI-Oxoid®, GA, USA) (medio de cultivo de referencia establecido por Stepanovic *et al*., 2000) (10), caldo Müeller-Hinton (Oxoid®, GA, USA) y caldo tripticasa soya (Oxoid®, GA, USA). Para las especies de *Candida*, se utilizó caldo infusión cerebro-corazón y caldo Sabouraud dextrosa (Oxoid®, GA, USA).

Preparación del inóculo. De los aislamientos obtenidos, previa verificación de viabilidad y pureza en agar MacConkey, colistina con ácido nalidíxico y Sabouraud dextrosa, se preparó una suspensión en 0,85 % de solución salina estéril, a una concentración de 0,5 McFarland (1-5 x 10^6 UFC/ml). Se tomaron 200 µl de dicha suspensión y se colocaron los aislamientos bacterianos en 19,8 ml de caldo de los medios infusión cerebro-corazón, Müeller-Hinton y tripticasa soya (grampositivos y gramnegativos); y los de levaduras, en Sabouraud dextrosa e infusión de cerebro-corazón, obteniendo así una dilución 1:100 de cada aislamiento (3,4).

Microtitulación en placas de poliestireno. Se utilizaron placas de poliestireno de 96 pocillos (Micro Test™, Becton Dickinson Labware, NJ, USA).

En cada pocillo, se añadieron 200 ml de la dilución previa (1:100) de cada aislamiento: para las bacterias, provenientes de los caldos BHI, MH y TSB, y para las levaduras, provenientes de los caldos SDG y BHI.

Tanto para bacterias como para levaduras, se utilizó una placa para cada medio de cultivo y las pruebas se practicaron por triplicado. La primera fila de pocillos de cada placa se cargó solo con 200 µl de cada medio, sin ningún inóculo microbiológico, los cuales sirvieron como control negativo.

Todas las placas inoculadas se cubrieron con papel Parafilm® - BemisTM HS234526C (WI, USA) y se incubaron a 35 °C, las de bacterias por 24 horas y las de levaduras por 48 horas. Posteriormente, los caldos inoculados se decantaron y los pocillos se lavaron tres veces con solución tampón de fosfato a pH 7,4 *(*PBS), Fisher Bioreagents BP2438-4 (PA, USA). Se añadieron 200 µl de metanol (Merck, Darmstadt, Alemania) a cada pocillo para fijar la muestra, durante 30 minutos. El metanol se decantó y se repitió tres veces el lavado con PBS. A continuación, se agregaron 200 µl de cristal violeta al 1 % (Merck, Darmstadt, Alemania), por 30 minutos. Luego, el cristal violeta se decantó y el exceso se lavó con solución tampón fosfato salino. Posteriormente, se agregó a cada pocillo 200 µl de etanol al 96% (Merck, Darmstadt, Alemania) y se dejó reposar durante cinco minutos. La densidad óptica (DO) se leyó a 575 nm para las bacterias y a 490 nm para las levaduras, en un lector para ELISA (iMark^{tm}, Microplate Reader, Bio-Rad, GA, USA) (3,4).

Para la interpretación de los resultados se utilizó la clasificación establecida por Stepanovic *et al*., adaptándola a microorganismos grampositivos, gramnegativos y levaduras, mediante la siguiente fórmula: $\dot{X} + (\sum x\ 3)$ (11); donde $\dot{X}$= media de los blancos como control negativo; $\sum$= desviación estándar de las densidades ópticas obtenidas de los blancos; 3=desviaciones estándar. Según los cálculos, los aislamientos se clasificaron como: no formadores (NF), poco formadores (PF), moderadamente formadores (MF) y fuertemente formadores (FF) de biopelículas (10).

Evaluación de los cambios de la pared celular implicados en la formación de la matriz de exopolisacáridos por el método cualitativo por cultivo en agar con rojo Congo.

Se preparó una suspensión de los aislamientos provenientes de la incubación por 24 horas en los agares MacConkey (grampositivos), colistina con ácido nalidíxico (gramnegativos) y Sabouraud dextrosa (levaduras), en 0,85 % de solución salina estéril. La suspensión se ajustó a un patrón de turbidez de 0,5 McFarland y, de esta, se tomaron 100 µl y se inocularon en placas con los agares con los medios infusión cerebro-corazón, Müeller-Hinton, tripticasa de soya y Sabouraud dextrosa para los microorganismos gramnegativos, grampositivos y levaduras, respectivamente. Esto se hizo para comparar su rendimiento. Todos los agares fueron suplementados con 3 % de rojo Congo y 10 % de dextrosa. Las suspensiones de cada asilamiento fueron inoculadas por triplicado usando la técnica de dilución por agotamiento y se incubaron a 35 ºC entre 24 a 72 horas. La interpretación de la prueba se basó en la producción de un precipitado de color negro brillante de las colonias bacterianas o de un color rosado intenso a rojo en las levaduras del género *Candida*, que indica la producción de exopolisacáridos (3,4,18,19).

Control de calidad

Se utilizaron como cepas de referencia de la *American Type of Culture Collection* (ATCC®): *Klebsiella pneumoniae* (70060)*, Pseudomonas aeruginosa* (27853)*, Staphylococcus aureus* (25923)*, Candida albicans* (90028)*, Candida tropicalis* (750)*, Candida glabrata* (90030) y *Candida parapsilosis* (22019).

Análisis estadísticos

Los datos obtenidos se organizaron en una tabla de Excel. Se calcularon la media aritmética y la desviación estándar de las lecturas de la densidad

óptica obtenidas por el método semicuantitativo de microtitulación con cristal violeta, y se determinaron las frecuencias y los porcentajes para cada variable seleccionada.

Para evaluar la concordancia del método cualitativo por cultivo en agar con rojo Congo con el método semicuantitativo de microtitulación con cristal violeta (considerado como método de referencia) en los diferentes medios de cultivo, se utilizaron tablas de contingencia de 2 x 2 y el coeficiente kappa. La interpretación de los resultados del coeficiente kappa son las siguientes: menor de 0, no hay concordancia; 0,00 a 0,20, concordancia pobre; 0,21 a 0,40, concordancia débil; 0,41 a 0,60, concordancia moderada; 0,61 a 0,80, concordancia considerable (buena); y 0,81 a 1,00, concordancia casi perfecta (muy buena).

Para determinar la relación entre la capacidad de formación de biopelículas por ambos métodos y las variaciones de los medios de cultivo, se utilizó la prueba de ji al cuadrado (c^2), con corrección de Yates en los casos necesarios; el nivel de significancia fue de 95 % y un valor de $p \leq 0,05$. Todos los análisis se realizaron con el programa Statgraphics Centurion XVII.

Se contó con el consentimiento informado de los pacientes para la realización del estudio.

Resultados

Distribución de los aislamientos bacterianos y fúngicos

Se procesaron 211 aislamientos clínicos de diferentes muestras biológicas en humanos (heces, orina, sangre, secreciones y tejidos). Los aislamientos bacterianos fueron 103, e incluyeron *K. pneumoniae* (n=28), *P. aeruginosa, S. aureus* y estafilococos coagulasa negativos (n=25 de cada uno). Los aislamientos fúngicos fueron 108, constituidos por el complejo *C. glabrata* (n=25), complejo *C. parapsilosis* (n=27), *C. albicans* y *C. tropicalis* (n=28 de cada uno).

Microtitulación con cristal violeta en aislamientos bacterianos. Los resultados con este método se obtuvieron utilizando caldo del medio infusión cerebro-corazón, que corresponde al método de referencia (3,10), y los caldos Müeller-Hinton y tripticasa de soya, propuestos en la presente investigación (cuadro 1). En general, los aislamientos bacterianos fueron poco formadores de biopelículas, con porcentajes de 71,8, 70 y 68 % en los medios infusión cerebro-corazón, tripticasa de soya y Müeller-Hinton, respectivamente. Se observó que *K. pneumoniae* tiene mayor capacidad de formar biopelículas respecto a los demás microrganismos bacterianos examinados, situación que puede estar influenciada por el lugar de procedencia del aislamiento o por la composición de su pared celular, rica en lipolisacáridos y que, a su vez, actúa como un mecanismo de resistencia contra elementos externos como los antimicrobianos (3).

Cultivo en agar con rojo congo en aislamientos bacterianos. Mediante este método, los microrganismos bacterianos fueron capaces de exhibir su matriz de exopolisacáridos en un 63,5, 65 y 56 %, en los medios de infusión cerebro-corazón, tripticasa de soya y Müeller-Hinton, respectivamente. Se observó que los aislamientos de *P. aeruginosa* fueron poco formadores de biopelículas en los medios seleccionados, con respecto a los demás microorganismos evaluados (cuadro 1) (figura 1).

Cuadro 1. Formación de biopelículas en bacterias (grampositivas y gramnegativas) mediante los métodos de microtitulación con cristal violeta y agar con rojo Congo.

Microorganismo	Capacidad de formación de biopelículas en bacterias gramnegativas y grampositivas (n=103)																	
	Método por microtitulación con cristal violeta												Método en agar con rojo Congo					
	BHI				TBS				MH				BHI		TCB		MH	
	NF	PF	MF	FF	NF	PF	MF	FF	NF	PF	MF	FF	N	P	N	P	N	P
Klebsiella pneumoniae (n=28)	3	25	0	0	5	23	0	0	8	20	0	0	5	23	3	25	9	19
Pseudomonas aeruginosa (n=25)	10	15	0	0	11	14	0	0	10	15	0	0	15	10	13	12	15	10
Staphylococcus aureus (n=25)	9	16	0	0	7	18	0	0	9	16	0	0	10	15	10	15	12	13
Estafilococos coagulasa negativa (n=25)	7	18	0	0	8	17	0	0	6	19	0	0	8	17	10	15	9	16

BHI: infusión cerebro-corazón; TBS: tripticasa de soya; MH: Müeller-Hinton; NF: no formadora de biopelículas; PF: poco formadora de biopelículas; MF: moderadamente formadora de biopelículas; FF: fuertemente formadora de biopelículas; N: negativo; P: positivo

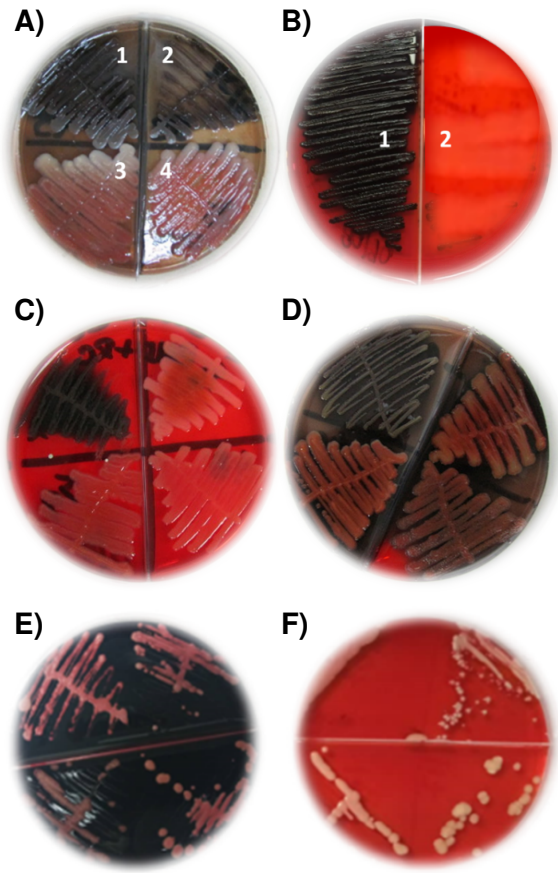


Figura 1. Presencia o ausencia de exopolisacáridos como indicadores de biopelículas, según el método de cultivo en agar con rojo Congo. A) *Pseudomonas aeruginosa*. Las cepas 1 y 2 fueron positivas y con precipitado de color negro, mientras que las cepas 3 y 4 fueron negativas y sin precipitado negro. B) *Klebsiella pneumoniae*. La cepa 1 fue positiva con precipitado negro y la cepa 2 fue negativa y sin precipitado negro. C) *Staphylococcus aureus*. La cepa 1 fue positiva y con precipitado negro, mientras que las cepas 2, 3 y 4 fueron negativas y sin precipitado negro. D) *Estafilococos coagulasa* negativa. La cepa 1 fue positiva y con precipitado negro, y las cepas 2, 3 y 4 fueron negativas y sin precipitado negro. E) Las cepas 1 y 2 de *Candida albicans*, la cepa 3 de *C. tropicalis* y la cepa 4 de *C. parapsilosis*, positivas y con color rosado intenso a fucsia. F) Las cepas 1 y 2 de *C. albicans*, la cepa 3 de *C. tropicalis* y la cepa 4 de *C. parapsilosis*, fueron negativas y con color blanco crema.

Microtitulación con cristal violeta en aislamientos del género Candida. Las especies de *Candida* evaluadas de manera global fueron poco formadoras de biopelículas en un 86 y 87 %, en los medios de Sabouraud dextrosa correspondiente al método de referencia (4) y el caldo del medio infusión cerebro-corazón propuesto en esta investigación, respectivamente. No hubo variabilidad en el número de los aislamientos, aunque *C. albicans* pareciera ser menos formadora de biopelículas en ambos medios (cuadro 2).

Cultivo en agar con rojo Congo en aislamientos del género Candida. Los aislamientos de estas especies de *Candida* fueron capaces de exponer su matriz de exopolisacáridos en un 85 % de las colonias, en los dos medios utilizados (cuadro 2) (figura 1).

Las cepas de referencia ATCC®, evaluadas como control positivo en la presente investigación, fueron formadoras moderadas de biopelículas mediante

la microtitulación con cristal violeta, y fueron positivas para la formación de matriz de exopolisacáridos mediante el cultivo en agar con rojo Congo.

Comparación estadística mediante microtitulación con cristal violeta en aislamientos bacterianos. Al evaluar la formación de biopelículas usando los caldos Müeller-Hinton y tripticasa de soya en lugar del medio infusión cerebro-corazón en el método de referencia semicuantitativo con cristal violeta, se obtuvo que el caldo Müeller-Hinton no tuvo un desempeño comparable al medio infusión cerebro-corazón (no existe asociación significativa, p≥0,05), mientras que el caldo tripticasa de soya sí tuvo un desempeño similar al medio infusión de cerebro-corazón (existe asociación significativa, p≤0,05). Sin embargo, el coeficiente kappa indicó que la concordancia categórica entre el desempeño de los caldos infusión de cerebro-corazón *versus* Müeller-Hinton (0,125) e infusión de cerebro-corazón versus tripticasa de soya (0,342), es pobre y débil, respectivamente (cuadro 3A).

Cuadro 2. Formación de biopelículas en *Candida* spp., mediante los métodos de microtitulación con tinción con cristal violeta y cultivo en agar con rojo Congo

Microorganismo	Capacidad de formación de biopelículas en *Candida* spp. (n=108)											
	Método por microtitulación con cristal violeta								Método en agar con rojo Congo			
	SDG				BHI				SDG		BHI	
	NF	PF	MF	FF	NF	PF	MF	FF	N	P	N	P
Candida albicans (n=28)	7	21	0	0	8	20	0	0	7	21	8	20
Candida tropicalis (n=28)	4	24	0	0	3	25	0	0	5	23	5	23
Candida glabrata (n=25)	1	24	0	0	2	23	0	0	1	24	2	23
Candida parapsilosis (n=27)	3	24	0	0	1	26	0	0	3	24	1	26

SDG: Sabouraud dextrosa; BHI: infusión de cerebro-corazón; NF: no formadora de biopelículas; PF: poco formadora de biopelículas; MF: moderadamente formadora de biopelículas; FF: fuertemente formadora de biopelículas; N: negativo; P: positivo.

Cuadro 3. Valoración de la concordancia y la relación de la capacidad de formación de biopelículas según los diferentes medios de cultivo utilizados: con cristal violeta o con rojo Congo.

(A) Método de Stepanovic con BHI Vs. Método de Stepanovic con sustitución de medios de cultivo MH y TSB en aislamientos bacterianos (n=103).Microtitulación en placa con cristal violeta

M/C	S	E	VPP	VPN	K	χ^2	p
MH	71,6	41,4	75,7	36,4	0,125	1,617	0,2035
TSB	79,7	55,2	81,9	51,6	0,342	12,064	0,0005

(B) Método de Stepanovic con BHI Vs. Rojo Congo con sustitución de medios de cultivo (RC-MH y RC-TSB) en aislamientos bacterianos (n=103)

M/C	S	E	VPP	VPN	K	χ^2	p
RC-BHI	79,7	79,3	90,7	60,5	0,539	31,193	0,0001
RC-MH	59,6	51,7	75,8	33,1	0,096	1,059	0,6583
RC-TSB	77	65,5	85	52,8	0,396	16,587	0,0001

(C) Método de Stepanovic con BHI Vs. Método de Stepanovic con sustitución de medio de cultivo SDG.
Género *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis*) (n=108)

M/C	S	E	VPP	VPN	K	χ^2	p
SDG	97,8	80	96,8	85,4	0,801	62,655	0,0001

(D) Método de Stepanovic con BHI Vs. Rojo Congo con sustitución de medios de cultivo (RC-SDG y RC-BHI)
Género *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis*) (n=108)

M/C	S	E	VPP	VPN	K	χ^2	p
RC-SDG RC-BHI	94,6	73,3	95,6	68,7	0,661	42,036	0,0001

BHI: infusión cerebro-corazón; TBS: tripticasa de soya; MH: Müeller-Hinton; SDG: Sabouraud dextrosa; RC: rojo Congo; S: sensibilidad; E: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; K: coeficiente kappa; χ^2: ji al cuadrado; p: valor de p

Comparación estadística mediante cultivo en agar con rojo Congo en aislamientos bacterianos. Se obtuvo que el agar Müeller-Hinton con rojo Congo tuvo menor desempeño frente al método de referencia con cristal violeta en caldo de medio infusión cerebro-corazón (no existe asociación significativa, $p \geq 0,05$), mientras que los agares tripticasa de soya e infusión cerebro-corazón tuvieron un desempeño similar al método de referencia al evaluar la formación de exopolisacáridos como indicadores de la formación de biopelículas (existe asociación significativa, $p \leq 0,05$). El coeficiente kappa indicó la concordancia categórica obtenida entre el desempeño del método semicuantitativo con cristal violeta *versus* el cualitativo con rojo Congo. La concordancia usando el agar de infusión de cerebro-corazón fue moderada (0,539), con el agar Müeller-Hinton fue pobre (0,096) y con el agar de tripticasa de soya fue débil (0,396) (cuadro 3B).

Comparación estadística mediante microtitulación con cristal violeta en aislamientos del género Candida. Al comparar el método de referencia semicuantitativo de microtitulación con cristal violeta utilizando el caldo infusión cerebro-corazón *versus* la sustitución por el caldo Sabouraud dextrosa, se obtuvo que ambos medios de cultivo tienen un desempeño similar (existe asociación significativa, $p \leq 0,05$). El coeficiente kappa indicó que la concordancia categórica entre ambos medios de cultivo es considerable o buena (cuadro 3C).

Comparación estadística mediante cultivo en agar con rojo Congo en aislamientos del género Candida. Se encontró que tanto el agar infusión cerebro-corazón como el Sabouraud dextrosa tuvieron un desempeño comparable al del método de referencia con cristal violeta y caldo de medio infusión de cerebro-corazón, en la producción de exopolisacáridos como indicadores de la formación de biopelículas en levaduras del género *Candida* (existe asociación significativa, $p \leq 0,05$). El coeficiente kappa indicó que la concordancia categórica entre el método semicuantitativo con infusión de cerebro-corazón *versus* el cualitativo con rojo Congo, usando los dos tipos de agar (infusión cerebro-corazón y Sabouraud dextrosa) es buena o considerable (0,661) (cuadro 3D).

Discusión

En el presente estudio se pudo detectar la formación de biopelículas mediante dos métodos: uno considerado como de referencia (semicuantitativo de microtitulación con cristal violeta) y otro capaz de determinar la formación de biopelículas de forma indirecta, mediante la producción de exopolisacáridos (cualitativo de cultivo en agar con rojo Congo). En ambos se utilizaron cuatro géneros bacterianos y cuatro especies del género *Candida*, y se propusieron diferentes medios de cultivo para comparar con el método de referencia (microtitulación con cristal violeta en caldo infusión de cerebro-corazón), con la finalidad de proporcionar alternativas de medios de cultivo para ejecutar de rutina estos métodos en el laboratorio de microbiología. Con este diseño experimental, se obtuvo información novedosa, difícil de comparar con la información disponible en la literatura científica.

La evaluación de la producción de biopelículas en aislamientos bacterianos con el método semicuantitativo (cristal violeta), indicó que no es recomendable sustituir el caldo del medio infusión cerebro-corazón por los de tripticasa de soya y Müeller-Hinton, debido a que el desempeño de estos dos últimos medios fue pobre y débil, respectivamente.

Resultados similares se obtuvieron al comparar el método de referencia (cristal violeta en infusión de cerebro-corazón) con el método cualitativo con rojo Congo: sólo el agar infusión de cerebro-corazón presentó una concordancia moderada, lo que indica que este último puede utilizarse como método de tamizaje para la detección temprana de biopelículas en aislamientos bacterianos. Sin embargo, los resultados negativos obtenidos con este método deben confirmarse con el método de referencia.

Según lo reportado, el medio de cultivo más utilizado y que arroja mejores resultados al evaluar la producción de biopelículas mediante los métodos semicuantitativo (cristal violeta) y cualitativo (rojo Congo), es la infusión cerebro-corazón, seguido del tripticasa de soya (3,4,9,12,16). En esta investigación, se pudieron comprobar los resultados con el medio infusión cerebro-corazón, mas no con la tripticasa de soya. El uso del medio de cultivo Müeller-Hinton, no referido en la literatura consultada, fue seleccionado en este estudio como otra opción para el análisis de las biopelículas en el laboratorio de microbiología. Sin embargo, los resultados obtenidos desaconsejan su uso para estos fines.

En 2017, da Costa Lima *et al*. investigaron la capacidad de formar biopelículas de 20 cepas de *P. aeruginosa*. Mediante el método cualitativo de cultivo en agar con rojo Congo, detectaron que el 15 % de las cepas formaba biopelículas, mientras que, con el método de referencia semicuantitativo de microtitulación con cristal violeta identificaron lo mismo en el 75 % de las cepas (15). En dicho estudio, los investigadores suplementaron los medios de cultivo, para ambos métodos, con sacarosa, diferente al azúcar utilizado en la presente investigación que fue dextrosa. Según los resultados obtenidos en nuestro estudio, la dextrosa facilitó la formación de biopelículas con los aislamientos bacterianos debido, probablemente, al uso eficiente de este azúcar. Para mejorar la fórmula de preparación de los medios de cultivo, podrían evaluarse los azúcares que componen la matriz de polisacáridos de cada microorganismo (20).

En otras investigaciones se han obtenido resultados diferentes a los del presente estudio con el medio de cultivo tripticasa de soya. Hassan *et al*. evaluaron 110 aislamientos bacterianos grampositivos y gramnegativos, comparando los métodos expuestos anteriormente con cristal violeta y rojo Congo, y utilizando el medio de cultivo tripticasa de soya con glucosa y sin ella. Los investigadores obtuvieron 70 cepas productoras de biopelículas con el método semicuantitativo de microtitulación con cristal violeta y sólo cuatro cepas productoras con el método cualitativo de cultivo en agar con rojo Congo (14). Mathur *et al.* analizaron 152 aislamientos clínicos de *Staphylococcus* spp., comparando su capacidad de formar biopelículas por los dos métodos mencionados y usando como medio tripticasa de soya, con glucosa y sin ella. De los aislamientos evaluados con tripticasa de soya más glucosa, el 53,9 % resultaron productores, mientras que, de los aislamientos analizados con tripticasa de soya sin glucosa, solo el 4,6 % formó biopelículas a las 24 horas de incubación. Los investigadores concluyeron que el modificar la composición de los medios de cultivo ayuda a mejorar la precisión en la detección de las biopelículas (21).

Moreno *et al*. publicaron un estudio, en el cual evaluaron la capacidad de formación de biopelículas de 38 cepas de *K. pneumoniae* mediante los métodos semicuantitativo (cristal violeta) y cualitativo (rojo Congo), utilizando el medio de infusión cerebro-corazón. Los autores concluyeron que el método cualitativo de cultivo en agar con rojo Congo puede utilizarse en la tamización inicial para

determinar la formación de biopelículas; no obstante, los resultados negativos deben confirmarse con el método de microtitulación con cristal violeta (3).

En la investigación de Oliveira *et al*., relacionado con la formación de biopelículas en bacterias grampositivas, se evaluaron 100 aislamientos de estafilococos coagulasa negativos en pacientes recién nacidos. Se compararon las metodologías semicuantitativa (cristal violeta) y cualitativa (rojo Congo), y se utilizó como método de referencia la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar la presencia de los genes *icaA*, *icaC* e *icaD*, relacionados con la producción de biopelículas de los estafilococos. Hubo amplificación de estos genes en el 82 % de las cepas, mientras que, por los métodos semicuantitativo de microtitulación con cristal violeta y cualitativo de cultivo en agar con rojo Congo, el 81 y 73 % de las cepas formaron biopelículas, respectivamente. Ambos métodos alcanzaron una concordancia moderada con los resultados de la PCR, por lo cual los autores concluyeron que el método cualitativo con rojo Congo es confiable, sencillo y rápido para la detección de biopelículas, resultado comparable al del presente estudio (13).

En otro estudio comparativo, Achek *et al*. evaluaron la formación de biopelículas en 55 cepas de *S. aureus* con los dos métodos utilizados en la presente investigación. Se obtuvo que, con la microtitulación con cristal violeta, el 41,8 % de las cepas evaluadas producían biopelículas comparado con el 70,9 % obtenido con el método cualitativo con rojo Congo (16). Con este último método, se superó la detección de cepas formadoras de biopelículas con respecto al método de referencia con cristal violeta.

La investigación con los métodos descritos (semicuantitativo con cristal violeta y cualitativo con rojo Congo), mostró que el medio Sabouraud dextrosa puede sustituir al de infusión cerebro-corazón para evaluar la capacidad de las levaduras de formar biopelículas y funcionaría como medio de cultivo alternativo de rutina en el laboratorio de microbiología en caso de no contar con el de infusión cerebro-corazón. Sin embargo, los autores recomiendan que, si se obtienen resultados negativos, los mismos deben confirmarse utilizando el método de referencia de microtitulación con cristal violeta.

Moreno *et al.* desarrollaron una investigación con 30 cepas de *C. parapsilosis*, *sensu stricto*, aisladas en sangre, para comparar el método de microtitulación con cristal violeta y el de cultivo con rojo Congo, utilizando el medio Sabouraud dextrosa (4). Estos investigadores reportaron que el 63 % de los aislamientos mostró formación de biopelículas, con el primer método y, el 50 %, con el segundo. La concordancia entre ambas metodologías fue del 66,3 % y no fue posible obtener una asociación estadística significativa. Aunque el valor de p fue muy cercano al objetivo propuesto (p=0,052), la significancia pudo perderse probablemente por el número de cepas evaluado. En el presente estudio, se aumentó considerablemente el número de cepas de levaduras (n=108) obteniendo resultados favorables, lo cual demuestra que el método de cultivo en agar con rojo Congo, en medio Sabouraud dextrosa, puede ser útil para la evaluación de la formación de biopelículas en levaduras del género *Candida*.

En otro estudio de Moreno *et al*. (22), se evaluaron 28 cepas de *C. albicans* aisladas de secreciones vaginales utilizando los mismos dos métodos, pero con el medio Sabouraud dextrosa. Se obtuvo una concordancia de casi el 99 %. Es posible que las similitudes encontradas entre las cepas evaluadas estén relacionadas con su capacidad particular de formar biopelículas y con el origen y el tipo de la muestra estudiada.

Con base en los hallazgos obtenidos en el presente trabajo, el método cualitativo de cultivo en agar con rojo Congo resulta prometedor para determinar la capacidad de formar biopelículas de los aislamientos bacterianos y de levaduras. Se recomienda utilizar como medio de cultivo el caldo infusión cerebro-corazón en caso de evaluar aislamientos bacterianos y, el agar de este mismo o el Sabouraud dextrosa, como sustituto para evaluar levaduras. Su uso como método de tamizaje obliga a utilizar el método de referencia semicuantitativo de microtitulación con cristal violeta cuando se obtengan resultados negativos. Debido a que el método cualitativo de cultivo en agar con rojo Congo no requiere de instrumentos, ni de insumos especializados, es un candidato óptimo para ser implementado de rutina en los laboratorios de microbiología, en los que se suelan aislar microorganismos considerados persistentes y de difícil abordaje terapéutico.

Referencias

1. Cheong JZA, Johnson CJ, Wan H, Liu A, Kernien JF, Gibson ALF, *et al*. Priority effects dictate community structure and alter virulence of fungal-bacterial biofilms. ISME J. 2021;15:2012-27. https://doi.org/10.1038/s41396-021-00901-5
2. Ibarra C, Villar M, Gaitán L, Pozos A, Mendoza R, Sánchez L. Ensayo de formación y cuantificación de biopelículas mixtas de *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*. Rev Iberoam Micol. 2012;29:214-22. https://doi.org/10.1016/j.riam.2012.02.003
3. Moreno X, Armas A, Panizo M, Garcés M. Formación de biopelículas por *Klebsiella pneumoniae* aislada en heces de pacientes con trastorno del espectro autista. Rev Soc Ven Microbiol. 2020;40:12-8. https://doi.org/10.5281/zenodo.3660110
4. Moreno X, Marcano E, Panizo M, Ferrara G. Formación de biopelículas por *Candida parapsilosis sensu stricto* y su perfil de susceptibilidad en Venezuela. Kasmera. 2020;48:1-7. https://doi.org/10.5281/zenodo.3660110
5. Ortega S, Hernández E. Biopelículas microbianas y su impacto en áreas médicas: fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. Bol Med Hosp Infant Mex. 2018;75:79-88. https://doi.org/10.24875/BMHIM.M18000012
6. Díaz A, Vivas R, Puerta L, Ahumedo M, Arévalo L, Cabrales R, *et al*. Biopelículas como expresión del mecanismo de *quorum sensing*: una revisión. Av Periodon Implantol. 2011;23:195-201.
7. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Microbiología médica. 7th Edition. Washington, D.C.: ASM Press; 2013.
8. Eraso M. Principales características de las biopelículas relacionadas con procesos patológicos descritos en humanos en los últimos 10 años, revisión sistemática. Investig Andina. 2016;18:1491-506. https://doi.org/10.33132/01248146.556
9. Gómez J, Gómez M, Bas P, Ramos C, Cafini F, Maestre J, *et al*. ¿Es la cuantificación del biofilm un elemento diferenciador en la patogenia de bacilos gramnegativos? Rev Esp Quimioter. 2013;26:97-102.
10. Stepanović S, Vuković D, Dakić I, Savić B, Švabić-Vlahović M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. J Microbiol Met. 2000;40:175-9. https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00122-6
11. Kragh KN, Alhede M, Kvich L, Bjarnsholt T. Into the well -A close look at the complex structures of a microtiter biofilm and the crystal violet assay. Biofilm. 2019;1:100006. https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2019.100006
12. Rampelotto R, Lorenzoni V, Silva C, Coelho S, Wust V, Garzon L, *et al*. Assessment of different methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures of newborns. Rev Soc Bras Med Trop. 2018;51:761-7. https://doi:10.1590/0037-8682-0171-2018
13. Oliveira A, Cunha M. Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. BMC Res Notes. 2010;3:260. https://doi.org/10.1186/1756-0500-3-260

14. Hassan A, Usman J, Kaleem F, Omair M, Khalid A, Iqbal M. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. Braz J Infect Dis. 2011;15:305-11. https://doi.org/10.1016/s1413-8670(11)70197-0

15. da Costa Lima JL, Alves LR, Pereira da Paz JN, Rabelo MA, Vieira-Maciel MA, Camargo de Morais MM. Analysis of biofilm production by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with ventilator-associated pneumonia. Rev Bras Ter Inten. 2017;29:310-6. https://doi.org/10.5935/0103-507x.20170039

16. Achek R, Hotzel H, Nabi I, Kechida S, Mami D, Didouh N, *et al.* Phenotypic and molecular detection of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolated from different sources in Algeria. Pathogens. 2020;9:153. https://doi.org/10.3390/pathogens9020153

17. Peña J, Uffo O. Producción de biofilm en genotipos de *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina en Cuba. Rev Salud Anim. 2013;35:189-96.

18. Vuotto C, Longo F, Pascolini C, Donelli G, Balice MP, Libori MF, *et al.* Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. J Appl Microbiol. 2017;123:1003-18. https://doi.org/10.1111/jam.13533

19. Ilknur D, Kiraz N, Oz Y. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in clinical *Candida* isolates. Afr J Microbiol Res. 2010;4:2763-8. https://doi.org/10.5897/AJMR.9000302

20. Rivera J, Aranaga V, Reyes G, Vega O, Ciancio L, Arencio L, *et al.* Adherencia y formación de biopelícula sobre superficies abióticas lisas en *Staphylococcus* spp., aislados de quesos artesanales e industriales. Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas de la Universidad del Zulia. 2018;52:38-55.

21. Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay DJ, Fatma T, Rattan A. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: An evaluation of three different screening methods. Indian J Med Microbiol. 2006;24:25-9. https://doi.org/10.1016/S0255-0857(21)02466-X

22. Moreno X, Núñez G, Rosales O, Ferrara G, Panizo MM. Evaluación de factores de virulencia y perfil de susceptibilidad en *Candida albicans* provenientes de secreciones vaginales. Ac SVBE. 2021;24:70-78221;24.

Biomédica 2023;43(Supl.1):89-96
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.6759

Artículo original

Actividad de fosfolipasas y proteasas en aislamientos de especies de *Candida* colonizadoras y causantes de vulvovaginitis en mujeres gestantes

Martha Puello, Gregorio Young, Paola Suárez

Grupo de Micología, Facultad de Medicina, Universidad de Cartagena, Cartagena, Colombia

Introducción. Las proteasas y las fosfolipasas son factores de virulencia de *Candida* spp. que cumplen un papel importante en la invasión de los tejidos. Entre los factores relacionados con el huésped, se encuentran algunos asociados con las características ambientales y otros con la colonización.
Objetivo. Determinar la actividad de fosfolipasas y proteasas en aislamientos de especies colonizadoras y patógenas de *Candida* spp., aisladas de mujeres gestantes de Cartagena de Indias.
Materiales y métodos. Se determinó la actividad de fosfolipasas y proteasas en 56 aislamientos mediante degradación del sustrato y cálculo del coeficiente de actividad enzimática. Se compararon las actividades de fosfolipasas y proteasas, entre los aislamientos colonizadores y los patógenos.
Resultados. La actividad de la fosfolipasa fue "muy alta" (< 0,69) en 34 aislamientos e, igualmente, la de la proteasa en 14. No hubo diferencias significativas al comparar las actividades de las fosfolipasas y de las de las proteasas, entre los aislamientos colonizadores y los patógenos.
Conclusiones. La actividad de las fosfolipasas predominó como factor de virulencia en los aislamientos estudiados. No obstante, no se encontró una diferencia significativa entre los grupos de aislamientos colonizadores y los patógenos, en cuanto a las actividades de fosfolipasas y proteasas.

Palabras clave: *Candida*; candidiasis vulvovaginal; fosfolipasas; endopeptidasas; factores de virulencia; microbiota.

Phospholipase and proteinase activities of isolates of colonizing *Candida* spp. causing vulvovaginitis in pregnant women

Introduction. Proteases and phospholipases are virulence factors of *Candida* spp. that play an important role in tissue invasion. Among the factors related to the host some are associated with environmental characteristics and others with *Candida* colonization.
Objectives. To determine phospholipase and protease activities in colonizing and pathogenic strains, isolated from pregnant women in Cartagena de Indias.
Materials and methods. Phospholipase and protease activity was determined in 56 isolates, evaluating substrate degradation and calculating the enzyme activity coefficient. Phospholipase and protease activities were compared between colonizing and pathogenic strains.
Results. "Very high" (<0.69) phospholipase and protease activity was found in 34 and 14 isolates, respectively. There was no significant difference when comparing phospholipase and protease activities between colonizing and pathogenic isolates.
Conclusions. Phospholipase activity predominated as a virulence factor in the studied strains, but no significant difference was found between colonizing and pathogenic strains for phospholipase and protease activities.

Keywords: *Candida*; candidiasis, vulvovaginal; phospholipases; endopeptidases; virulence factors; microbiota.

El género *Candida* es parte de la microbiota humana, aunque puede producir enfermedad en los sujetos predispuestos que presenten algún grado de inmunosupresión (1). Estas levaduras son agentes causales comunes de infecciones invasoras y localizadas (2).

La candidiasis vulvovaginal es una infección que afecta especialmente a las mujeres en edad fértil, y se presenta al menos un episodio en el 75 % de las mujeres sanas (3). *Candida albicans* es responsable de la mayoría de los episodios de la candidiasis vulvovaginal, seguida por *C. tropicalis* o *C. glabrata* (3,4).

Recibido: 14/10/2022
Aceptado: 06/12/2022
Publicado: 14/12/2022

Citación:
Puello M, Young G, Suárez P. Actividad de fosfolipasas y proteasas en aislamientos de especies de *Candida* colonizadoras y causantes de vulvovaginitis en mujeres gestantes. Biomédica. 2023;43(Supl.1):89-96.
https://doi.org/10.7705/biomedica.6759

Correspondencia:
Paola Suárez, Facultad de Medicina, Campus de Zaragocilla, Universidad de Cartagena, Cartagena, Colombia
Teléfono: (605) 669 8178
psuareza@unicartagena.edu.co

Contribución de los autores:
Todos los autores contribuyeron al diseño del estudio, el desarrollo experimental, el análisis de resultados y la elaboración del manuscrito.

Financiación:
Este estudio fue financiado por la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad de Cartagena.

Conflicto de intereses:
Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Los factores de virulencia de *Candida* spp. y los relacionados con el huésped, son determinantes en el proceso de interacción entre ellos (1). Estos factores de virulencia incluyen enzimas hidrolíticas que les permite a los agentes patógenos adherirse, penetrar e invadir los tejidos (1). Entre estas hidrolasas están las proteasas que degradan diferentes tipos de proteína como el colágeno y la queratina. Las mejor caracterizadas son del tipo de las aspartil-proteasas, endopeptidasas cuyo nivel de expresión estaría asociado con un incremento de su virulencia y la exacerbación de síntomas (1). Otras enzimas son las fosfolipasas que hidrolizan los glicerofosfolípidos y están relacionadas con la invasión activa de los tejidos (5).

Por otro lado, entre los factores relacionados con el huésped se destaca el exceso de estrógenos en la vagina que, a su vez, determina la colonización por *Candida* spp., que sería el primer paso hacia la candidiasis vulvovaginal; este cambio aún no es muy bien entendido (3).

El presente estudio tuvo como objetivo determinar las actividades de las fosfolipasas y las proteasas en aislamientos colonizadores y patógenos de mujeres gestantes de Cartagena de Indias, con el fin de contribuir a la compresión de la candidiasis vulvovaginal.

Materiales y métodos

Se determinó la actividad de las fosfolipasas y de las proteasas en 56 aislamientos provenientes de un estudio realizado en mujeres gestantes atendidas en la Clínica de Maternidad Rafael Calvo de Cartagena de junio a diciembre de 2014 (3). Los datos sociodemográficos de las 76 mujeres gestantes que participaron en el estudio se muestran en el cuadro 1. En el cuadro 2 se presentan los diagnósticos clínicos y de laboratorio realizados a las pacientes.

Cuadro 1. Datos sociodemográficos de las pacientes gestantes (n=76), portadoras de las cepas aisladas de *Candida* spp. El porcentaje faltante no respondió la pregunta.

Edad (años)	Origen %	Educación (años)* %	Ocupación %
Rango	Ciudad	>11	Amas de casa
16-36	(Cartagena)	10,4	90,8
	63,2		
Media	Departamental	11	Estudiantes
22,4 ± 6,07	(pueblos e islas)	46,1	3,9
	36,2		
Moda	No respondió	9-10	Profesionales
21	0,6	10,5	2,6
		<9	
Mediana		15,6	Otros
21		No respondió (17,4)	2,6

Cuadro 2. Frecuencia de diagnóstico médico frente a resultados de laboratorio en pacientes con diagnóstico de infección o colonización por *Candida* spp. (n=76)

Diagnóstico médico	n (%)	Resultados de laboratorio	n (%)
Candidiasis	22 (28,9)	Candidiasis	15 (19,7)
Vaginosis bacteriana	44 (57,9)	Vaginosis bacteriana	12 (15,8)
Candidiasis-tricomoniasis	1 (1,3)	Candidiasis - vaginosis bacteriana	1 (1,3)
Tricomoniasis	1 (1,3)	Infección bacteriana	1 (1,3)
No diagnosticada	8 (10,5)	Flora intermedia	40 (52,6)
		Microbiota normal	7 (9,2)

La clasificación de aislamientos colonizadores o patógenos se hizo de acuerdo con los criterios ya establecidos en un estudio previo (3). Los aislamientos conservados a -72 °C, se reactivaron en agar que contenía 4 % de Sabouraud (Merck, Alemania), a 37 °C por 24 horas.

Las cepas control utilizadas fueron: *Candida albicans* (ATCC 90028, referencia 0264 P, lote 264-19), *Candida tropicalis* (ATCC 750, referencia 0847 P, lote 84732-1), *Candida glabrata* (ATCC 64677, referencia 0226 P, lote 226-234), y *Candida guillermondii* (ATCC 6260, referencia R4601521 CL 1521, lote 1521).

Las actividades de fosfolipasas y proteasas se evaluaron por triplicado, según lo propuesto por Panizo *et al*. (6), Ombrella *et al*. (7) y Price *et al*. (8). En el estudio para determinar la actividad de fosfolipasa, se utilizó un método semicuantitativo con yema de huevo; para la de proteasas, se usó un método semicuantitativo, utilizando agar de albúmina de suero bovino, para detectar la capacidad del microrganismo de producir la enzima.

Para preparar el inóculo, se recogieron de dos a tres colonias con ayuda de un asa estéril y se añadieron a 5 ml de solución salina estéril, hasta obtener una concentración de células equivalente a 0,5, según la escala de McFarland (aproximadamente 1-5 x 10^6 UFC/ml).

Para la actividad de fosfolipasa, se inocularon 5 µl de la suspensión de la colonia en tres puntos equidistantes en una placa de 90 mm servida, aproximadamente, con 20 ml del siguiente medio: 65 g de agar Sabouraud glucosado; 58,45 g de cloruro de sodio; 0,0554 g de cloruro de calcio, 80 ml de yema de huevo y agua destilada hasta completar un litro. El pH del medio se ajustó a 6,3.

Todas las pruebas se practicaron por triplicado en días diferentes. Las placas se incubaron a 37 °C en aerobiosis. Las lecturas se hicieron a las 24, 48 y 72 horas (2,3) con un calibrador Vernier. Los cálculos de la actividad de fosfolipasas se hicieron de acuerdo con el método descrito por Price *et al*. (8); el coeficiente de actividad enzimática (Pz) se determinó midiendo el diámetro de crecimiento de la colonia entre el diámetro de la zona considerada como indicadora de la producción de fosfolipasa . Se midieron en diferentes tiempos y se calculó el promedio de los resultados de los triplicados. Tal y como fue descrito para *C. albicans* (6,8), se consideraron resultados negativos aquellos en los que el valor de Pz fue igual a 1 (actividad nula); resultados positivos con actividad débil, aquellos con Pz <1 y ≥0,64; y con actividad fuerte, aquellos con Pz <0,64 (8).

Este índice varía entre 0 y 1, y nos da una idea de la actividad enzimática de cada aislamiento. Los valores cercanos a 0 nos indican una máxima actividad de las fosfolipasas, mientras que valores próximos a 1, una baja actividad enzimática.

Para la actividad enzimática de las proteasas, se inocularon 5 µl de la suspensión de la cepa, preparada como se indicó previamente, en un medio que contiene: albúmina sérica bovina como única fuente de nitrógeno [0,5 g de fosfato dipotásico (Merck, Alemania)]; 0,04 g de sulfato de magnesio (Merck, Alemania); 1 g de cloruro de sodio (Merck, Alemania); 0,2 g de extracto de levadura (Oxoid, Reino Unido); 4 g de glucosa (Panreac, España); 0,5 g de albúmina sérica bovina (Merck, Alemania), y 4 g de agar-agar (Merck, Alemania), todo diluido en 200 ml de agua destilada (6,7).

Se calculó el coeficiente de actividad enzimática (Pz) como se describió anteriormente y se usó la escala descrita por Panizo *et al.* para medir la actividad fosfolipasa que se agrupa en cinco clases: negativa (1), débil (0,9 a 0,99), media (0,89 a 0,8), alta (0,79 a 0,7) y muy alta (menor de 0,69). Se compararon las actividades enzimáticas entre los aislamientos colonizadores y los patógenos, para lo cual se utilizó la prueba de ji al cuadrado, mediante el programa estadístico SPSS™, versión 25. Los valores de p menores de 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

Resultados

En el estudio se observó que los aislamientos presentaron mayor actividad de fosfolipasas que de proteasas. Se encontró una actividad de fosfolipasa muy alta (cercana a 0) en 34 (60,71 %) de los aislamientos, alta en 5 (8,92 %), débil en 1 (1,78 %), media en ninguno y negativa (igual a uno) en 16 (28,57 %) del total (n=56) de aislamientos estudiados (n=56) de los cuales, 41 (73,21 %) correspondían a cepas colonizadoras y 15 (26,78 %) a cepas patógenas. En el cuadro 3 se muestran las frecuencias y porcentajes por especies.

Al comparar las actividades de fosfolipasas entre los aislamientos colonizadores y los patógenos, no hubo diferencia significativa en los dos grupos (p=0,671). Cuando se evaluó la actividad enzimática entre especies, se encontró que la actividad de las fosfolipasas fue muy alta en 27 aislamientos de *C. albicans* (cuadro 4).

Cuadro 3. Frecuencia y porcentaje de especies de *Candida* spp, colonizadoras y patógenas (n=56). Los cultivos fueron positivos en 54 pacientes, pero en dos muestras hubo crecimiento de dos especies.

Especies	Colonizadora (n=40)		Patógena (n=16)	
	n	(%)	n	(%)
Candida albicans	24	(60)	10	(62,5)
Candida tropicalis	3	(7,5)	1	(6,3)
Candida krusei	2	(5,0)	1	(6,3)
Candida parapsilosis	2	(5,0)	1	(6,3)
Candida dubliniensis	1	(2,5)	1	(6,3)
Candida glabrata	2	(5,0)	0	
Candida lusitaniae	1	(2,5)	0	
Candida norvegensis	1	(2,5)	0	
Candida spp.	4	(10)	2	(12,5)

Cuadro 4. Actividad de fosfolipasas de especies de *Candida* spp. en el total de aislamientos evaluados (n=56). Los valores altos son cercanos a cero y, los negativos, iguales a 1.

	Actividad de fosfolipasas					
	Negativa	Débil	Media	Alta	Muy alta	Total
Especie						
Candida albicans	2	1	0	4	27	34
Candida dubliniensis	1	0	0	0	0	1
Candida tropicalis	2	0	0	0	3	5
Candida parapsilosis	2	0	0	0	1	3
Candida krusei	1	0	0	1	1	3
Candida glabrata	2	0	0	0	0	2
Candida lusitaniae	1	0	0	0	0	1
Candida norvengensis	1	0	0	0	0	1
Candida spp.	4	0	0	0	2	6
Total	16	1	0	5	34	56

La actividad de proteasas fue negativa en 39 (69,64 %) cepas, débil en 1 (1,78 %), media en 1 (1,78 %), alta en 1 (1,78 %) y muy alta en 14 (25 %) del total de 56 aislamientos estudiados (n=56). No hubo diferencias significativas en la actividad de proteasas, entre los aislamientos colonizadores y los patógenos (p=0,366). Según las especies, la actividad de proteasas fue muy alta en 8 aislamientos de *C. albicans* (cuadro 5). Los resultados sobre la actividad de ambas enzimas en los aislamientos colonizadores y los patógenos, se muestran en las figuras 1 a 4.

Cuadro 5. Actividad de proteasas de especies de *Candida* spp. en todos los aislamientos evaluados (n=56). Los valores altos son cercanos a cero y los negativos, iguales a 1.

	Actividad de fosfolipasas					
	Negativa	**Débil**	**Media**	**Alta**	**Muy alta**	**Total**
Especie						
Candida albicans	23	1	1	1	8	34
Candida dubliniensis	1	0	0	0	0	1
Candida tropicalis	3	0	0	0	2	5
Candida parapsilosis	3	0	0	0	0	3
Candida krusei	2	0	0	0	1	3
Candida glabrata	2	0	0	0	0	2
Candida lusitaniae	0	0	0	0	1	1
Candida norvengensis	0	0	0	0	1	1
Candida spp.	5	0	0	0	1	6
Total	39	1	1	1	14	56

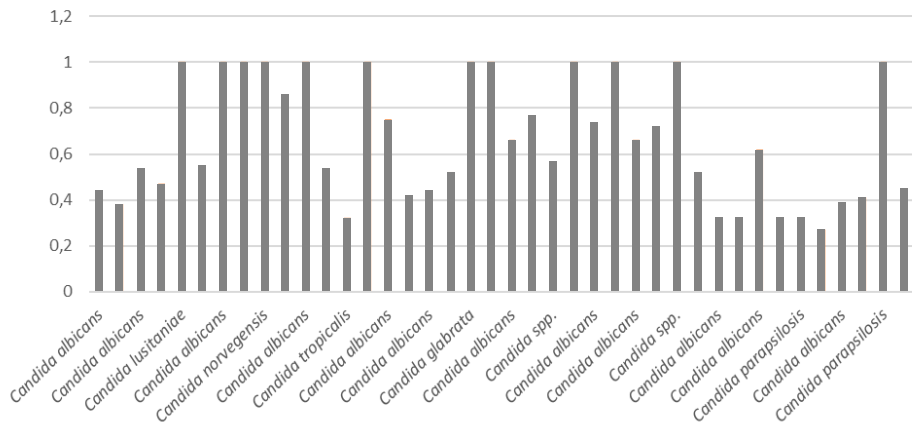


Figura 1. Actividad de fosfolipasas por especie de *Candida* spp. en los aislamientos colonizadores (muy alta < 0,69; alta = 0,79-0,70; media = 0,89-0,80; débil = 0,9-0,99; negativa = 1)

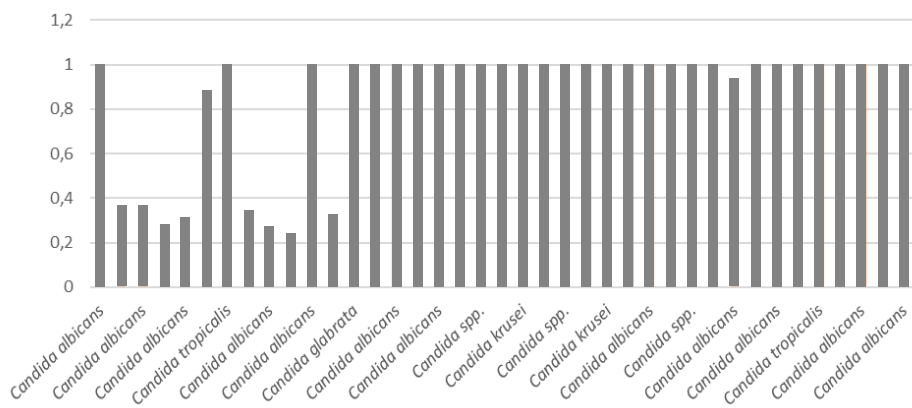


Figura 2. Actividad de proteasas por especie de *Candida* spp. en los aislamientos colonizadores (muy alta < 0,69; alta = 0,79-0,70; media = 0,89-0,80; débil = 0,9-0,99; negativa=1

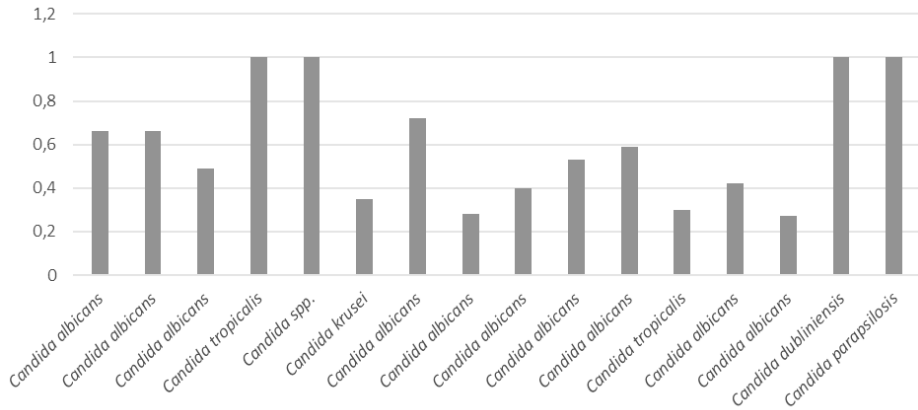


Figura 3. Actividad de fosfolipasas por especie de *Candida* spp. en aislamientos patógenos (muy alta <0 ,69; alta = 0,79-0,70; media = 0,89-0,80; débil = 0,9-0,99; negativa = 1)

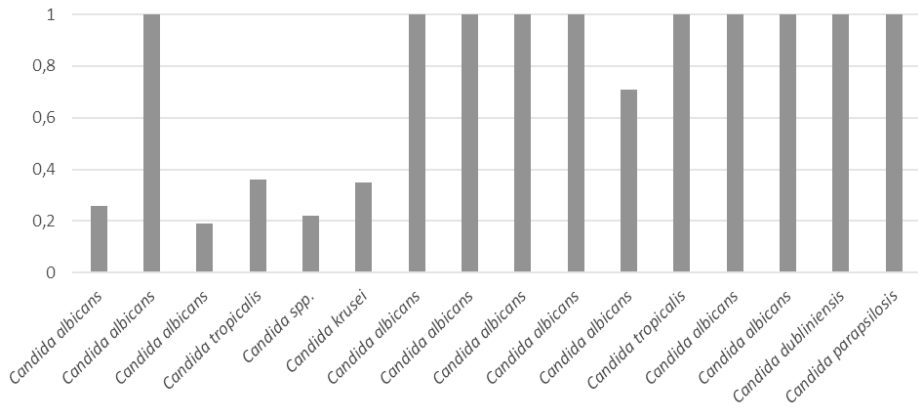


Figura 4. Actividad de proteasas por especie de *Candida* spp. en aislamientos patógenos (muy alta < 0,69; alta = 0,79-0,70; media = 0,89-0,80; débil = 0,9-0,99; negativa = 1)

Discusión

La virulencia de las especies de *Candida* depende de diferentes factores, entre los cuales se destacan las enzimas hidrolíticas con actividades de esterasas, fosfolipasas, hemolíticas y proteolíticas, que facilitan la adhesión e invasión de los tejidos (1,9,10). La actividad de fosfolipasas se ha determinado en diferentes estudios de candidiasis vulvovaginal (4,7,11,12). Fule *et al*. solo encontraron actividad de fosfolipasa en *C. albicans* y no en especies no *albicans*; el 56,6 % de los aislamientos mostraron un coeficiente muy alto (4). En el presente estudio, se halló una actividad muy alta en 27 aislamientos de *C. albicans,* pero también, en aislamientos de *C. tropicalis, C. parapsilosis*, *C. krusei* y otras especies de *Candida*.

En el estudio de Shirkani *et al*. no se encontró correlación entre la actividad de fosfolipasa y la candidiasis vulvovaginal (13). En el presente estudio, tampoco se hallaron diferencias significativas entre los aislamientos de *Candida* colonizadores y los causantes de candidiasis vulvovaginal. En un estudio de Abu-Lubad en mujeres jordanas, se encontró una mayor actividad de fosfolipasas en *C. albicans* (12), de la misma forma que se reveló en el presente estudio.

Son varios los estudios en los que se ha analizado la actividad de las proteasas en casos de candidiasis vulvovaginal (6,7,11,12). Por un lado, en el estudio ya mencionado de Fule *et al*.,se halló una alta actividad de proteasa

en todos los aislamientos, particularmente en los de C. *albicans (*97,1 %). En cuanto a la correlación con la candidiasis vulvovaginal, sí encontraron una asociación significativa con la actividad de proteasas (4). En el presente estudio, no se encontró una diferencia significativa entre los aislamientos colonizadores y los patógenos. Bassyouni *et al.* encontraron una alta actividad de proteasa en 82,5 % de los aislamientos de *C*. Asimismo, Abu-Lubad *et al*. encontraron que el 88,1 % de los aislamientos tenía una alta actividad de proteasa (12). En el presente estudio, solo el 25 % de los aislamientos estudiados mostró una muy alta actividad de proteasa, y esta se presentó en *C. albicans*, *C. tropicalis, C. krusei, C. lusitaniae* y *Candida* spp.

En conclusión, se observa un mayor porcentaje de la actividad de fosfolipasas como factor de virulencia en los aislamientos estudiados (60,71 %), pero no se encontró una diferencia significativa entre los grupos de aislamientos colonizadores y los patógenos. En los aislamientos estudiados, solo se detectó un 25 % de actividad de proteasas. Es probable que la actividad de fosfolipasa sea la que cumple un papel preponderante en el proceso de interacción entre huésped y parásito. Sin embargo, serían necesarios otros estudios que permitan una mejor comprensión de este proceso de patogénesis.

Agradecimientos

A la señora María de la Vega, por su valiosa colaboración técnica.

Referencias

1. Mroczyńska M, Brillowska-Dabrowska A. Virulence of clinical *Candida* isolates. Pathogens. 2021;10:466-78. https://doi.org/10.3390/pathogens10040466
2. Kotey FC, Dayie NT, Tetteh-Uarcoo PB, Donkor ES. Candida bloodstream infections: changes in epidemiology and increase in drug resistance. Infect Dis Res Treat. 2021;14:1-5. https://doi.org/10.1177/11786337211026927
3. Suárez P, Bello AM, Puello M, Young G, Durán M, Arechavala AI. Vaginal colonization and vulvovaginitis by *Candida* species in pregnant women from northern Colombia. Arch Med. 2018;18:51-9. https://doi.org/10.30554/archmed.18.1.2010.2018
4. Fule SR, Das D, Fule RP. Detection of phospholipase activity of *Candida albicans* and non *albicans* isolated from women of reproductive age with vulvovaginal candidiasis in rural area. Indian J Med Microbiol. 2015;33:92-5. https://doi.org/10.4103/0255-0857.148392
5. Tanju K, Birsay G, Banu UC. Phospholipases of *Candida albicans*. Mycoses. 2001;44:361-7. https://doi.org/10.1046/j.1439-0507.2001.00685.x
6. Panizo M, Reviákna V, Flores Y, Montes W, Gonzales G. Actividad de fosfolipasas y proteasas en aislados clínicos de *Candida* spp. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 2005;25:217-28.
7. Ombrella AM, Racca L, Ramos L. Actividades proteinasa y fosfolipasa de aislamientos de *Candida albicans* provenientes de secreciones vaginales con distintos valores de pH. Rev Iberoam Micol. 2008;25:12-6. https://doi.org/10.1016/s1130-1406(08)70004-4
8. Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. Med Mycol. 1982;20:7-14. https://doi.org/10.1080/00362178285380031
9. Tunç B, Demiray Gürbüz E, Doluca-Dereli M. Investigation of phospholipase activity in *Candida albicans* strains isolated from blood and oral cavity specimens. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2021;51:50-60. https://doi.org/10.5222/tmcd.2021.84429
10. Tokak S, Kılıç İH, Horasanlı JE, Mutlu EG, Ta□bent FE, Karagöz ID. Vaginal candidiasis in Konya area: Etiology, risk factors, virulence patterns, and antifungal susceptibility. Rev Rom Med Lab. 2021;29:201-15. https://doi.org/10.2478/rrlm-2021-0012
11. Bassyouni RH, Wegdan AA, Abdelmoneim A, Said W, Aboelnaga F. Phospholipase and aspartyl proteinase activities of *Candida* species causing vulvovaginal candidiasis in patients with type 2 diabetes mellitus. J Microbiol Biotechnol. 2015;25:173441. https://doi.org/10.4014/jmb.1504.04009

12. Abu-Lubad MA, Helaly GF, Aqel AA, Jarajreh DA, Al-Kharabsheh AM, Abufraijeh SM, *et al*. Putative virulence factors of candida species colonising asymptomatic pregnant jordanian women. New Zeal J Med Lab Sci. 2021;75:51-6.

13. Shirkhani S, Sepahvand A, Mirzaee M, Anbari K. Phospholipase and proteinase activities of *Candida* spp. isolates from vulvovaginitis in Iran. J Med Mycol. 2016;26:255-60. https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2016.05.001

Biomédica 2023;43(Supl.1):97-108
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.6878

Artículo original

Candidiasis oral mixta en pacientes con diabetes de tipo 2: identificación y espectro de sensibilidad

Javier Araiza[1], Valentín Sánchez-Pedraza[2], Ana Karen Carrillo[1], Denise Fernández-Samar[1], Jazmín Tejeda[1], Alexandro Bonifaz[1]

[1] Laboratorio de Micología, Servicio de Dermatología, Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga", Ciudad de México, México
[2] Servicio de Endocrinología, Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga", Ciudad de México, México

Introducción. Los pacientes con diabetes mellitus de tipo 2 son propensos a adquirir infecciones por *Candida* spp., en ocasiones, causadas por más de una especie. La resistencia de algunas de ellas puede resultar en complicaciones médicas por falla del tratamiento.
Objetivos. Determinar la frecuencia y las variedades clínicas de la candidiasis oral mixta en pacientes con diabetes mellitus de tipo 2, las especies de *Candida* involucradas y sus espectros de sensibilidad a los antifúngicos utilizados como tratamiento.
Material y métodos. Se hizo un estudio transversal analítico en pacientes con diabetes mellitus de tipo 2, hiperglucemia (superior o igual al 7 % de la hemoglobina glucosilada, HbA1C) y con diagnóstico clínico de candidiasis oral. Mediante técnicas microbiológicas, se identificaron las especies causales de la candidiasis oral. Las pruebas de sensibilidad se llevaron a cabo con el método de difusión en placa con tiras (E-test®).
Resultados. Se incluyeron 72 pacientes: 32 (44 %) hombres y 40 (56 %) mujeres, clasificados en tres grupos de edad: jóvenes adultos (17 %), adultos (74 %) y ancianos (9 %), con una media de 51 años. No se encontraron diferencias significativas en la candidiasis oral según los grupos de sexo y edad, ni entre las candidiasis orales mixtas y el sexo, el porcentaje de HbA1C, el tratamiento antihiperglucemiante o el tiempo de diagnóstico de la diabetes mellitus de tipo 2. En el grupo etario de adultos, se encontró una correlación con las candidiasis mixtas o simples. Se encontraron 8 (13 %) casos de candidiasis mixtas: siete con coinfección por dos especies de *Candida* y uno con coinfección por tres especies. Las especies identificadas en ellos, fueron: *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. kefyr*, *C. tropicalis* y *C. krusei*. La mayoría de estas especies presentó sensibilidad a ketoconazol y fluconazol, y mayor resistencia a itraconazol.
Conclusiones. Las candidiasis orales mixtas se presentan, aproximadamente, en el 10 % de los pacientes con diabetes mellitus de tipo 2 y el tratamiento puede ser ineficaz cuando no se identifica el agente etiológico.

Palabras clave: diabetes mellitus de tipo 2; candidiasis; *Candida*; *Candida albicans*.

Mixed oral candidiasis in type 2 diabetic patients: Identification and spectrum of sensitivity

Introduction. Patients with type 2 diabetes mellitus are susceptible to acquire *Candida* spp. infections, sometimes involving more than one species. The resistance of some species to antimycotic agents can cause treatment failure.
Objectives. To determine the frequency and clinical varieties of mixed oral candidiasis in patients with type 2 diabetes mellitus, the involved species, and its sensitivity spectra when exposed to antifungals used as candidiasis treatment.
Material and methods. We developed an analytical cross-sectional study with 72 patients with type 2 diabetes mellitus with hyperglycemia (HbA1C ≥ 7%) and an oral candidiasis diagnosis. The causal species of oral candidiasis were identified through microbiological techniques, and sensitivity tests were carried out using the diffusion method in a plate with strips (E-test ®).
Results. We included 72 patients in the study, 32 (44%) males and 40 (56%) females. Patients were divided into three age groups: young adults (17%), adults (74%), and older adults (9%). The mean age of the patients was 51 years. No significant differences were found between mixed oral candidiasis and groups (sex and age), or between mixed oral candidiasis and gender, glycosylated hemoglobin level (HbA1C), antihyperglycemic treatment, or type 2 diabetes mellitus time of diagnosis. We found a correlation between the adult group and development of mixed or simple oral candidiasis. The results showed eight (13%) cases of mixed oral candidiasis: seven with a coinfection of two species and one with a coinfection of three species. The identified species were *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. kefyr*, *C. tropicalis*, and *C. krusei*. Most of these species presented sensitivity against ketoconazole and fluconazole, and higher resistance to itraconazole.

Recibido: 03/02/2023
Aceptado: 12/04/2023
Publicado: 12/04/2023

Citación:
Araiza J, Sánchez-Pedraza V, Carrillo AK, Fernández-Samar D, Tejeda J, Bonifaz A. Candidiasis oral mixta en pacientes con diabetes de tipo 2: identificación y espectro de sensibilidad. Biomédica. 2023;43(Supl.1):97-108. https://doi.org/10.7705/biomedica.6878

Correspondencia:
Javier Araiza, Dr. Balmis 148, Colonia Doctores, Alcaldía Cuauhtémoc, Ciudad de México, México
Teléfono: (55) 5761 3923
javier.araiza55@gmail.com

Contribución de los autores:
Javier Araiza: diseño y conducción del estudio
Valentín Sánchez-Pedraza: diseño y valoración de inclusión de pacientes
Ana Karen Carrillo y Jazmín Tejeda: estudios micológicos
Denise Fernández-Samar: inclusión de pacientes y valoración dermatológica
Alexandro Bonifaz: valoración de inclusión de pacientes
Todos los autores participaron en la revisión final del manuscrito.

Financiación:
El proyecto no tuvo ninguna financiación.

Conflicto de intereses:
Los autores confirman no tener ningún conflicto de interés.

Conclusions. Mixed oral candidiasis occurs in approximately 10% of the patients with type 2 diabetes mellitus and its treatment can be ineffective when the etiological agent is not identified.

Keywords: Diabetes mellitus, type 2; candidiasis; *Candida*; *Candida albicans*.

La diabetes mellitus de tipo 2 es una enfermedad multisistémica, de disfunción metabólica, que se caracteriza por un aumento en la concentración de glucosa en la sangre debido a un déficit absoluto o relativo de insulina, el cual induce alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos, los lípidos y las proteínas. Sin embargo, esta enfermedad resulta de la interacción entre una predisposición genética, y factores de riesgo conductuales y ambientales (1,2).

En México, el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) reportó que, en el 2018, el porcentaje de habitantes con diabetes mellitus era de 10,3 % (3), lo que convierte a la diabetes mellitus de tipo 2 en uno de los problemas de salud pública más importantes de la actualidad. En las últimas décadas, han aumentado constantemente el número de casos y la prevalencia de la enfermedad (4).

Las complicaciones agudas –que aparecen por un mal control de la enfermedad– y las crónicas –que surgen conforme va evolucionando– son factores de morbimortalidad en esta población (5).

Con mayor frecuencia, los pacientes presentan estados hiperosmolares y complicaciones microvasculares y macrovasculares irreversibles, que incluyen: retinopatía, nefropatía y neuropatía; además de enfermedades cardiovasculares como infarto agudo al miocardio, enfermedad vascular cerebral e insuficiencia arterial periférica (6).

En el paciente diabético, también se presentan complicaciones en la cavidad bucal que, aunque no son específicas o patognomónicas, sí son más frecuentes y de peor evolución; entre estas se destacan: caries dental, glositis romboidal media, xerostomía, síndrome de ardor bucal, agrandamiento de las glándulas salivales, disgeusia, procesos infecciosos, etc. (7).

En estos últimos, la incidencia de infecciones fúngicas en pacientes con diabetes mellitus de tipo 2 se reconoció hace muchos años (8). La candidiasis oral es la infección más frecuente y es producida por hongos levaduriformes oportunistas, del género *Candida* (9). Estas levaduras son responsables de la mayor parte de las infecciones fúngicas en pacientes inmunosuprimidos. Las especies patógenas más comunes son: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei* (10,11). En un estudio realizado en Latinoamérica por Suárez *et al.*, en 2013, sobre candidiasis oral en pacientes con diabetes mellitus de tipo 2, se encontró que la especie predominante era *C. albicans* (30 %). Estos autores reportaron una frecuencia del 4,9 % de candidiasis mixtas causadas principalmente por *C. krusei* y *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. albicans* (12).

Por otra parte, Mohammadi *et al.* (13) reportaron que de 58 pacientes con diabetes de tipo 2, el 55 % fue positivo para candidiasis oral, causada por especies del género *Candida*, como *C. albicans* (36,2 %), *C. krusei* (5,2 %), *C. glabrata* (3,4 %) y *C. tropicalis* (3,4 %). Es importante señalar que también se identificaron varias de estas especies en una misma muestra, lo cual indica una candidiasis mixta.

La Organización Mundial de la Salud reporta que las lesiones bucales localizadas suelen responder a los preparados tópicos, como el gel de miconazol o las suspensiones bucales de nistatina o anfotericina B. Sin embargo, solo se hace referencia a la posología para pacientes con HIV/sida pero no para las lesiones en aquellos con enfermedades en aumento, como la diabetes mellitus (14).

Existen varios agentes antifúngicos (azoles y polienos) con diferentes modos de acción, disponibles para el tratamiento de la infección oral por *Candida* spp.

La disponibilidad creciente y la aplicación clínica de estos agentes antifúngicos, en especial los tópicos, permite su uso para la prevención de infecciones por *Candida* spp. en pacientes con un control metabólico deficiente, particularmente en las personas mayores que usan dentaduras postizas. Estas personas a menudo sufren de una sensación desagradable en la boca que puede provocar angustia intolerable y si, además, son pacientes con diabetes mellitus de tipo 2 y un control glucémico deficiente, los médicos les prescriben agentes antimicóticos tópicos para prevenir la candidiasis oral (15). Dicho tratamiento, para personas diabéticas y no diabéticas, se basa en el uso de agentes antifúngicos tópicos, como azoles (principalmente miconazol y fluconazol, pero también, ketoconazol e itraconazol) o polienos (anfotericina B y nistatina) (14,15).

El uso indiscriminado de estos antimicóticos en México resulta en una mayor resistencia antifúngica, lo que complica la elección del tratamiento y su eficacia en las candidiasis mixtas (16).

El objetivo del estudio fue determinar la frecuencia de candidiasis oral mixta en pacientes con diabetes mellitus de tipo 2 e hiperglucemia (mayor o igual a 7 % de hemoglobina glucosilada). Está demostrado que alrededor del 5 % de las candidiasis, en cualquier forma clínica, son mixtas (17) y poseen diversos espectros de sensibilidad y factores de virulencia, que impactan en la respuesta terapéutica y las presentaciones clínicas.

Materiales y métodos

Se llevó a cabo un estudio transversal analítico de pacientes hospitalizados en el área de Infectología del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga” con diabetes mellitus de tipo 2 e hiperglucemia (mayor o igual a 7 % de HbA1C). Se incluyeron pacientes adultos con diagnóstico de diabetes mellitus de tipo 2 y datos clínicos indicativos de candidiasis oral, que aceptaron participar en el estudio y firmaron el consentimiento informado. Se excluyeron aquellos con signos clínicos de candidiasis oral, pero con estudios micológicos sin estructuras visibles en el análisis microscópico, ni agentes identificados.

A los pacientes incluidos, se les examinó la cavidad oral y se les tomaron muestras mediante raspado de las lesiones orales. Se hizo un examen microscópico para buscar estructuras micóticas, pseudohifas, blastoconidios o ambos; y un cultivo en medio agar dextrosa de Sabouraud. Posteriormente, se hizo la resiembra en medios cromogénicos (CHROMagar®*Candida*) para la búsqueda intencionada de más de una especie de *Candida*, mediante el desarrollo de colonias de diferentes colores. Las especies se identificaron mediante pruebas fisiológicas (características micromorfológicas en agar harina de maíz y 1 % de *Tween* 80) y bioquímicas (Auxacolor2 de BIO-RAD®).

Se practicaron pruebas de sensibilidad mediante la técnica de difusión en placa de agar de Müeller-Hinton, con suplemento de glucosa al 2 % y 0,5 µg/ml de azul de metileno, y en tiras de tipo E-test®, de acuerdo con las modificaciones al protocolo M44-A sobre el uso de disco antifúngicos de difusión del *Clinical and Laboratory Standards Institute*, realizadas por Pfaller *et al.* (18). Se inocularon placas de agar de Müeller-Hinton de 15 cm de diámetro, con una suspensión de levaduras ajustada a 0,5 según la escala de McFarland (1×10^6 - 5×10^6 UFC/ml), mediante técnica masiva, con hisopo y rotando en tres direcciones, a fin de distribuir uniformemente el inóculo. Las placas se dejaron secar de 3 a 5 minutos, a fin de permitir la absorción de cualquier exceso de inóculo. En la superficie del agar inoculado, se colocaron tres tiras de E-test con distintos tipos de antimicóticos, cuidando de colocar el extremo de mayor concentración hacia el borde externo de la placa. Las placas se incubaron en aerobiosis a 35 °C durante 24 horas, para la posterior lectura de las ojivas de inhibición. El punto de intersección de la elipse de inhibición de crecimiento con la tira se tomó como la concentración mínima inhibitoria.

Se expusieron las 17 levaduras, identificadas en los casos de candidiasis oral mixta, a los antimicóticos sistémicos utilizados con más frecuencia para el tratamiento de dicha enfermedad: fluconazol, itraconazol y ketoconazol. El gradiente de concentración de las tiras fue de 4-64 µg/ml para el fluconazol, de 0,1-1,0 µg/ml para el itraconazol y de 0,12,0 µg/ml para el ketoconazol. Se utilizó como control de calidad la cepa de referencia *C. albicans* ATCC 10231 (no se contó en su momento con la cepa de *C. albicans* 90028), que ya tenía los puntos de corte de sensibilidad frente a los antimicóticos probados en el presente estudio. La sensibilidad de las cepas se reportó como: sensible, resistente o sensible según la dosis.

Los resultados obtenidos se recolectaron en una hoja de cálculo del programa Microsoft Excel, para su posterior manejo estadístico con ayuda del paquete computacional SPSS™, versión 24, bajo intervalos de confianza del 95 % y niveles de significación del 5 % (cuadro 1).

El trabajo fue sometido y aceptado por los comités de ética e investigación del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”, con el número DI/18/109/04/097.

Cuadro 1. Inferencia de la relación entre la frecuencia de candidiasis oral mixta* con las variables analizadas

	Tipo de variable	Prueba estadística	p	Conclusión
Diferentes sectores etarios (jóvenes-adultos, adultos y ancianos	Cualitativa	Tabla de contingencia 2 x 2 - Ji al cuadrado de Pearson	0,698	Se acepta la hipótesis nula que establece la independencia entre ambas variables. No existe asociación.
Sexo (femenino, masculino)	Cualitativa	- Tabla de contingencia 2 x 2 - Ji al cuadrado y prueba de Fisher	0,461	Se acepta la hipótesis nula. No existe relación entre ambas variables.
Porcentaje de hemoglobina glucosilada (HbA1C)	Cuantitativa1 (p=0,2)			Se acepta la hipótesis nula. No existe relación entre ambas variables.
Tiempo de diagnóstico de diabetes mellitus de tipo 2 (años)	Cuantitativa2 (p=0,006)	t de Student	0,1	Se acepta la hipótesis nula. No existe relación entre ambas variables.
Tratamiento empleado como control de hiperglucemia	Cualitativa	Ji al cuadrado de Pearson	0,097	Se acepta la hipótesis nula. No existe relación entre ambas variables.

* Variable cualitativa

1 Distribución normal

2 Distribución no paramétrica

Resultados

Se incluyeron 72 pacientes con diabetes mellitus de tipo 2 descontrolada, provenientes del Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga", 64 (89 %) estaban hospitalizados y 8 (11 %) asistieron a la consulta externa (no hospitalizados). De los 72 pacientes, 32 (44 %) eran hombres y 40 (56 %) mujeres, con rangos de edad entre 22 y 85 años (mediana de 54 años**).**

Para el análisis final, se incluyeron 63 pacientes: 62 con candidiasis pseudomembranosa, y uno de ellos, además, con queilitis angular, en los cuales se comprobó la infección oral mediante análisis microscópico de las muestras obtenidas de las lesiones de la cavidad bucal (cúmulos de blastoconidios, seudohifas o ambos). Los pacientes excluidos fueron los nueve en los que no se encontraron estructuras micóticas.

Los pacientes incluidos estaban conformados por 25 (39 %) hombres y 38 (61 %) mujeres, divididos en tres grupos distintos de edad, denominados como: jóvenes adultos, de 20 a 35 años (17 %), adultos, de 36 a 59 años (74 %), y ancianos, de 75 a 90 años (9 %).

Respecto a la relación entre candidiasis oral mixta y grupo etario, no se encontró ninguna asociación a que no existía diferencia estadísticamente significativa entre los grupos y el hallazgo de candidiasis oral (p=0,698). Lo mismo se estableció para el caso de candidiasis oral mixta y sexo (p=0,461).

Al analizar la posible relación entre los valores de hemoglobina glucosilada (HbA1C) y la presencia de candidiasis oral mixta, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo con candidiasis oral simple (10,84 % de HbA1C) y aquel con candidiasis oral mixta (12,06 % de HbA1C) (p=0,1). Este comportamiento también se establece entre la detección de candidiasis oral mixta o candidiasis oral simple, y el tiempo de diagnóstico de la diabetes mellitus de tipo 2 (27,06 y 32,72 años, respectivamente) (p=0,412). Asimismo, se analizó si el tratamiento antihiperglucemiante influía sobre la presencia de candidiasis oral mixta o simple. Al evaluar la frecuencia de casos y el tratamiento, no se encontró una relación significativa (p=0,097); solo se observó que la mayoría de los casos se manejaban con insulina NPH: el 44,4 % (28/63) de las candidiasis orales por una especie y el 4,76 % (3/63) de las orales mixtas, y con metforminaglibenclamida, el 14,28 % (9/63) de las candidiasis orales por una especie y el 4,76 % (3/63) de las orales mixtas (cuadro 1).

Se identificaron ocho aislamientos mixtos que corresponden al 13 % de los pacientes incluidos; en siete de ellos se identificaron dos especies de *Candida* y en un paciente se encontraron tres especies; en seis casos estuvo implicada *C. albicans* (cuadro 2).

Los resultados obtenidos de las pruebas de sensibilidad frente a los antimicóticos probados (fluconazol, itraconazol y ketoconazol) se muestran en el cuadro 3.

Discusión

El diagnóstico de candidiasis oral en pacientes con diabetes mellitus es más frecuente que en la población sana. Existen diversos reportes en los cuales se indica que las cepas de *Candida,* aisladas de pacientes con HIV, diabetes mellitus de tipo 2, cáncer y candidiasis oral, presentan actividad proteolítica que facilita la invasión de los tejidos y el establecimiento de infección localizada o superficial que, en ocasiones, evoluciona a sistémica en comparación con las que presentan los sujetos sin dichas condiciones (19).

Cuadro 2. Especies de *Candida* identificadas en los pacientes con candidiasis oral mixta

Paciente	Especies identificadas
1	*Candida albicans*
	Candida krusei
	Candida glabrata
2	*Candida albicans*
	Candida tropicalis
3	*Candida albicans*
	Candida kefyr
4	*Candida albicans*
	Candida krusei
5	*Candida albicans*
	Candida kefyr
6	*Candida albicans*
	Candida glabrata
7	*Candida tropicalis*
	Candida dubliniensis
8	*Candida glabrata*
	Candida tropicalis

Cuadro 3. Concentraciones inhibitorias mínimas probadas para evaluar los patrones de sensibilidad de las especies de *Candida* aisladas de ocho pacientes con candidiasis oral mixta

Aislamiento de candidiasis oral mixta	Especies identificadas	Ketoconazol (µg/ml)	Itraconazol (µg/ml)	Fluconazol (µg/ml)
1	*Candida albicans*	<0,1 S	0,6 R	<4 S
	Candida krusei	0,25 SDD	0,8 R	12 SDD
	Candida glabrata	1,0 R	>1 R	9 SDD
2	*Candida albicans*	<0,1 S	0,4 SDD	<4 S
	Candida tropicalis	<0,1 S	>1 R	<4 S
3	*Candida albicans*	<0,1 S	>1 R	<4 S
	Candida kefyr	<0,1 S	<0,1 S	<4 S
4	*Candida albicans*	<0,1 S	0,1 S	<4 S
	Candida krusei	0,25 SDD	>1 R	16 SDD
5	*Candida albicans*	<0,1 S	0,6 R	<4 S
	Candida kefyr	<0,1 S	0,2 SDD	<4 S
6	*Candida albicans*	0,25 SDD	>1 R	<4 S
	Candida glabrata	0,7 R	>1 R	40 R
7	*Candida dubliniensis*	<0,1 S	0,6 R	<4 S
	Candida tropicalis	<0,1 S	>1 R	<4 S
8	*Candida tropicalis*	<0,1 S	>1 R	<4 S
	Candida glabrata	<0,1 S	0,4 SDD	<4 S

S: sensible; R: resistente; SDD: sensible dosis-dependiente

En este estudio, la candidiasis oral se encontró en 87,5 % (63/72) de los pacientes con diabetes mellitus de tipo 2 estudiados, con predominio de las mujeres sobre los hombres (1,5:1). También, se observó que la candidiasis oral es más frecuente (58,7 %; 37/63) en el grupo de adultos de los 36 a los 59 años; esto puede atribuirse a varios procesos que acompañan el avance de la edad, como la pérdida de dientes (20), el uso de prótesis que provocan la reducción del pH salival, favoreciendo la adhesión y el desarrollo de *Candida* spp. (21), y como la xerostomía, que implica disminución de la concentración de la saliva y sus elementos antifúngicos (lisozimas, lactoferrinas y lactoperoxidasas). Estos resultados concuerdan con lo publicado por Suárez *et al*. (12).

Se encontraron diferencias según el tipo de paciente: hospitalizados y no hospitalizados. En los primeros, fue más frecuente encontrar candidiasis oral ya que, si bien el motivo de la hospitalización fue descompensación metabólica, se agrega la existencia de factores predisponentes, implícitos en

su hospitalización prolongada, tales como mala higiene, mal estado nutricional y terapia con antibióticos, los cuales favorecen el desarrollo de la infección, aunque no haya una asociación estadística entre dichas variables. Osuna *et al*. identificaron que el 21% de casos de candidiasis oral se presentó en pacientes cuya causa de admisión al hospital fue descompensación metabólica y que tuvieron una mayor estancia hospitalaria (más de 10 días) (22). Fanello *et al*. demostraron que existe un gran riesgo de infección en la cavidad oral conforme aumentan los días de hospitalización y observaron manifestación de la candidiasis oral en los primeros siete días. Ambas publicaciones concuerdan con el motivo de internamiento y el tiempo de evolución de la candidiasis oral que se encontró en los pacientes del presente estudio (23).

Existen ciertos desacuerdos respecto a si los factores metabólicos, que constituyen la mejor manera de controlar la enfermedad y evitar el desarrollo de complicaciones macrovasculares y microvasculares, tienen correlación con la predisposición a la candidiasis oral en la población con diabetes mellitus de tipo 2. Carda *et al.* demostraron que pacientes con HbA1C por encima del 8 %, tenían aumento de la glucosa salival, lo que favorece el desarrollo de este tipo de levaduras (20). De igual manera, Balan *et al*. afirman que, durante los episodios de hiperglucemia, la alteración ambiental de la cavidad oral aumentó la producción de glucosa y ácido en la saliva, lo que promovió la transición de *Candida* spp. de comensal a agente patógeno (24). En el presente trabajo, se encontró una relación positiva entre valores elevados de HbA1C (por arriba de 8,4 %) y candidiasis oral mixta, sin alcanzar una significancia estadística.

Entre los agentes etiológicos identificados, *C. albicans* fue el más aislado (72 %), tal y como se reporta en la mayoría de los artículos relacionados con candidiasis. En un estudio de Mohammadi *et al*., se concluyó que las especies de *Candida* encontradas con mayor frecuencia en la cavidad oral de los pacientes con diabetes mellitus, son: *C. albicans* (36,2 %), *C. krusei* (10,4 %), *C. glabrata* (5,1 %) y *C. tropicalis* (3,4 %), cifras muy similares a las del presente estudio (13). Otros autores han mencionado la identificación de *C. lusitaniae*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii* y *C. pulcherrima* en la mucosa oral de pacientes total y parcialmente edéntulos (62,3 %) y en la mucosa oral de pacientes diabéticos (37,7 %) (24,25).

Por otra parte, el porcentaje de cepas no-*albicans,* identificado en el presente estudio, fue del 27 %: 11% de *C. tropicalis*, 6 % de *C. glabrata*, 4 % de *C. dubliniensis*, 3% de *C. krusei* y *C. kefyr*. Rosa-García *et al.* reportaron porcentajes semejantes para las cepas de *C. albicans* (74,6 %), *C. tropicalis* (15,2 %) y *C. kefyr* (3,4 %) en un estudio sobre la colonización e infección bucal por *Candida* spp. en pacientes con diabetes mellitus de tipo 2 o sin ella que, además, tenían enfermedad renal crónica con necesidad de diálisis (26).

El segundo agente etiológico más aislado (11 %) en este proyecto fue *C. tropicalis* (11 %), que también fue encontrado en segundo lugar por Zuza-Alves *et al*., con una frecuencia del 4,5 %, en un estudio realizado en Brasil, a partir de aislamientos de especies de *Candida* de muestras de la cavidad oral de pacientes con trasplante de hígado (27). Es importante mencionar que *C. tropicalis* está cobrando mayor relevancia debido a su frecuencia y a sus factores de virulencia, ya que impactan directamente en la estrategia terapéutica. En un estudio indio, se concluyó que existe un aumento significativo de las infecciones por *Candida* spp. en pacientes con cáncer oral, sometidos a quimioterapia o radioterapia, en quienes predominaron las especies no-*albicans*, principalmente, *C. tropicalis* (42,8 % de los casos) (27).

En una revisión sistemática de Reyes-Montes *et al*. sobre el estado actual de la etiología de la candidiasis en nuestro país, se menciona que la forma clínica superficial más común es la genital (47,81 %), seguida por la candidiasis oral (36,26 %) (28). Esta forma clínica se presentó en diferentes poblaciones, como pacientes con HIV o sin él, cáncer, diabetes mellitus, niños y adolescentes, niños con mala nutrición y personas de la comunidad Tarahumara.

El agente etiológico más aislado fue *C. albicans* (77,24 %), seguido del complejo *C. glabrata* (13,16 %), *C. tropicalis* (5,13 %), *C. krusei* (3,29 %) y el complejo *C. parapsilosis* (menos del 1%). En este estudio, la frecuencia de aislamientos es muy similar para la especie *C. krusei,* pero no se identificaron especies del complejo *C. parapsilosis* en ninguno de los casos de candidiasis oral mixta.

En el presente estudio, ocho pacientes (13 %) presentaron aislamientos mixtos: un paciente tenía coinfección por tres especies de Candida (*C. albicans*, *C. krusei* y *C. glabrata*) y siete pacientes tenían coinfección por dos especies: *C. albicans - C. kefyr* (dos pacientes), *C. tropicalis - C. glabrata*, *C. dubliniensis - C. tropicalis, C. albicans - C. tropicalis*, *C. albicans - C. glabrata* y *C. albicans - C. krusei*. Estos dos últimos aislamientos también fueron reportados en el 8 % de los pacientes con diabetes mellitus en el estudio de Mohammadi (13).

La coexistencia de diferentes especies hace más persistente la infección y puede señalar un estado de riesgo para el desarrollo de infecciones más graves, además de dificultar su tratamiento. De ahí la importancia de la identificación de *C. tropicalis* y *C. glabrata,* especies que en los últimos años han aumentado su patogenicidad, incluso, se ha determinado sinergismo entre ambas especies para causar candidiasis orofaríngea grave (26,29). Estas infecciones son de difícil tratamiento porque *C. tropicalis* y *C. glabrata* son menos sensibles a los azoles, lo cual aumenta el riesgo de candidemia mediante diferentes mecanismos (24,26,29).

Otros autores han publicado frecuencias de aislamientos mixtos similares a los de este proyecto y con especies parecidas (12,13,30). De la Rosa-García *et al*. identificaron nueve cultivos mixtos en pacientes con diabetes mellitus de tipo 2, uno de ellos causado por tres especies (*C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis*), cuatro por *C.albicans - C. glabrata* y uno por *C. glabrata - C. tropicalis* (26). Martínez *et al.* señalaron una relación entre el número de especies aisladas de la cavidad oral de pacientes con HIV positivo y el tipo de infección. Afirman que el aislamiento de una sola especie se asocia con pacientes con una infección primaria, mientras que el aislamiento de más de una especie ocurre en aquellos que sufren infecciones recurrentes (30). Asimismo, estudios sobre los patrones de recurrencia confirman que la infección producida por una cepa diferente a la que originó el episodio inicial prevalece en pacientes con tratamiento previo de antifúngicos (30).

El tratamiento de la candidiasis oral usualmente es de base tópica (nistatina, clotrimazol, ketoconazol) para pacientes que no sufren ningún tipo de complicaciones. Sin embargo, la terapia antimicótica con triazoles es apropiada en pacientes con infecciones recurrentes resistentes al tratamiento o en pacientes con gran riesgo de desarrollar infecciones sistémicas (31), como aquellos con HIV, cáncer, diabetes mellitus, etc. Por tal motivo, en el presente estudio se evaluó la sensibilidad *in vitro* de las especies identificadas mediante difusión en agar con fluconazol, itraconazol y ketoconazol.

Cabe mencionar que, en el caso específico del presente trabajo, la respuesta clínica al tratamiento antimicótico dependió de ciertos factores, como las características de inmunidad de los pacientes con diabetes mellitus de tipo 2 (disminución de la población de células dendríticas, eosinófilos y neutrófilos, entre otros) (32), incremento de la glucosa salival, los factores de virulencia expresados por *Candida* spp., al igual que la sensibilidad del microorganismo al medicamento y la farmacodinamia de este, entre otros.

En los últimos años, en numerosos estudios se ha reportado que el incremento en la frecuencia de los aislamientos de especies no-*albicans*, la mayoría proveniente de pacientes con algún tipo de inmunosupresión, presenta menor sensibilidad que *C.albicans* e, incluso, resistencia a dos o tres agentes antifúngicos (12,13,29,33). En este proyecto, se encontró que dos aislamientos de *C. glabrata* (66,7 %) fueron resistentes a ketoconazol y dos cepas de *C. krusei* (100 %) fueron sensibles según la dosis. Esto difiere de los resultados de *C. albicans*, en los cuales todos los aislamientos resultaron sensibles (cuadro 3). Cabe destacar que la mayoría de las cepas no-*albicans* (tres aislamientos de *C. tropicalis* (100 %), dos de *C. glabrata* (66,7 %), uno de *C. dubliniensis* (100 %) y dos de *C. krusei* (100 %) (cuadro 3), fueron resistentes a itraconazol, al igual que el 66,7 % de los aislamientos de *C. albicans.* Lo anterior no concuerda con lo publicado en la literatura científica. Por ejemplo, Sanitá encontró resistencia en el 93,3 % de los aislamientos de *C. glabrata,* en el 5 % de *los de C. tropicalis* y en el 4 % de los de *C. albicans* (29). Por el contrario, otras especies del no-*albicans* presentan un comportamiento similar al de *C. albicans* y son más sensibles a ciertos azoles.

En el presente estudio, esas especies fueron *C. tropicalis*, *C. dubliniensis* y *C. kefyr,* que tuvieron el 100 % de sensibilidad a fluconazol y a ketoconazol, con concentraciones mínimas inhibitorias bajas, incluso por debajo del extremo inferior del intervalo (cuadro 3).

Idealmente, no solo debería evaluarse la resistencia, sino también el mecanismo involucrado, ya que, en el caso de los azoles (los antimicóticos más utilizados), se ha demostrado resistencia cruzada. Derivado de esto, algunos autores describen que la resistencia a fluconazol tiene como consecuencia la resistencia al itraconazol (34). Dicha aseveración no coincide con lo encontrado en el presente estudio, ya que la mayoría de las especies aisladas (a excepción de *C. krusei* y *C. glabrata* con espectro sensible dependiente de la dosis) fueron sensibles a fluconazol. Otros autores también han determinado espectros sensibles a dicho fármaco en especies provenientes de pacientes con candidiasis oral (29,33). Se ha observado que las diferencias en la sensibilidad *in vitro* a fluconazol pueden ser desde el 70 % al 100 % en los aislamientos orales, dependiendo del grupo de pacientes estudiado (29).

Como se mencionó, el agente antimicótico ante el cual se observaron más casos de resistencia fue el itraconazol (5/6 especies aisladas). Sin embargo, las pruebas estadísticas no mostraron significancia, así que no hay asociación entre el antimicótico y alguna especie en particular de *Candida*. Manzano-Gayosso *et al*. también reportaron un gran porcentaje (19,9 %) de resistencia al itraconazol de especies de *Candida* causantes de onicomicosis, al evaluar su sensibilidad *in vitro* a diferentes fármacos (35).

Este estudio determinó que solo existe asociación significativa entre *C. glabrata* y la resistencia al ketoconazol (66,7 %). Esto concuerda con el gran porcentaje de aislamientos orales resistentes a ketoconazol (47,2 %) que

publicó Bremenkamp en un estudio sobre pacientes que padecían diabetes mellitus (15). Estos resultados se deben a que el ketoconazol es uno de los tratamientos más indicados para las candidiasis superficiales, lo que se refleja en el gran porcentaje de resistencia; por otro lado, *C. glabrata* es la especie más representativa en el grupo de pacientes adultos. Lindberg *et al*. demostraron con significancia estadística que el aislamiento de *C. glabrata* es más común en pacientes con una edad aproximada de 50 a 60 años, que fue el grupo etario en el que predominó la candidiasis oral (36).

Entre los diversos estudios de sensibilidad *in vitro* a antifúngicos en que se incluyen los métodos de microdilución en caldo, citometría de flujo y difusión en disco, es este último el que se considera como el método de referencia por el *Clinical and Laboratory Standards Institute*. En la literatura dermatológica coreana, Song demostró concordancia con dicho método al utilizar las tiras de difusión en agar (E-test®) de tres antimicóticos con especies de *Candida* aisladas de pacientes con candidiasis oral (37). Tales resultados fueron similares a los encontrados en el presente estudio.

Si bien no se puede establecer una correlación entre la sensibilidad *in vitro* y la respuesta clínica (34), determinar las concentraciones inhibitorias mínimas contribuye a la identificación de cepas sensibles y, aun más importante, a la identificación de cepas resistentes a ciertos agentes antifúngicos, lo cual podría explicar los fracasos observados con diversos tratamientos.

En conclusión, con los hallazgos analizados se estableció que no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas que expliquen el desarrollo de candidiasis oral según con la edad, el sexo, el nivel de hiperglucemia, el tiempo de diagnóstico de la diabetes o el tratamiento antihiperglucemiante empleado; o que expongan por qué el 13 % de pacientes descompensados con diabetes mellitus de tipo 2 desarrolló candidiasis mixta en la cavidad oral.

La especie aislada de pacientes descompensados con diabetes mellitus de tipo 2 y candidiasis oral mixta que resultó ser más sensible a los tres antimicóticos evaluados (fluconazol, itraconazol y ketoconazol), fue *C. kefyr* (83,3 %); *C. krusei* (66,7 %) fue sensible según la dosis y la especie con mayor resistencia fue *C. glabrata* (55,6 %), con una relación estadísticamente significativa (p=0,015). El ketoconazol fue el único antimicótico al que se asoció resistencia de una especie (66,7 % de *C. glabrata* versus 0 % de las demás especies) con un valor de p=0,018. Este resultado pone en evidencia la importancia de una adecuada y completa identificación de las especies de *Candida* involucradas en el desarrollo de la candidiasis oral mixta en pacientes con diabetes mellitus de tipo 2.

Referencias

1. Centers for Disease Control and Prevention. National diabetes statistics report: Estimates of diabetes and its burned in the United States. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services. Fecha de consulta: 14 de agosto de 2017. Disponible en: https://www.cdc.gov/diabetes/data/statistics-report/index.html

2. Bijelic R, Balaban J, Milicevic S, Sipka SU. The association of obesity and microvascular complications with glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus. Med Arch. 2020;74:14-8. https://doi.org/10.5455/medarh.2020.74.14

3. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Estadística a propósito del día mundial de la diabetes (14 de noviembre). Fecha de consulta: 10 de enero de 2023. Disponible en: https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2022/EAP_DIABETES2022.pdf

4. American Diabetes Association. Summary of Revisions: Standards of Medical Care in Diabetes—2019. Diabetes Care. 2019;42(Suppl1.):S4-6. https://doi.org/10.2337/dc19-Srev01
5. Savić S. Diabetes mellitus. En: Tešanović G, editor. Porodična medicina. Banja Luka: Medicinski fakultet u Banjoj Luci; 2014. p. 319-41.
6. Polsky S, Ellis SL. Obesity, insulin resistance, and type 1 diabetes mellitus. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes. 2015;22:277-82. https://doi.org/10.1097/MED.0000000000000170
7. Mediavilla-Bravo JJ. Complicaciones de la diabetes mellitus. Diagnóstico y tratamiento. Semergen: 2001;27:132-45. https://doi.org/10.1016/S1138-3593(01)73931-7
8. Lamey PJ, Darwaza A, Fisher BM, Samaranayake LP, Macfarlane TW, Frier BM. Secretor status, candidal carriage and candidal infection in patients with diabetes mellitus. J Oral Pathol. 1988;17:354-7. https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.1988.tb01549.x
9. McIntyre GT. Oral candidiasis. Dent Update. 2001;28:132-9. https://doi.org/10.12968/denu.2001.28.3.132
10. Shoham S, Levitz SM. The immune response to fungal infections. Br J Haematol. 2005;129:569-82. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05397.x
11. Bonifaz A. Micología médica básica. 6a edición. México: McGraw-Hill, 2012. p. 445-84.
12. Suárez BL, **Á**lvarez MI, de Bernal M, Collazos A. *Candida* species and other yeasts in the oral cavities of type 2 diabetic patients in Cali, Colombia. Colomb Med. 2013;44:26-30.
13. Mohammadi F, Javaheri MR, Nekoeian S, Dehghan P. Identification of *Candida* species in the oral cavity of diabetic patients. Curr Med Mycol. 2016;2:1-7. https://doi.org/10.18869/acadpub.cmm.2.2.4
14. Manfredi M, McCullough MJ, Polonelli L, Conti S, Al-Karaawi ZM, Vescovi P, *et al. In vitro* antifungal susceptibility to six antifungal agents of 229 *Candida* isolates from patients with diabetes mellitus. Oral Microbiol Immunol. 2006;21:177-82. https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2006.00274.x
15. Bremenkamp RM, Caris AR, Jorge AO, Back-Brito GN, Mota AJ, Balducci I, *et al.* Prevalence and antifungal resistance profile of *Candida* spp. oral isolates from patients with type 1 and 2 diabetes mellitus. Arch Oral Biol. 2011;56:549-55. https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2010.11.018
16. Manzano-Gayosso P, Méndez-Tovar LJ, Hernández-Hernández F, LópezMartínez R. La resistencia a los antifúngicos: un problema emergente en México. Gac Med Mex. 2008;144:23-6.
17. Romero-Luévano AG, Araiza-Santibáñez J, Hernández MA, Cerón-Araiza M, Hernández-Guzmán VA, Ponce RM, *et al.* Candidosis mixtas en aislamientos clínicos de pacientes procedentes del Hospital General de México Dr. Eduardo Liceaga; identificación e importancia. Dermatol Rev Mex. 2014;58:239-46.
18. Pfaller MA, Boyken L, Messer SA, Tendolkar S, Hollis RJ, Diekema DJ. Evaluation of the etest method using Mueller-Hinton agar with glucose and methylene blue for determining amphotericin B MICs for 4,936 clinical isolates of *Candida* species. J Clin Microbiol. 2004;42:4977-9. https://doi.org/10.1128/JCM.42.11.4977-4979.2004
19. Hernández-Solís SE, Rueda-Gordillo F, Rojas-Herrera RA. Actividad de la proteinasa en cepas de *Candida albicans* aisladas de la cavidad oral de pacientes inmunodeprimidos, con candidiasis oral y sujetos sanos. Rev Iberoam Micol. 2014;31:13740. https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.09.003
20. Carda C, Mosquera-Lloreda N, Salom L, Gómez de Ferraris ME, Peydró A. Structural and functional salivary disorders in type 2 diabetic patients. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2006;11:E309-14.
21. Aguirre--Urizar JM. Candidiasis orales. Rev Iberoam Micol. 2002;19:17-21.
22. Osuna M, Rivera MC, Bocanegra C, Lancheros A, Tovar H, Hernández JI, *et al.* Caracterización de la diabetes mellitus tipo 2 y el control metabólico en el paciente hospitalizado. Acta Med Colomb. 2014;39:344-51.
23. Fanello S, Bouchara JP, Sauteron M, Delbos V, Parot E, Marot-Leblond A, *et al.* Predictive value of oral colonization by *Candida* yeasts for the onset of a nosocomial infection in elderly hospitalized patients. J Med Microbiol. 2006;55:223-8. https://doi.org/10.1099/jmm.0.46155-0

24. Balan P, B Gogineni S, Kumari N S, Shetty V, Lakshman Rangare A, L Castelino R, *et al*. *Candida* carriage rate and growth characteristics of saliva in diabetes mellitus patients: A case-control study. J Dent Res Dent Clin Dent Prospects. 2015;9:274-9. https://doi.org/10.15171/joddd.2015.048

25. Rodrigues CF, Rodrigues ME, Henriques M. *Candida* sp. infections in patients with diabetes mellitus. J Clin Med. 2019;10:8:76. https://doi.org/10.3390/jcm8010076

26. de la Rosa-García E, Miramontes-Zapata M, Sánchez-Vargas LO, Mondragón-Padilla A. Oral colonisation and infection by *Candida* sp. in diabetic and non-diabetic patients with chronic kidney disease on dialysis. Nefrologia. 2013;33:764-70. https://doi.org/10.3265/Nefrologia.pre2013.Aug.11790

27. Zuza-Alves DL, Silva-Rocha WP, Chaves GM. An update on *Candida tropicalis* based on basic and clinical approaches. Front Microbiol. 2017;8:1927. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01927

28. Reyes-Montes MDR, Duarte-Escalante E, Martínez-Herrera E, AcostaAltamirano G, Frías-De León MG. Current status of the etiology of candidiasis in Mexico. Rev Iberoam Micol. 2017;34:203-10. https://doi.org/10.1016/j.riam.2017.05.001

29. Sanitá PV, Mima EG, Pavarina AC, Jorge JH, Machado AL, Vergani CE. Susceptibility profile of a Brazilian yeast stock collection of *Candida* species isolated from subjects with *Candida*-associated denture stomatitis with or without diabetes. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2013;116:562-9. https://doi.org/10.1016/j.oooo.2013.07.002

30. Martínez MG, Perurena LM, Núñez CJ, Fernández AC, Bandera TF. Aislamiento, identificación y tipificación de levaduras en pacientes VIH positivos con candidiasis oral. Rev Cubana Med Trop. 1997;49:174-80.

31. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. Postgrad Med J. 2002;78:455-9. https://doi.org/10.1136/pmj.78.922.455

32. Soysa NS, Samaranayake LP, Ellepola AN. Diabetes mellitus as a contributory factor in oral candidiasis. Diabet Med. 2006;23:455-9. https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2005.01701.x

33. Negri M, Henriques M, Svidzinski TI, Paula CR, Oliveira R. Correlation between Etest, disk diffusion, and microdilution methods for antifungal susceptibility testing of *Candida* species from infection and colonization. J Clin Lab Anal. 2009;23:324-30. https://doi.org/10.1002/jcla.20337

34. Pérez-Cárdenas JE, Hoyos AM, Cárdenas-Henao C. Sensibilidad antimicótica de diferentes especies de hongos aislados de pacientes con micosis ungueal en la ciudad de Manizales (Caldas, Colombia). Biosalud. 2012;11:26-39.

35. Manzano-Gayosso P, Méndez-Tovar LJ, Arenas R, Hernández-Hernández F, Millán-Chiu B, Torres-Rodríguez JM, *et al*. Levaduras causantes de onicomicosis en cuatro centros dermatológicos mexicanos y su sensibilidad antifúngica a compuestos azólicos. Rev Iberoam Micol. 2011;28:32-5. https://doi.org/10.1016/j.riam.2010.11.002

36. Lindberg E, Hammarström H, Ataollahy N, Kondori N. Species distribution and antifungal drug susceptibilities of yeasts isolated from the blood samples of patients with candidemia. Sci Rep. 2019;9:3838. https://doi.org/10.1038/s41598-019-40280-8

37. Song YB, Suh MK, Ha GY, Kim H. Antifungal susceptibility testing with Etest for *Candida* species isolated from patients with oral candidiasis. Ann Dermatol. 2015;27:715-20. https://doi.org/10.5021/ad.2015.27.6.715

Biomédica 2023;43(Supl.1):109-19
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.6886

Artículo original

Esporotricosis en Argentina: análisis clínico y epidemiológico

Gabriela Santiso[1], Fernando Messina[1], Alicia Arechavala[1], Emmanuel Marín[1], María de las Mercedes Romero[1], María de los Ángeles Sosa[2], Florencia Rojas[3], Javier Mussin[3], Sonia Contreras[4], Viviana Galache[4], María Guerrero[4], Vanesa Sosa[5], Yone Chacón[6], Christian Álvarez[7], Ivana Maldonado[8], Mercedes Romero[9], Sofía Echazarreta[10], Norma Fernández[11], Silvia Relloso[12], Julián Serrano[13], Gustavo Giusiano[3]

[1] Unidad de Micología, Hospital de Enfermedades Infecciosas Francisco Javier Muñiz, Buenos Aires, Argentina
[2] Laboratorio Central Corrientes, Instituto de Medicina Regional, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina
[3] Instituto de Medicina Regional, Universidad Nacional del Nordeste, CONICET, Corrientes, Argentina
[4] Hospital de Alta Complejidad El Calafate, SAMIC, Santa Cruz, Argentina
[5] Laboratorio de Alta Complejidad (LACMI), Hospital Madariaga, Posadas, Argentina
[6] Hospital Señor del Milagro, Salta, Argentina.
[7] Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Laboratorio de Salud Pública de Tucumán, Tucumán, Argentina
[8] Laboratorio de Microbiología, Hospital Alemán, Buenos Aires, Argentina
[9] CEMAR, Departamento Bioquímico, Secretaría de Salud Pública, Rosario, Argentina
[10] Sala 9, Hospital de Enfermedades Infecciosas Francisco Javier Muñiz, Buenos Aires, Argentina
[11] Laboratorio de Micología, Hospital de Clínicas, Buenos Aires, Argentina
[12] Laboratorio de Microbiología, Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas "Norberto Quirno", Argentina
[13] Sección de Micología, Hospital Independencia, Santiago del Estero, Argentina

Introducción. La esporotricosis es una micosis de implantación causada por *Sporothrix* spp. Este se encuentra distribuido mundialmente y se puede encontrar en la vegetación y en el suelo. La ruta más frecuente de adquisición de la infección es por traumatismos con elementos contaminados con propágulos del hongo. Los gatos domésticos son los animales más afectados y pueden transmitirla a los humanos, por lo que es considerada una zoonosis. Las formas clínicas incluyen: la linfangítica nodular, la cutánea fija, la pulmonar (poco habitual) y la diseminada (excepcional).
Objetivo. Analizar la epidemiología de la esporotricosis en Argentina entre los años 2010 y 2022. Describir la presentación clínica, los métodos de diagnóstico y el tratamiento de los casos diagnosticados en este período. Conocer los genotipos circulantes y observar su relación con el lugar geográfico de adquisición de la infección.
Materiales y métodos. Se llevó a cabo un estudio analítico, retrospectivo y observacional, en el que se analizaron las historias clínicas de los pacientes con esporotricosis de 12 instituciones de salud de Argentina, entre los años 2010 y 2022.
Resultados. Se presentan 54 casos en los que la forma clínica más frecuente fue la linfangítica nodular y el tratamiento de elección fue el itraconazol. En todos los casos se realizó diagnóstico convencional. El cultivo de las muestras clínicas resultó más sensible que el examen directo, ya que permitió el desarrollo de *Sporothrix* spp. en los 54 casos. En 22 casos se hizo identificación molecular y *Sporothrix schenkii sensu stricto* fue la especie más frecuentemente aislada.
Conclusiones. Este estudio permitió conocer la epidemiología de esta micosis en Argentina, así como la disponibilidad de métodos diagnósticos y el tratamiento de elección.

Palabras clave: *Sporothrix*; esporotricosis; micosis; Argentina.

Sporotrichosis in Argentina: clinical and epidemiological analysis

Introduction. Sporotrichosis is an implantation mycosis caused by *Sporothrix* spp. It is distributed worldwide and can be found in vegetation and soil. The most frequent route of infection is by trauma with elements contaminated with fungal propagules. Since domestic cats are the most affected animals and can transmit this infection to humans, sporotrichosis is considered a zoonosis. Clinical presentations include nodular lymphangitis, fixed cutaneous, pulmonary (rare), and disseminated (exceptional).
Objectives. To analyze the epidemiology of sporotrichosis in Argentina during 2010 and 2022. To describe the clinical presentation, diagnostic methods, and treatment of cases diagnosed during this period. To know the circulating genotypes and to observe possible associations with the geographic location where the infection was acquired.
Materials and methods. Analytical, retrospective, and observational study. We analyzed

Recibido: 14/02/2023
Aceptado: 13/04/2023
Publicado: 13/04/2023

Citación:
Santiso G, Messina F, Arechavala A, Marín E, Romero MM, Sosa MA, *et al.* Esporotricosis en Argentina: análisis clínico y epidemiológico. Biomédica. 2023;43(Supl.1):109-19. https://doi.org/10.7705/biomedica.6886

Correspondencia:
Gabriela Santiso, Unidad de Micología, Hospital de Enfermedades Infecciosas Francisco Javier Muñiz, Buenos Aires, Argentina
Teléfono: (5411) 4096 9543
santisogabi@gmail.com

Contribución de los autores:
Gabriela Santiso, Alicia Arechavala, María de los Ángeles Sosa, Florencia Rojas, Sonia Contreras, María Teresa Guerrero, Vanesa Sosa, Yone Chacón, Christian Álvarez, Ivana Maldonado, Mercedes Romero, Norma Fernández, Silvia Relloso, Julián Serrano y Gustavo Giusiano: adquisición, análisis e interpretación de datos clínicos y micológicos
Fernando Messina, Viviana Galache y Sofía Echazarreta: adquisición, análisis e interpretación de datos clínicos y escritura del manuscrito
Emmanuel Marín y María de las Mercedes Romero: revisión de aspectos metodológicos
Javier Mussin: georreferenciación de datos
Gustavo Giusiano: análisis de georreferenciación
Gabriela Santiso: escritura del manuscrito
Todos los autores participaron en la revisión del manuscrito.

Financiación:
Esta investigación no recibió financiación externa.

Conflicto de intereses:
Los autores no declaran conflictos de interés.

the medical records of patients with sporotrichosis from 12 health institutions in Argentina, between 2010 and 2022.
Results. We present 54 cases in which the most frequent clinical form was nodular lymphangitis, and the treatment of choice was itraconazole. Conventional diagnosis was made in all cases. Culture of clinical samples was more sensitive than direct examination because it allowed the isolation of *Sporothrix* spp. in all 54 cases. Molecular identification was performed in 22 cases, with *Sporothrix schenkii sensu stricto* being the most frequently isolated species.
Conclusions. This study allowed to know the epidemiology of this mycosis in Argentina, as well as the availability of diagnostic methods and the treatment of choice.

Keywords: *Sporothrix*; sporotrichosis; mycoses; Argentina.

La esporotricosis es una micosis de implantación causada por *Sporothrix* spp., un hongo dimorfo de distribución mundial, que se encuentra en la vegetación, en materia orgánica en descomposición y en el suelo. Se describe como una sapronosis cuya forma más frecuente de transmisión es por traumatismo con elementos contaminados con propágulos del hongo (1).

Varios mamíferos son susceptibles a esta infección y los gatos domésticos son los animales que se ven afectados con mayor frecuencia (2). La esporotricosis felina se adquiere por arañazos o mordeduras, o por contacto directo con las secreciones de otros gatos, lo que puede provocar epizootias. Asimismo, estas mascotas pueden transmitirla a los humanos, lo que la convierte en una zoonosis. La ruta alternativa de infección está relacionada con la transmisión animal horizontal, lo que facilitaría la entrada directa de la fase levaduriforme del hongo al individuo (2-5). La inhalación de propágulos fúngicos (conidios o levaduras) puede ser la causa de las lesiones pulmonares o de las formas diseminadas (5,6).

Las infecciones por hongos dimorfos suelen observarse en zonas geográficamente limitadas. En particular, la esporotricosis tiene alta incidencia en Brasil, China y Sudáfrica (7). En el último tiempo, Brasil ha experimentado uno de los mayores brotes epidémicos de esporotricosis de origen zoonótico. Estos brotes se correlacionan con un incremento de casos de esporotricosis en gatos (2-5,8).

Entre las posibles presentaciones clínicas de esta micosis, la forma linfangítica nodular es la más frecuente, seguida por la forma cutánea fija. La forma pulmonar es poco habitual y la forma diseminada es excepcional y se da especialmente en huéspedes inmunocomprometidos (2,6).

Los gatos son los huéspedes animales más susceptibles a la infección por *Sporothrix* spp. y pueden desarrollar formas graves de esta micosis. La localización más frecuente de la infección es la región cefálica, principalmente la zona de la nariz. Su frecuencia es mayor entre los gatos machos adultos, sin dueño y sin castrar. En estos casos, el examen directo permite observar un elevado número de levaduras en las muestras obtenidas de estas lesiones (2,7,9), a diferencia de lo que ocurre con las lesiones en humanos.

Se dispone de escasos agentes antifúngicos efectivos para tratar la esporotricosis felina. Los casos de fracaso terapéutico son frecuentes en el tratamiento con itraconazol por lo que debería considerarse el uso combinado de distintos antifúngicos con efecto sinérgico (10). El éxito del tratamiento depende de múltiples factores, pero se asocia principalmente con la interacción huésped-hongo (11).

En la esporotricosis humana, el tratamiento de elección en las formas

cutáneas o linfocutáneas es el itraconazol (12). También suele utilizarse el yoduro de potasio como primera alternativa (12). En las formas diseminadas o extracutáneas el tratamiento se realiza inicialmente con anfotericina B y luego se continúa con itraconazol (6).

La aplicación de técnicas moleculares para tipificar agentes patógenos fúngicos ha dado como resultado el reconocimiento de especies crípticas en varios géneros. La identificación definitiva de estas especies puede ayudar a definir el origen geográfico del evento causal, así como la fuente probable en los casos en que el paciente no la reconozca (3).

Durante más de un siglo, *Sporotrhrix schenckii sensu stricto* se describió como el único agente causal de esporotricosis humana y animal (1,3,9,13). Debido a los avances en la identificación molecular, actualmente se sabe que este género comprende aproximadamente 51 especies (14). Entre ellas, especies de interés clínico como *Sporothrix brasiliensis, Sporothrix schenckii, Sporothrix globosa* y *Sporothrix luriei*. El resto son especies ambientales y poseen poca o ninguna virulencia para los huéspedes vertebrados de sangre caliente (2,3). Los miembros del complejo *Sporothrix pallida (Sporothrix chilensis, Sporothrix gemella, Sporothrix humicola, Sporothrix mexicana, Sporothrix pallida, Sporothrix palmiculminata, Sporothrix protea-sedis* y *Sporothrix stylites*) presentan un leve potencial patógeno para animales y humanos (3,7).

Entre las pruebas de diagnóstico existen algunas basadas en la detección de antígenos y anticuerpos circulantes, pero el estudio micológico, que incluye el examen directo y el cultivo, son los más utilizados. Luego del aislamiento, la identificación de la especie puede realizarse por distintas técnicas moleculares, entre estas la espectrometría de masas o la amplificación y la secuenciación de genes específicos. La genotipificación a nivel de especie puede ayudar a definir el origen geográfico del evento responsable de esta micosis, así como la probable fuente cuando el paciente no la identifique (2).

Conocer la epidemiología de la esporotricosis permite generar políticas de prevención considerando las distintas fuentes de infección, sobre todo aquellas relacionadas con animales.

El objetivo de este estudio fue analizar la epidemiología de la esporotricosis en Argentina entre los años 2010 y 2022; asimismo, describir la presentación clínica, los métodos de diagnóstico y el tratamiento de los casos diagnosticados en este período, conocer los genotipos circulantes y observar su relación con el lugar geográfico de adquisición de la infección.

Materiales y métodos

Se trata de un estudio analítico, retrospectivo y observacional. Se analizaron las historias clínicas de los pacientes con diagnóstico de esporotricosis registrados por 12 instituciones de salud de Argentina entre los años 2010 y 2022.

Como criterio de inclusión en esta casuística se consideraron aquellos pacientes con estudio micológico que incluían el examen directo en fresco y con coloración de Giemsa y cultivos del material obtenido de las lesiones. En los que se obtuvo crecimiento del hongo, se procedió a la identificación del agente causal por métodos fenotípicos o moleculares (espectrometría de masas o secuenciación de genes específicos). Los datos se consignaron en una ficha epidemiológica en formato Excel®.

Cuadro 1. Datos epidemiológicos

Lugar de residencia*	n	Ocupación	n
Buenos Aires**	9	Veterinario	4
Corrientes	14	Tarea rural	19
Salta	3	Trabajo manual	3
Paraguay	1	Empleados	8
Santa Fe	5	Salud	1
Misiones	2	Otras	8
Santiago del Estero	1	Sin datos	11
Tucumán	2		
Chaco	2		
San Luis	1		
Santa Cruz	8		
Sin datos	6		

* Al momento de la infección

** Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Provincia de Buenos Aires

Identificación

El aislamiento obtenido en los medios de cultivo, incubados a 28 y 37 °C, se identificó fenotípicamente por observación microscópica del microcultivo con montaje húmedo con azul de lactofenol. La identificación molecular se realizó por espectrometría de masas (MALDI-TOF, VITEK MS® o Bruker®) y por secuenciación de los genes *ITS1-5.8S-ITS2* y calmodulina.

Se hizo la georreferenciación de todos los casos clínicos. Las imágenes fueron creadas con Adobe Illustrator®.

Resultados

En el período estudiado se diagnosticaron 54 casos de esporotricosis. La mediana de edad de los pacientes fue de 35 años (rango: 11 a 69 años). Treinta y nueve pacientes fueron hombres, 14 mujeres y uno sin dato. En el cuadro 1 se muestran otros datos demográficos.

La descripción de las formas clínicas, la localización de las lesiones y la probable fuente de infección y las comorbilidades se presentan en el cuadro 2. La forma clínica más frecuente fue la linfangítica nodular (54 %), seguida por la forma cutánea fija (32 %). La localización en miembros superiores (63 %) fue la preponderante en esta serie de casos.

Las formas diseminadas tuvieron compromiso cutáneo, ganglionar, visceral con hepatoesplenomegalia y uno de los casos presentó infiltrado pulmonar cavitado. En solo un caso se pudo comprobar la inmunosupresión del paciente por infección con HIV. Por otra parte, las formas pulmonares se presentaron con fiebre, tos y expectoración mucopurulenta. Uno de los casos era una paciente fumadora, hipertensa y cardiópata; otro caso, un paciente diabético, y el tercero mostró compromiso pleural.

La figura 1 muestra lesiones de diferentes formas clínicas. En más del 85 % de los casos, la punción o biopsia del nódulo subcutáneo fue la muestra que permitió el diagnóstico (cuadro 3). Todos los pacientes fueron diagnosticados por medio del cultivo positivo, mientras que el rendimiento del examen directo fue del 19,2 %.En la figura 2 se muestra la coloración de Giemsa de la muestra clínica obtenida por escarificación de la lesión cutánea de la pierna del paciente de la figura 1A. La imagen del microcultivo de *Sporothrix* spp. se presenta en la figura 3.

Cuadro 2. Datos clínicos

Localización de las lesiones	**n**
Miembros superiores	34
Miembros inferiores	11
Otra localización cutánea	3
Pulmones	3
Diseminada	2
Sin dato	1
Forma clínica	**n**
Fija	17
Linfangítica	29
Pulmonar	3
Articular	1
Diseminada	4
Fuente probable de infección	**n**
Traumatismos con vegetales	10
Traumatismo	16
Arañazo de gato	17
Caza de mulitas	2
Inhalatoria	3
Desconocida	6
Comorbilidades	**n**
Ninguna	18
Diabetes	3
Hipotiroidismo	2
Infección con micobacterias (*Mycobacterium tuberculosis* y otras)	3
VIH	3
COVID	1
Hipertensión arterial	4
Linfoma	1
Embarazo	1
EPOC	1
Histoplasmosis	1
Cirugía cardíaca previa	1



Figura 1. A y B. Lesión en miembro inferior izquierdo y en antebrazo izquierdo de esporotricosis linfangítica nodular. C. Lesión en mano de esporotricosis cutánea fija. D. Lesiones en tronco de esporotricosis diseminada.

Cuadro 3. Muestras que posibilitaron el diagnóstico y las especies aisladas

Muestras diagnósticas	**n**
Punción o biopsia de nódulo subcutáneo	46
Escarificación cutánea	5
Lavado broncoalveolar	2
Líquido sinovial	1
Especies aisladas	**n**
Sporothrix schenckii complex	32
Sporothrix schenckii sensu stricto	12
Sporothrix brasiliensis	9
Sporothrix globosa	1

Figura 2. Lesión de pierna del paciente de la figura 1A. Giemsa, 1.000X

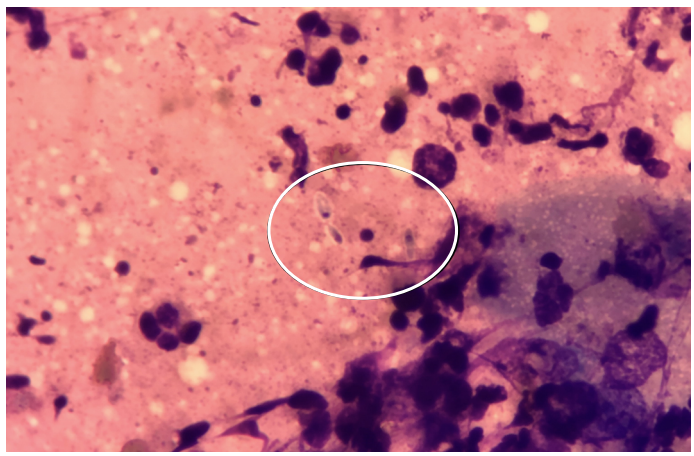
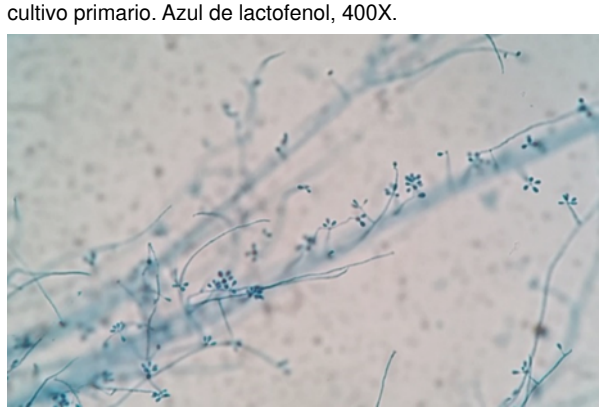


Figura 3. Microcultivo a 28 °C de *Sporothrix* spp., obtenido en cultivo primario. Azul de lactofenol, 400X.



Las especies aisladas se listan en el cuadro 3. Cabe destacar que solamente en 22 casos se realizó la identificación a nivel de especie mediante técnicas moleculares. En los otros 32 casos se identificó como *S. schenckii sensu lato*.

Sporothrix brasiliensis se aisló en 8 de 9 casos de pacientes que habían sido arañados o mordidos por gatos; *S. globosa* se encontró en un enfermo que había sufrido traumatismos con árboles. En dos casos en los que se aisló *S. schenckii sensu stricto*, la fuente de infección fueron los gatos, así como otros siete casos donde el agente etiológico fue identificado como complejo *S. schenckii* ya que no se realizó la identificación molecular.

La distribución geográfica de los casos presentados se muestra en la figura 4.

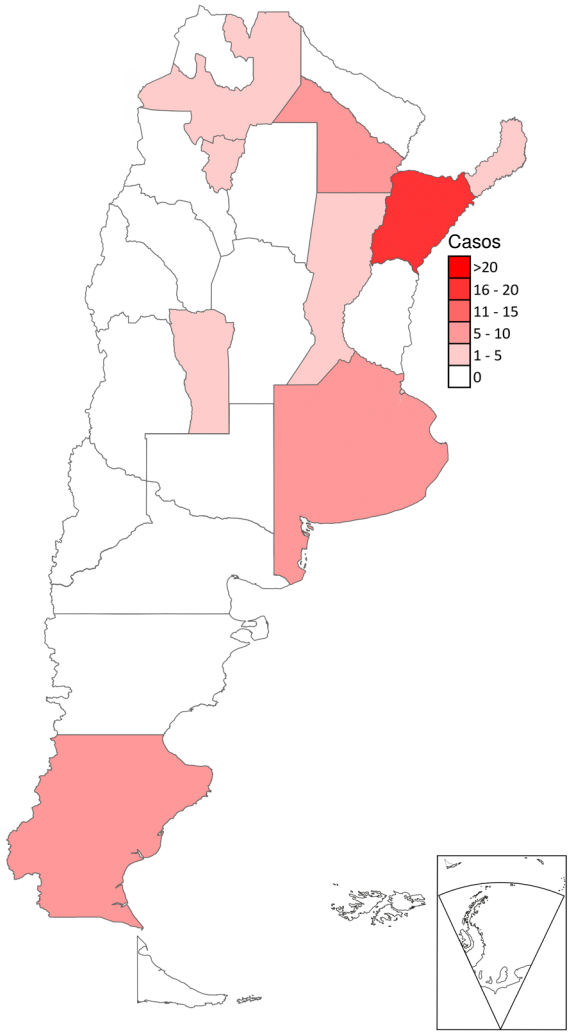


Figura 4. Georreferenciación de los casos presentados durante el período 2010-2022

Cuadro 4. Esquemas terapéuticos utilizados

Tratamiento	**n**
Itraconazol	20
Itraconazol más termoterapia	1
Itraconazol más terbinafina	1
Anfotericina B	4
Anfotericina B más itraconazol	2
Crioterapia	1
Desconocido	24
Sin tratamiento	1
Duración del tratamiento (meses)	**n**
Hasta 2	3
4-6	5
9-12	6
Desconocido	39

Un paciente no hizo el tratamiento y en 24 no se informó la recepción de la medicación. Los medicamentos utilizados y la duración del tratamiento se describen en el cuadro 4.

Discusión

La esporotricosis es la micosis de implantación de mayor prevalencia y distribución a nivel mundial (2,3,7). Se han descrito áreas hiperendémicas en Latinoamérica, Asia y África, que deben tenerse en cuenta sobre todo en pacientes que refieran viajes recientes (3,10). Aunque está estrechamente relacionada con personas que realizan tareas con alto riesgo de traumatismo, sobre todo agricultores, desde hace unos años comenzó a observarse su transmisión por animales como gatos domésticos y armadillos (2,7).

Esta enfermedad históricamente fue vinculada con una sola especie, *S. schenckii.* Actualmente, dentro de este género se reconocen varios clados que pueden vincularse con un área geográfica determinada, aunque aún en muchas regiones, la mayoría de los aislamientos no han sido estudiados en detalle (7). En relación con lo señalado, podemos decir que *S. schenckii sensu stricto* tiene una distribución geográfica amplia o global, *S. brasiliensis* es hiperendémica en Brasil y ha comenzado a diseminarse en otros países latinoamericanos como Paraguay, Argentina y Panamá (2). *Sporothrix globosa,* aunque tiene menor virulencia que las antes mencionadas (14), constituye el 99 % de todas las especies aisladas en Asia (15) y que ha sido descrita en diversas partes del mundo (13,14). *Sporothrix luriei* o *S. mexicana* fueron reportadas en pocas ocasiones (2,7).

En nuestra casuística se registraron casos en diferentes áreas geográficas de nuestro país. También se hizo el diagnóstico de esta micosis en un paciente que refirió haber adquirido la infección durante un viaje a Rio de Janeiro (Brasil). Estas regiones tienen diferentes características climáticas, de suelo y tipo de vegetación. Esta distribución se puede observar en la figura 4.

En Rio de Janeiro, donde la población de gatos callejeros es elevada, se han detectado más de 5.000 casos en los últimos años. Estos animales son los protagonistas de la transmisión de la esporotricosis al hombre en un brote zoonótico sin precedentes (3,4). La especie responsable de esta zoonosis es *S. brasiliensis* (11). Recientemente, fue publicado un trabajo que relaciona la alta carga fúngica en las gotitas respiratorias expulsadas en el estornudo de los gatos infectados con la esporotricosis en humanos (5) y, en especial, con las formas extracutáneas como la granulomatosa conjuntival (2).

El dimorfismo térmico de *Sporothrix* es una adaptación morfológica importante que condiciona la patogenicidad de esta infección y es compartida con otros agentes patógenos humanos, filogenéticamente distantes, como aquellos de los órdenes Onygenales y Eurotiales. Las especies de *Sporothrix* anidadas en el clado patogénico son hongos termodimorfos que responden de manera más eficiente a los estímulos térmicos. *Sporothrix brasiliensis* expresa diferentes mecanismos de virulencia como termotolerancia y expresión de adhesinas y melanina, y es la especie más virulenta en algunos modelos de ratón. Esta especie se asocia con formas atípicas y más graves de la enfermedad, incluida la infección cutánea diseminada en huéspedes inmunocompetentes y la enfermedad sistémica (2,3). Asimismo, parece ser menos sensible a determinados agentes antifúngicos como el itraconazol o la anfotericina B (10).

Otras especies como *S. schenckii*, *S. globosa* o *S. luriei* son responsables de un número mucho menor de casos de esta enfermedad en estas latitudes. En otros estados brasileños, como el de Rio Grande do Sul, los casos de esporotricosis también están aumentando, aunque en menor medida (16).

En los casos de nuestro país, de los pacientes que sufrieron heridas o inoculación por el contacto con gatos, se aisló *S. brasiliensis* en 8 de 17 casos y *S. schenckii sensu stricto* en dos casos; en los siete casos restantes no se hizo la identificación molecular. Por otra parte, *S. globosa* se asoció a traumatismos con elementos vegetales, aunque cinco de los casos en los que se identificó *S. schenckii sensu stricto* como agente causal también tuvieron relación con el traumatismo con material vegetal.

En todos los casos presentados en este trabajo, el diagnóstico se realizó por los métodos convencionales a partir del examen micológico de las diferentes muestras clínicas. La punción o biopsia de nódulos subcutáneos fue la muestra clínica con mejor rendimiento para el diagnóstico (85 % de los casos). El cultivo en medios habituales y a dos temperaturas sigue siendo el método para la confirmación del diagnóstico frente al examen directo en fresco o coloreado, los cuales tuvieron un escaso 19,2 % de positividad.

El avance de esta micosis en ciertas áreas geográficas y la presencia de *Sporothrix* spp. en los gatos generó la investigación y la aplicación de técnicas rápidas para el diagnóstico de esta micosis (17). En un estudio llevado a cabo en Brasil, se realizó la detección de anticuerpos anti-*Sporothrix* por la técnica de inmunocromatografía en sueros de 100 pacientes con diferentes formas clínicas. Esta técnica mostró una sensibilidad del 83 % y una especificidad del 82 %. Estos resultados evidenciaron que Anti-Sporo LFA, IMMY® es una herramienta prometedora para el diagnóstico rápido de esta micosis (17).

El tratamiento de elección en las formas cutáneas o linfocutáneas es el itraconazol a una dosis diaria de 6 a 10 mg/kg con un máximo de 400 mg por día (12,18). Solo en México se utiliza el yoduro de potasio como primera alternativa (12,19). En las formas diseminadas o extracutáneas, el tratamiento se lleva a cabo inicialmente con anfotericina B y luego se continúa con itraconazol (6).

El tiempo promedio de tratamiento es de 3 a 6 meses y siempre se recomienda continuar 2 a 3 semanas más, una vez que se observa mejoría clínica (16).

En los últimos años se ha observado una pobre respuesta al tratamiento con itraconazol en especial con los casos de *S. brasiliensis* (20). Aunque aún no hay una recomendación general, en algunos casos se podría utilizar terapia combinada con terbinafina o yoduro de potasio (19,21). La respuesta terapéutica no solo está ligada a la especie implicada, sino también a la forma clínica y las comorbilidades del huésped (16).

En esta serie de casos el itraconazol fue la medicación más utilizada, aunque en tres casos se indicó la terapia combinada por la escasa respuesta clínica con la monoterapia. Esta parece ser una alternativa cuando la respuesta no es la esperada.

En Argentina, la esporotricosis linfangítica nodular es la forma clínica más frecuente. Es importante destacar la presencia de *S. brasiliensis* y su transmisión zoonótica ya que generó la aparición de casos en zonas con clima poco favorable para esta micosis. Con lo anterior, el reconocimiento de esta infección es necesaria porque puede acontecer en regiones no habituales. De igual forma, se requiere impulsar la identificación molecular de los aislamientos para conocer la distribución geográfica de las especies de este género.

Referencias

1. Lopes-Bezerra LM, Mora-Montes HM, Zhang Y, Nino-Vega G, Rodrigues AM, de Camargo ZP, *et al*. Sporotrichosis between 1898 and 2017: The evolution of knowledge on a changeable disease and on emerging etiological agents. Med Mycol. 2018;56(Suppl. 1):S126-43. https://doi.org/10.1093/mmy/myx103
2. Rossow JA, Queiroz-Telles F, Caceres DH, Beer KD, Jackson BR, Pereira JG, *et al*. A One health approach to combatting *Sporothrix brasiliensis*: narrative review of an emerging zoonotic fungal pathogen in South America. J Fungi (Basel). 2020;6:247. https://doi.org/10.3390/jof6040247
3. Rodrigues AM, Della Terra PP, Gremião ID, Pereira SA, Orofino-Costa R, de Camargo ZP. The threat of emerging and re-emerging pathogenic *Sporothrix* species. Mycopathologia. 2020;185:813-42. https://doi.org/10.1007/s11046-020-00425-0
4. Cabañes FJ. Esporotricosis en Brasil: animales + humanos = una sola salud. Rev Iberoam Micol. 2020;37:73-4. https://doi.org/10.1016/j.riam.2020.01.001
5. de Andrade Galliano Daros Bastos F, Raimundo Cognialli RC, Rodrigues de Farias M, dos Santos Monti F, Wu K, Queiroz-Telles F. Spread of *Sporothrix* spp. through respiratory droplets from infected cats: A potential route of transmission. Med Mycol. 2022;60:myac079. https://doi.org/10.1093/mmy/myac079
6. Bonifaz A, Tirado-Sánchez A. Cutaneous disseminated and extracutaneous sporotrichosis: Current status of a complex disease. J Fungi. 2017;3:6. https://doi.org/10.3390/jof3010006
7. Chakrabarti A, Bonifaz A, Gutierrez-Galhardo MC, Mochizuki T, Li S. Global epidemiology of sporotrichosis. Med Mycol. 2015 53:3-14. https://doi.org/10.1093/mmy/myu062
8. Han HS, Kano R. Feline sporotrichosis in Asia. Braz J Microbiol. 2020;52:125-34. https://doi.org/10.1007/s42770-020-00274-5
9. Martínez Cepeda GE. Esporotricosis en caninos y felinos: hallazgos clínicos, métodos de diagnóstico y tratamiento. Analecta Vet. 2016;36:30-9.
10. Rodrigues AM, Gonçalves SS, de Carvalho JA, Borba-Santos LP, Rozental S, Camargo ZP. Current progress on epidemiology, diagnosis, and treatment of sporotrichosis and their future trends. J Fungi. 2022;8:776. https://doi.org/10.3390/jof8080776
11. Gremião ID, Miranda LH, Pereira-Oliveira GR, Menezes RC, Machado AC, Rodrigues AM, *et al*. Advances and challenges in the management of feline sporotrichosis. Rev Iberoam Micol. 2022;39:61-7. https://doi.org/10.1016/j.riam.2022.05.002
12. Queiroz-Telles F, Bonifaz A, Cognialli R, Lustosa BPR, Vicente VA, Ramírez-Marín HA. Sporotrichosis in children: Case series and narrative review. Curr Fungal Infect Rep. 2022;16:33-46. https://doi.org/10.1007/s12281-022-00429-x
13. Mora-Montes HM. *Sporothrix* and sporotrichosis 2.0. J Fungi. 2022;8:821. https://doi.org/10.3390/jof8080821
14. Nava-Pérez N, Neri-García LG, Romero-González OE, Terrones-Cruz JA, García-Carnero LC, Mora-Montes HM. Biological and clinical attributes of *Sporothrix globosa*, a causative agent of sporotrichosis. Infect Drug Resist. 2022;15:2067-90. https://doi.org/10.2147/IDR.S362099
15. Rudramurthy SM, Shankarnarayan SA, Hemashetter BM, Verma S, Chauhan S, Nath R, *et al*. Phenotypic and molecular characterisation of Sporothrix globosa of diverse origin from India. Braz J Microbiol. 2021;52:91-100. https://doi.org/10.1007/s42770-020-00346-6
16. Poester VR, Basso RP, Stevens DA, Munhoz LS, de Souza Rabello VB, Almeida-Paes R, *et al*. Treatment of human sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis*. J Fungi. 2022;8:70. https://doi.org/10.3390/jof8010070
17. Cognialli R, Bloss K, Weiss I, Caceres DH, Davis R, Queiroz-Telles F. A lateral flow assay for the immunodiagnosis of human cat-transmitted sporotrichosis. Mycoses. 2022;65:926-34. https://doi.org/10.1111/myc.13516
18. Kauffman C.A.; Bustamante, B.; Chapman, S.W.; Pappas, P.G. Clinical practice guidelines for the management of sporotrichosis: 2007 update by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2007;45:1255-65. https://doi.org/10.1086/522765
19. Bonifaz A, Vázquez-González D. Diagnosis, and treatment of lymphocutaneous sporotrichosis: What are the options? Curr Fungal Infect Rep. 2013;7:252-9. https://doi.org/10.1007/s12281-013-0140-3

20. Almeida-Paes R, Oliveira MME, Freitas DFS, Valle ACFD, Gutierrez-Galhardo MC, Zancopé-Oliveira RM. Refractory sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis* in humans appears to be unrelated to in vivo resistance. Med Mycol. 2017;55:507-17. https://doi.org/10.1093/mmy/myw103

21. Zhang X, Huang H, Feng P, Zhang J, Zhong Y, Xue R, *et al*. *In vitro* activity of itraconazole in combination with terbinafine against clinical strains of itraconazole-insensitive *Sporothrix schenckii*. Eur J Dermatol. 2011;21:573-6. https://doi.org/10.1684/ejd.2011.1400

Biomédica 2023;43(Supl.1):120-31
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.6871

Original article

In vitro sensitivity of *Malassezia furfur* isolates from HIV-positive and negative patients to antifungal agents

Kevin Ehemann, Andrés Contreras, Adriana Marcela Celis-Ramírez

Grupo de Investigación Celular y Molecular de Microorganismos Patógenos, Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de los Andes, Bogotá, D. C., Colombia

Introduction. *Malassezia* is a lipophilic and lipid-dependent yeast genus belonging to the skin microbiota of humans and other animals. However, due to dysbiosis processes or other factors in the host, this yeast can cause different pathologies, ranging from skin diseases, such as seborrheic dermatitis, to fungemia. Isolation of *Malassezia furfur* has been reported in HIV-positive patients with or without skin lesions. Due to its opportunistic nature and its variable resistance to antifungal compounds, it is relevant to know the *Malassezia* sensitivity profiles.
Objective. To determine the sensitivity to different antifungal agents, of clinical isolates of *M. furfur* obtained from HIV-positive or negative patients, with or without seborrheic dermatitis**.**
Materials and methods. Assessment of isolates sensitivity to itraconazole, voriconazole, fluconazole, and amphotericin B was performed by two techniques: (1) Broth microdilution using Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) protocol M27-A3 with modifications; and (2) agar tests using Etest®.
Results. Isolates obtained from HIV patients showed an increase in the minimum inhibitory concentration of fluconazole, voriconazole, and amphotericin B, compared with those of non-HIV patients. Itraconazole was the antifungal with the lowest minimum inhibitory concentration (MIC) in most isolates**.**
Conclusion. We observed differences in the sensitivity profiles of *M. furfur* isolates according to the context of the patient. High MIC of antifungals like fluconazole, commonly used for treating pathologies caused by *Malassezia*, were identified.

Keywords: *Malassezia*; HIV; antifungal agents; drug resistance, fungal; dermatitis, seborrheic; microbial sensitivity tests.

Sensibilidad *in vitro* a antifúngicos de aislamientos de *Malassezia furfur* de pacientes positivos y negativos para HIV

Introducción. *Malassezia* es un género de levaduras lipofílicas que dependen de los lípidos y hacen parte de la microbiota de la piel de humanos y otros animales. No obstante, debido a procesos de disbiosis u otros factores en el huésped, esta levadura puede llegar a causar diferentes enfermedades: desde cutáneas (como dermatitis seborreica) hasta fungemias. Se han reportado aislamientos de *Malassezia furfur* en pacientes positivos para HIV, con lesiones cutáneas o sin ellas. Por su carácter oportunista y sensibilidad variable a los compuestos antifúngicos, es relevante conocer los perfiles de sensibilidad.
Objetivo. Determinar la sensibilidad a diferentes antifúngicos de aislamientos clínicos de *M. furfur* obtenidos de pacientes positivos o negativos para HIV, con dermatitis seborreica o sin ella.
Materiales y métodos. La sensibilidad de los aislamientos a itraconazol, voriconazol, fluconazol y anfotericina B, se determinó mediante dos técnicas: microdilución en caldo según el protocolo M27-A3 del *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI), con modificaciones, y pruebas en agar mediante Etest®.
Resultados. Los aislamientos obtenidos de pacientes con HIV mostraron aumento de la concentración inhibitoria mínima a fluconazol, voriconazol y anfotericina B, en comparación con los de pacientes sin HIV. Por otro lado, al evaluar la mayoría de los aislamientos, el itraconazol fue el antifúngico con la menor concentración inhibitoria mínima.
Conclusión. Se evidencian diferencias en los perfiles de sensibilidad de los aislamientos de *M. furfur,* según el contexto del paciente, y elevadas concentraciones inhibitorias mínimas de antifúngicos como el fluconazol, usados comúnmente para el tratamiento de las enfermedades causadas por *Malassezia* spp.

Palabras clave: *Malassezia*; HIV; antifúngicos; farmacorresistencia fúngica; dermatitis seborreica; pruebas de sensibilidad microbiana.

Received: 06/02/2023
Accepted: 19/04/2023
Published: 02/05/2023

Citation:
Ehemann K, Contreras A, Celis-Ramírez AM. *In vitro* sensitivity of *Malassezia furfur* isolates from HIV-positive and negative patients to antifungal agents. Biomédica. 2023;43(Supl.1):120-31. https://doi.org/10.7705/biomedica.6871

Corresponding author:
Adriana Marcela Celis-Ramírez, Grupo de Investigación Celular y Molecular de Microorganismos Patógenos, Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de los Andes, Carrera 1 N°18a-12, La Candelaria, Bogotá, D. C., Colombia
Teléfono: (+57) (313) 421 9613
acelis@uniandes.edu.co

Author's contributions:
Kevin Ehemann y Adriana Marcela Celis-Ramírez: concepción, diseño y revisión crítica del contenido intelectual
Andrés Contreras: redacción del manuscrito
Todos los autores participaron en la adquisición, análisis e interpretación de los datos.

Funding:
Funded by the seed research project INV-2021-117-2216 of the *Universidad de los Andes*.

Conflicts of interest:
The authors declare no competing interests.

Malassezia is a genus of lipophilic and lipid-dependent yeast classified into 18 species, that are part of the skin microbiota in humans and other animals. Recently *M. auris*, *M. palmae* and *M. rara* were proposed (1-4). *Malassezia globosa*, *M. restricta,* and *M. sympodialis* are the most prevalent species in the human skin mycobiome (5,6). Despite being commensal, they can act as opportunistic pathogens causing atopic dermatitis, seborrheic dermatitis, folliculitis, and pityriasis versicolor, and can be involved in Crohn's disease and pancreatic cancer (7-9). The pathophysiology of these processes is not entirely understood. However, it is related to an increase in the activity of lipases and phospholipases released by the yeast to obtain lipid compounds and produce biofilms, among others (2).

Topical antifungals such as ketoconazole or terbinafine are used to treat localized skin infections. In addition, in the case of inflammatory processes, the topical use of corticosteroid or calcineurin inhibitors is also required (2,10). If localized management fails, lesions persist or the extent is considerable, an oral-systemic antifungal such as itraconazole or fluconazole should be considered (7). On the other hand, new *Malassezia* growth inhibitor candidates could interfere with enzymes essential for its metabolism. Lysine is one of these candidates showing yeast growth inhibition *in vitro*. However, further studies are required (11). Other candidates include essential oils from different plants (12).

In medical practice, this type of skin pathology is diagnosed based on the patient's clinical characteristics, and empirical management is given, so etiological isolation is not generally performed. It is important to highlight that these treatments require prolonged use of antifungal agents, which in turn takes the risk of leading to antifungal resistance development (13-15). Resistance mechanisms are not fully elucidated. Even so, biofilm formation, overexpression of iron-sulfur transporter such as ATM1 (16), different enzymes involved in the ergosterol biosynthesis pathway such as ERG5 (17) and ERG11 (16), and the presence of efflux pumps as the pleiotropic drug transporter PDR10 (18), are considered as possible yeast strategies to overcome the action of the antifungal agents.

Systemic infections by *Malassezia* spp. are also reported, predominantly in neonates or adults with some degree of immunocompromise (HIV infection, chronic corticosteroid use, cancer). Some related risk factors are using a skin catheter for lipid infusion or a central venous catheter, and prophylactic fluconazole (6,19,20). So far, *M. furfur*, *M. sympodialis*, and *M. pachydermatis* are involved with fungemia. In these cases, the available treatment with a high efficiency rate is amphotericin B (6). However, there is a report of an amphotericin B-resistant *M. sympodialis,* isolated from a neonatal intensive care unit, which was susceptible to voriconazole and fluconazole (21). Treatment duration varies depending on the causative species (6,22-24).

Considering immunosuppressive states as risk factors for local and systemic infection, previous studies have tried to identify differences in skin colonization by *Malassezia* spp. in patients with HIV infection known status. It has been demonstrated that seropositive patients have a higher concentration of *Malassezia* yeasts in the skin, both those with clinical manifestations of seborrheic dermatitis and those without lesions (22). A high percentage of patients with skin lesions had not yet started antiretroviral therapy (ARVT). These studies show an increased number of *M. furfur* isolates in seropositive compared with those of the seronegative population (16.7% versus 1.5%, respectively) (24-26).

Given the risk of resistance development, secondary to prolonged topical treatments of local skin infections, and *Malassezia*'s capability to cause systemic disease with fungemia, it is crucial to determine its sensitivity and resistance profiles. However, the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-A3 *in vitro* reference method for yeast by microdilution has not been standardized for this lipid-dependent microorganism. Therefore, no official cut-off points exist to determine the sensitivity or resistance profiles to antifungals, albeit there are epidemiological cut-off values for *M. pachydermatis* and *M. furfur* (27). For this reason, several authors have modified the M27A3 protocol by adding compounds for *Malassezia* growth and evaluating the minimum inhibitory concentration (MIC) (27-32). These studies reported resistance to azoles, particularly fluconazole, and to polyenes like amphotericin B, which showed higher levels of MIC. However, variable results in isolated species of systemic infections depend on the medium used in the tests (6,33).

The epsilon test (Etest®) technique is a well-established method for *Candida* spp. However, MIC determination is not standardized for *Malassezia* spp. Previous sensitivity studies reported the use of different culture media and lipid supplements finding varied sensitivity profiles for *M. pachydermatis* and *M. furfur.* These assessments showed that Etest® is equivalent in MIC to microdilution in *M. pachydermatis* and to some antifungal azoles for *M. furfur* (15,28-30), but more studies are needed to reach this conclusion. In Colombia, only a few studies have been carried out with this methodology (15).

Considering all the above, it is important to establish a standard protocol to determine the antifungal resistance of *Malassezia* spp. In addition, considering the ease of assaying sensitivity through an Etest® compared to microdilution, it is appropriate to perform a study about concordance between both methods in species that may cause cutaneous and systemic infections.

To provide helpful information contributing to the knowledge about the sensitivity profile of *Malassezia* spp., we evaluated its sensitivity *in vitro* to commonly used antifungal therapeutic agents. We used *M. furfur* from previous isolates of HIV-positive and negative patients, with and without seborrheic dermatitis. The evaluation was done with two methods: broth microdilution and the Etest® methods. The concordance between the methods determined the Etest® as an alternative method with significant advantage in terms of its essential and categorical agreement with the microdilution method.

Materials and methods

Isolates and inoculum preparation

The isolates were obtained from the collection of microorganisms of the *Grupo de Investigación Celular y Molecular de Microorganismos Patógenos* (CeMoP) at the *Universidad de los Andes*. The strains were previously isolated from HIV-positive and negative patients, with and without seborrheic dermatitis (table 1) (26). The isolates were identified by their assimilation capacity of Tween 20, 40, 60, 80 and cremophorEL; and molecular typing by sequencing of 5.8S rDNA-IT2 followed by phylogenetic analyses (26). The inoculum was done by taking five colonies, adding them to 5 ml of 0.5% Tween 80 solution, performing homogenization by vortex and filtration with sterile gauze. The concentration of the solution was calculated using a Neubauer chamber and adjusting it to obtain a standard inoculum concentration of $2x10^6$ CFU/ml (15,29,32,34).

Table 1. *Malassezia furfur* isolates used from CeMoP research group

Clinical entity	Strains
No lesion (NL)	58.42 NL; 103.76 NL; 110.80 NL; 9.2 SL; 46 NL
Seborrheic dermatitis (SD)	57.41 SD; 115.84 SD; 2.1 SD; 9.1 SD; 11.1 SD
No dermatitis and HIV (HIV)	23.13 HIV; 90.64 HIV; 99.72 HIV; 117 HIV; 40.26A HIV
Seborrheic dermatitis and HIV (SDHIV)	24.14 SDHIV; 26.16 SDHIV; 29.18 SDHIV; 67.51 SDHIV; 37.24B SDHIV

Broth microdilution test

The broth microdilution method was based on the protocol M27-A3 established by the CLSI (34). This technique is standardized for *Candida* spp. and *Cryptococcus* spp. We made modifications to achieve the growth of *Malassezia*. The culture medium used was Sabouraud supplemented with 0,5% Tween 40 and 0,5% Tween 60. Previous studies used this medium and showed adequate growth and easy visual evaluation of the results (11,15).

The solutions of the antifungals itraconazole, ketoconazole, voriconazole, and amphotericin B were prepared in 1% of dimethyl sulfoxide (DMSO) using serial double dilutions to obtain final concentrations ranging from 0.03 to 16 µg/ml. Fluconazole was prepared in sterile distilled water to final concentrations of 0.12 to 64 µg/ml (34).

The protocol was carried out in triplicate. Each plate was incubated at 33 ºC for 72 hours, and the MIC was checked every 24 hours using an inverted mirror. In the azole group, it was calculated at the point of a 50% decrease in growth concerning the control. Amphotericin B MIC was defined as the one at which no growth was evident (34).

Etest® assay

It was necessary to standardize the growth medium to compare the two sensitivity methods. We used Sabouraud dextrose agar supplemented, the same way for microdilution, with 0.5% Tween 40 and 0.5% Tween 60. The inoculum previously adjusted to a final concentration of 2 x 10^6 CFU/ml was homogenized on the surface of the medium with a cotton swab on the agar. The antifungals itraconazole, voriconazole, and amphotericin B were evaluated at a concentration of 0.02-32 µg/ml and fluconazole between 0.16 and 256 µg/ml (15,27,29). We did not test ketoconazole strips as they were out of existence when the experiments were performed. Cultures were incubated for 72 hours at 33 °C. After that, we determined the MIC. This protocol was performed in triplicate.

Data analysis

Essential and categorical agreement analyses were carried out to verify the performance of the Etest® against the microdilution test as the gold standard method. The essential agreement is defined when an isolate has MICs within plus or minus one doubling dilution using both methods. In contrast, the categorical agreement occurs when an isolate has the same category result (*i. e.* sensible or resistant) using both methods (35). Concerning the essential agreement analysis, the mean values of every MIC for each isolate were converted to Log_2 base so the comparison could be performed as follows:

$$Log_2 MIC_{Etest} - Log_2 MIC_{Microdilution}$$

If this subtraction results equal or less than 1 and equal or greater than -1, there is essential agreement because the MIC difference between both methods is within the ± 1 range.

In the case of the categorical agreement, no consensus was found on the epidemiological cut-off values for *M. furfur* isolated from skin, so we considered those proposed by previous studies for voriconazole, fluconazole, and amphotericin B (27,36). The tentative epidemiological cut-off values were obtained by determining the MICs of 78 *M. furfur* strains to these antifungals. Sensitive strains encompassed 95% of the evaluated isolates and resistant strains were those having a two-fold dilution higher than the modal MICs values. To conclude whether the categorical agreement analysis shows concordance, a Fisher test was performed based on the previously stated classification among sensitive or resistant isolates for both methods.

Regarding the relationship between the isolate MICs and the patient's health condition (HIV status and dermatitis condition), we considered only the data from the validated method (microdilution). Shapiro-Wilk test was performed to assess data normality. We applied eight mean differences tests for each antifungal to determine if any of the mentioned conditions were linked to higher resistance of *M. furfur* clinical isolates. MIC data were converted to $\log_2$ base as before.

Results

The results for each isolate using microdilution and Etest® methods are shown in table 2 and in figure 1. Isolates from HIVpositive patients showed higher fluconazole MICs than those isolated from HIV-negative patients. Most isolates had high amphotericin B MICs, while itraconazole and ketoconazole had the lowest of the antifungal agents tested.

Essential agreement

As shown in the methodology section, differences between each method's MICs by isolate were calculated. Figure 2 shows the distribution of these values. The dotted orange lines enclose the range of the essential agreement based on its definition. Table 3 shows a results summary for each antifungal agent regarding their essential agreement and verifying the Etest® method.

Table 2. Results from isolates according to the clinical entity for broth test and Etest®.

Clinical entity		Antifungal mínimum inhibitory concentration (µg/ml)								
		Fluconazole		Voriconazole		Itraconazole		Amphotericin B		Ketoconazole
		M27-A3	Etest®	M27-A3	Etest®	M27-A3	Etest®	M27-A3	Etest®	M27-A3
No lesion	58.42 NL	2	2	0.25	0.064	0.125	0.25	8	3	0.25
	103.76 NL	>64	>256	>16	32	0.25	0.75	>16	32	0.5
	110.80 NL	>64	>256	4	1.5	0.25	0.25	>16	16	0.25
	9.2 NL	8	4	0.12	0.032	0.12	0.19	>16	>32	0.12
	46 NL	16	12	0.5	12	0.12	0.38	4	2	0.12
Seborrheic dermatitis	57.41 SD	4	4	2	0.094	0.062	0.25	>16	>32	0.25
	115.84 SD	>64	>256	>16	12	0.125	0.5	>16	>32	1
	2.1 SD	8	12	2	0.125	0.031	0.19	>16	6	0.25
	9.1 SD	8	12	8	0.25	0.031	0.125	>16	>32	0.5
	11.1 SD	4	12	8	0.19	0.031	0.25	>16	>32	0.25
No dermatitis and HIV	23.13 HIV	>64	>256	4	4	0.5	0.5	8	16	1
	90.64 HIV	>64	>256	8	6	0.125	0.25	16	12	0.5
	99.72 HIV	>64	>256	8	16	0.25	0.5	>16	24	0.25
	117 HIV	>64	>256	8	>32	0.5	0.38	>16	32	0.5
	40.26A HIV	4	8	2	0.125	0.062	0.38	>16	>32	0.5
Seborrheic dermatitis and HIV	24.14 SDHIV	>64	>256	4	2	0.25	0.25	16	24	0.25
	26.16 SDHIV	>64	>256	4	3	0.25	0.19	16	24	0.25
	29.18 SDHIV	8	3	0.25	0.032	0.12	0.38	4	1.5	0.063
	67.51 SDHIV	4	2	0.12	0.023	0.12	0.25	4	2	0.12
	37.24B SDHIV	2	2	0.25	0.125	0.063	0.125	4	1	0.063

M27-A3: microdilution method

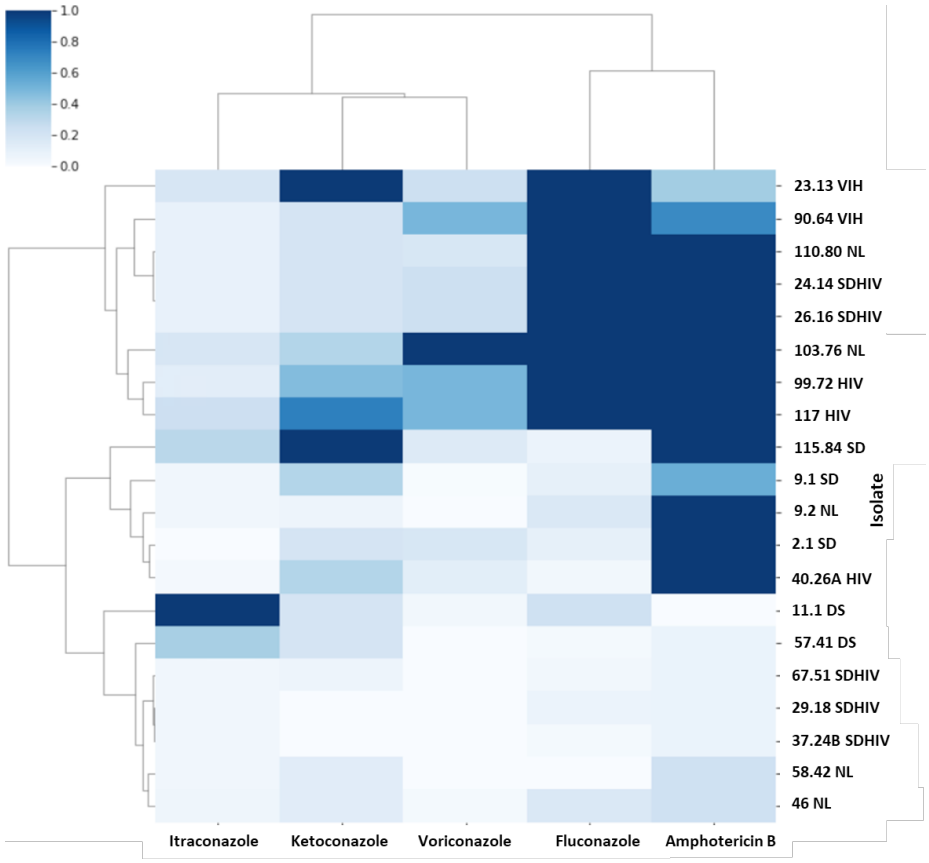


Figure 1. Heat map showing the sensitivity profiles for each antifungal agent (each one is normalized: 1 indicates the highest MIC value obtained and 0 the lowest value). Samples are grouped by similarity in their patterns. Three large groups are evident: (1) multiple resistance to fluconazole, amphotericin B and some to voriconazole, (2) resistance to amphotericin B and (3) susceptible to all antifungals.

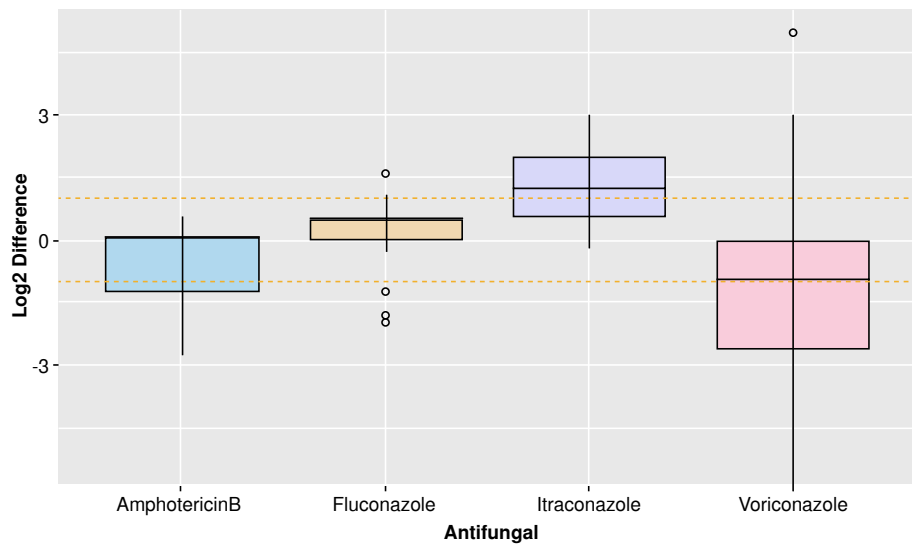


Figure 2. Essential agreement between MICs of Etest® and Broth Microdilution test. Differences of the binary logarithm (Log_2) of MICs. The orange dashed lines interval shows the mean and standard deviation for each group. Both methodologies agreed in the MIC determination.

Table 3. Results of each antifungal regarding their essential agreement

Antifungal	Number of isolates within essential agreement range	Percentage of essential agreement (%)	Assumed ECV (µg/ml)	Number of isolates coinciding in classification	Percentage of categorical agreement (%)
Amphotericin B	14	70	8	18	90
Fluconazole	15	75	512	20	100*
Itraconazole	10	50	1	20	100*
Voriconazole	8	40	8	14	70

ECV: epidemiological cut-off values

* ECV for these antifungals are higher compared to the concentrations obtained or tested that all categorical interpretation are categorized in one group (none is resistant according to the ECVs).

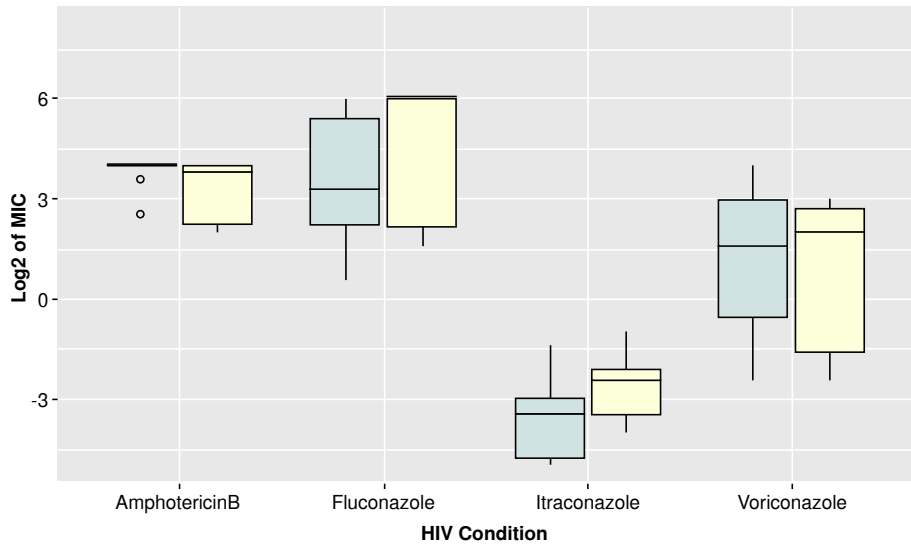


Figure 3. Comparison of binary logarithm (Log_2) of MICs for isolates grouped by HIV condition

Categorical agreement

Based on tentative epidemiological cut-off values, isolates were classified as resistant or sensitive for each antifungal and method (table 3). Amphotericin B and voriconazole could be further analyzed, as isolates are classified as resistant and others as sensitive in each case.

Fisher's exact test was performed to classify the isolates regarding their resistance to amphotericin B and voriconazole. A contingency table was built for each antifungal, and the p value was calculated. The null hypothesis of Fisher's test assumes that the classification between the two methods is not different. As a result, the obtained p values for both antifungals were higher than the significance level ($p>0.05$), concluding that the classification of the isolates as resistant and sensitive did not differ statistically between the methods.

Association with health conditions

Based on the boxplots shown in figures 3 and 4, there could be a difference between the MIC of isolates from HIV-positive and negative patients and with or without dermatitis. The median of the MIC seemed to differ for each antifungal depending on the health condition, except for amphotericin B (HIV and dermatitis) and voriconazole (dermatitis). However, the interquartile ranges looked similar for the two categories in each case except for itraconazole. Shapiro-Wilk test evidenced not normally distributed data. ($p>0.05$). Therefore, a non-parametric test was performed (WilcoxonMannWhitney) to compare category's means. The results indicated significant differences in MICs for itraconazole comparing isolates from patients with or without dermatitis (table 4).

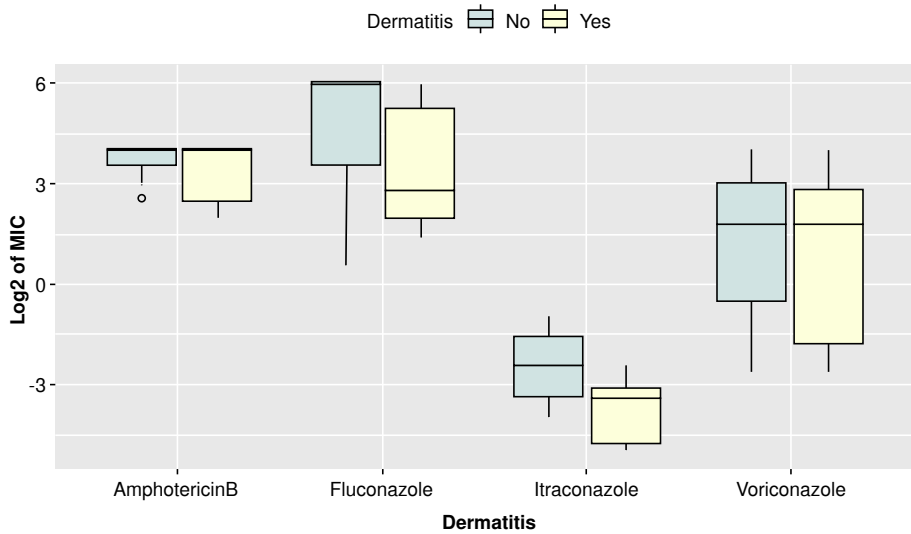


Figure 4. Comparison of binary logarithm (Log_2) of MICs for isolates grouped by the presence or absence of seborrheic dermatitis

Table 4. Results of Wilcoxon-Mann-Whitney analysis

Antifungal	HIV	Dermatitis
Amphotericin B	0.131	0.965
Fluconazole	0.498	0.176
Itraconazole	0.092	0.026
Voriconazole	0.758	0.817

Discussion

Limited data are currently available about the *Malassezia's* sensitivity profile. Here, we present some data to contribute to this field and, shortly, advance in collaborative studies to correlate these findings with the patient's outcome and detect antifungal resistance.

The results show significant variability according to the clinical condition and the type of antifungal evaluated. The isolates from patients with HIV (with or without seborrheic dermatitis) have a high resistance to fluconazole (determined by both methodologies). Isolates from patients with HIV and without seborrheic dermatitis had a high MIC for voriconazole compared to those from patients with other clinical conditions. In future studies, it will be important to clarify if this resistance may be associated with the fluconazole chronic prophylactic use in people living with HIV (37).

On the other hand, we observed that, in general, *M. furfur* isolates showed a high MIC to amphotericin B. This finding is comparable to multiple previous studies with the same *in vitro* test results (30,31,38) and congruent with the prescribed treatment against *Malassezia* fungemia based on the use of amphotericin B. Some studies suggested that this effect may be associated with drug synergism or high lipid parenteral nutrition, which could increase the *in vivo* antifungal permeability of the yeast (30,36). Most of the isolates were sensitive to itraconazole, similar to the reported results of previous reports (15,39).

For the essential agreement, amphotericin B and fluconazole exhibited the closest MICs between methods (70% and 75% of essential agreement, respectively), but they could not reach the 90% to be considered comparable. Nevertheless, other studies showed essential agreement higher than 97% using supplemented Sabouraud dextrose agar (30).

Despite not achieving this percentage in our experiment, we suggest the use of this culture medium in the Etest® as a comparative method for sensitivity assessment (30). Even so, more studies are required to confirm this. The outliers in the fluconazole group could be explained by the number of isolates in the experiment. We recommend increasing the isolates sample size in future studies.

In the case of itraconazole and voriconazole, the achieved essential agreement is far below the ideal one. For itraconazole, MICs obtained using the Etest® were, on average, higher than those with the broth microdilution method. It evidenced a slight tendency of the Etest® to overestimate itraconazole's MICs. Rhimi *et al.* reported the same finding. The authors reported a higher MIC in Etest® for the azole antifungal group, compared to the broth microdilution test using supplemented Sabouraud (30). Another study showed that in case of discrepancy between the methods, Etest® tended to yield higher MIC values (29). Likewise, this supplementation can alter the antifungal diffusion from the strip to the medium (15,29,30). For voriconazole, the tendency was the opposite: the Etest® method underestimated the resistance of *M. furfur* isolates.

Categorical agreement for fluconazole was 100%, but it does not validate the Etest® method because the taken epidemiological cut-off values for this antifungal had an extreme value (512 µg/ml) (27), so none of the isolates showed to be resistant in both cases. Determination of the categorical agreement for this antifungal agent requires an increase in the sample size that includes isolates with a wide range of MICs to differentiate resistance from sensitivity patterns.

The cut-off extreme point used for fluconazole was twice the maximum concentration evaluated in our study (512 ug/ml versus 256 µg/ml, respectively). Therefore, all our isolates apparently showed a non-resistant pattern to this antifungal. Again, due to the absence of reliable cut-off values, it is hard to define fluconazole resistance, so it will require further studies. As we mentioned, these cut-off values were taken from a previous study (27), meaning there are no official values to compare these nonconcordant results. Amphotericin B and voriconazole showed a possible categorical agreement comparing the microdilution with the Etest®, as previous studies reported (29).

Regarding the clinical condition, MICs of fluconazole, itraconazole, and voriconazole were not statistically significant for the HIV isolated strains. As for dermatitis, only fluconazole and itraconazole seemed to differ, with a higher MIC for the group without lesions. However, only itraconazole results were statistically significant. No studies have evaluated MIC in *Malassezia* isolates from HIV-positive and negative patients, but for *Candida* isolates from HIV-positive population reported an increase in MIC, possibly associated with increased exposure to antifungals as a therapeutic or prophylactic measure (40-42). According to the above, we could find significant differences with higher MICs for the isolates from HIV-positive patients in contrast with those from patients with dermatitis. However, the sample size, and the strains isolation place, among other factors (*e.g.,* prophylactic treatment with an antifungal agent), could have influenced the results.

In conclusion, none of the evaluated antifungal agents met the method verification. Amphotericin B was the only one that achieved compatibility. The results of this study with the supplemented Sabouraud medium presented reproducibility with those in previous reports (30,31,38). We found indications

of differences in resistance profiles of isolates from HIVpositive patients, but further studies are needed to increase isolates sample size and confirm the findings. Finally, considering the differences between *in vitro* results and the patient's clinical response, it is important to perform *in vivo* studies with amphotericin B in invertebrate or vertebrate models (15).

Acknowledgments

All authors acknowledge the financial support of the Vice Presidency for Research & Creation publication fund at the *Universidad de los Andes*.

References

1. Gaitanis G, Magiatis P, Hantschke M, Bassukas ID, Velegraki A. The *Malassezia* genus in skin and systemic diseases. Clin Microbiol Rev. 2012;25:106-41. https://doi.org/10.1128/CMR.00021-11
2. Velegraki A, Cafarchia C, Gaitanis G, Iatta R, Boekhout T. *Malassezia* infections in humans and animals: Pathophysiology, detection, and treatment. PLoS Pathog. 2015;11:e1004523. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004523
3. Lorch JM, Palmer JM, Vanderwolf KJ, Schmidt KZ, Verant ML, Weller TJ, *et al. Malassezia vespertilionis* sp. Nov.: A new cold-tolerant species of yeast isolated from bats. Persoonia. 2018;41:56-70. https://doi.org/10.3767/persoonia.2018.41.04
4. Saheb-Kashaf S, Proctor DM, Deming C, Saary P, Hölzer M, Taylor ME, *et al.* Integrating cultivation and metagenomics for a multi-kingdom view of skin microbiome diversity and functions. Nat Microbiol. 2022;7:169-79. https://doi.org/10.1038/s41564-021-01011-w
5. Jo JH, Deming C, Kennedy EA, Conlan S, Polley EC, Ng WI, *et al.* Diverse human skin fungal communities in children converge in adulthood. J Invest Dermatol. 2016;136:2356-63. https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.05.130
6. Rhimi W, Theelen B, Boekhout T, Otranto D, Cafarchia C. *Malassezia* spp. yeasts of emerging concern in fungemia. Front Cell Infect Microbiol. 2020;10:370. https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00370
7. Saunte DML, Gaitanis G, Hay RJ. *Malassezia*-associated skin diseases, the use of diagnostics and treatment. Front Cell Infect Microbiol. 2020;10:112. https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00112
8. Limon JJ, Tang J, Li D, Wolf AJ, Michelsen KS, Funari V, *et al. Malassezia* is associated with Crohn's disease and exacerbates colitis in mouse models. Cell Host Microbe. 2019;25:377-88. https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.01.007
9. Aykut B, Pushalkar S, Chen R, Li Q, Abengozar R, Kim JI, *et al.* The fungal mycobiome promotes pancreatic oncogenesis via activation of MBL. Nature. 2019;574:264-7. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1608-2
10. Pedrosa AF, Lisboa C, Branco J, Pellevoisin C, Miranda IM, Rodrigues AG. *Malassezia* interaction with a reconstructed human epidermis: Keratinocyte immune response. Mycoses. 2019;62:932-6. https://doi.org/10.1111/myc.12965
11. Sastoque A, Triana S, Ehemann K, Suárez L, Restrepo S, Wösten H, *et al.* New therapeutic candidates for the treatment *of Malassezia pachydermatis*-associated infections. Sci Rep. 2020;10:1-12. https://doi.org/10.1038/s41598-020-61729-1
12. Rhimi W, Theelen B, Boekhout T, Aneke CI, Otranto D, Cafarchia C. Conventional therapy and new antifungal drugs against *Malassezia* infections. Med Mycol. 2021;59:215-34. https://doi.org/10.1093/mmy/myaa087
13. Wang K, Cheng L, Li W, Jiang H, Zhang X, Liu S, *et al.* Susceptibilities of *Malassezia* strains from pityriasis versicolor, *Malassezia* folliculitis and seborrheic dermatitis to antifungal drugs. Heliyon. 2020;6:e04203. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04203
14. Ehemann K, Mantilla MJ, Mora-Restrepo F, Ríos-Navarro A, Torres, M, Celis-Ramírez AM. Many ways, one microorganism: Several approaches to study *Malassezia* in interactions with model hosts. PLoS Pathog. 2022;18:e1010784. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010784

15. Galvis-Marín JC, Rodríguez-Bocanegra MX, Pulido-Villamarín A del P, Castañeda-Salazar R, Celis-Ramírez AM, Linares-Linares MY. Actividad antifúngica *in vitro* de azoles y anfotericina B frente a *Malassezia furfur* por el método de microdilución M27-A3 del CLSI y Etest®®. Rev Iberoam Micol. 2017;34:89-93. https://doi.org/10.1016/j.riam.2016.05.004

16. Park M, Cho YJ, Lee YW, Jung WH. Genomic multiplication and drug efflux influence ketoconazole resistance in *Malassezia restricta*. Front Cell Infect Microbiol. 2020;10:191. https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00191

17. Kim M, Cho YJ, Park M, Choi Y, Hwang SY, Jung WH. Genomic tandem quadruplication is associated with ketoconazole resistance in *Malassezia pachydermatis*. J Microbiol Biotechnol. 2018;28:1937-45. https://doi.org/10.4014/jmb.1810.10019

18. Leong C, Kit JCW, Lee SM, Lam YI, Goh JPZ, Ianiri G, *et al.* Azole resistance mechanisms in pathogenic *M. furfur*. Antimicrob Agents Chemother. 2021;65:e01975-20. https://doi.org/10.1128/AAC.01975-20

19. Huang CY, Peng CC, Hsu CH, Chang JH, Chiu NC, Chi H. Systemic infection caused by *Malassezia pachydermatis* in infants: Case series and review of the literature. Pediatr Infect Dis J. 2020;39:444-8. https://doi.org/10.1097/INF.0000000000002591

20. Chen IT, Chen CC, Huang HC, Kuo KC. *Malassezia furfur* emergence and candidemia trends in a neonatal intensive care unit during 10 years: the experience of fluconazole prophylaxis in a single hospital. Adv Neonatal Care. 2020;20:e3-8. https://doi.org/10.1097/ANC.0000000000000640

21. Galvis-Marín JC, Giraldo-Ospina B, Martínez-Ríos JB, EcheverriPeláez S. Fungemia por *Malassezia sympodialis* en una unidad de cuidados intensivos neonatal de Colombia. Infectio. 2021;25:130-4. https://doi.org/10.22354/in.v25i2.931

22. Pedrosa AF, Lisboa C, Rodrigues AG. *Malassezia* infections with systemic involvement: Figures and facts. J Dermatol. 2018;45:1278-82. https://doi.org/10.1111/1346-8138.14653

23. Chen SCA, Perfect J, Colombo AL, Cornely OA, Groll AH, Seidel D, *et al.* Global guideline for the diagnosis and management of rare yeast infections: An initiative of the ECMM in cooperation with ISHAM and ASM. Lancet Infect Dis. 2021;21:375-86. https://doi.org/10.1016/s1473-3099(21)00203-6

24. Moreno-Coutiño G, Sánchez-Cárdenas CD, Arroyo-Escalante S, Arenas R. Isolation of *Malassezia* spp. in HIV-positive patients with and without seborrheic dermatitis. An Bras Dermatol. 2019;94:527-31. https://doi.org/10.1016/j.abd.2019.09.012

25. Krzyściak P, Bakuła Z, Gniadek A, Garlicki A, Tarnowski M, Wichowski M, *et al.* Prevalence of *Malassezia* species on the skin of HIVseropositive patients. Sci Rep. 2020;10:1-13. https://doi.org/10.1038/s41598-020-74133-6

26. Amado Y, Patiño-Uzcátegui A, Cepero De García MC, Tabima J, Motta A, Cárdenas M, *et al.* Seborrheic dermatitis: Predisposing factors and ITS2 secondary structure for *Malassezia* phylogenic analysis. Med Mycol. 2013;51:86875. https://doi.org/10.3109/13693786.2013.820001

27. Cafarchia C, Iatta R, Immediato D, Puttilli MR, Otranto D. Azole susceptibility of *Malassezia pachydermatis* and *Malassezia furfur* and tentative epidemiological cut-off values. Med Mycology. 2015;53:743-8. https://doi.org/10.1093/mmy/myv049

28. Cafarchia C, Figueredo LA, Iatta R, Colao V, Montagna MT, Otranto D. *In vitro* evaluation of *Malassezia pachydermatis* susceptibility to azole compounds using Etest® and CLSI microdilution methods. Med Mycol. 2012;87:795801. https://doi.org/10.3109/13693786.2012.674219

29. Álvarez-Pérez S, Blanco JL, Peláez T, Cutuli M, García ME. *In vitro* amphotericin B susceptibility of *Malassezia pachydermatis* determined by the CLSI broth microdilution method and etest using lipid-enriched media. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58:4203-6. https://doi.org/10.1128/aac.00091-14

30. Rhimi W, Aneke CI, Mosca A, Otranto D, Cafarchia C. *In vitro* azole and amphotericin B susceptibilities of *Malassezia furfur* from bloodstream infections using e-test and CLSI broth microdilution methods. Antibiotics (Basel). 2020;9:361. https://doi.org/10.3390/antibiotics9060361

31. Rojas FD, Sosa MDLA, Fernández MS, Cattana ME, Córdoba SB, Giusiano GE. Antifungal susceptibility of *Malassezia furfur*, *Malassezia sympodialis*, and *Malassezia globosa* to azole drugs and amphotericin B evaluated using a broth microdilution method. Med Mycol. 2014;52:641-6. https://doi.org/10.1093/mmy/myu010

32. Pedrosa AF, Carmen L, Faria-Ramos I, Silva R, Ricardo E, Teixeira-Santos R, *et al.* Epidemiology and susceptibility profile to classic antifungals and over-the-counter products of *Malassezia* clinical isolates from a Portuguese University Hospital: A prospective study. J Med Microbiol. 2019;68:77884. https://doi.org/10.1099/jmm.0.000966

33. Iatta R, Figueredo LA, Montagna MT, Otranto D, Cafarchia C. *In vitro* antifungal susceptibility of *Malassezia furfur* from bloodstream infections. J Med Microbiol. 2014;63:1467-73. https://doi.org/10.1099/jmm.0.078709-0

34. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. 3rd edition. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.

35. Patel JB, Sharp S, Novak-Weekley S. Verification of antimicrobial susceptibility testing methods: A practical approach. Clin Microbiol Newsl. 2013;35:103-9. https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2013.06.001

36. Iatta R, Immediato D, Montagna MT, Otranto D, Cafarchia C. *In vitro* activity of two amphotericin B formulations against *Malassezia furfur* strains recovered from patients with bloodstream infections. Med Mycol. 2015;53:269-74. https://doi.org/10.1093/mmy/my089

37. Ford N, Meintjes G, Calmy A, Bygrave H, Migone C, Vitoria M, *et al.* Managing advanced HIV disease in a public health approach. Clin Infect Dis. 2018;66:106-10. https://doi.org/10.1093/cid/cix1139

38. Velegraki A, Alexopoulos EC, Kritikou S, Gaitanis G. Use of fatty acid RPMI 1640 media for testing susceptibilities of eight *Malassezia* species to the new triazoosaconazoleole and to six established antifungal agents by a modified NCCLS M27-A2 microdilution method and Etest®. J Clin Microbiol. 2004;42:3589-93. https://doi.org/10.1128/jcm.42.8.3589-3593.2004

39. Rojas FD, Córdoba SB, Sosa MDLA, Zalazar LC, Fernández MS, Cattana ME, *et al.* Antifungal susceptibility testing of *Malassezia* yeast: comparison of two different methodologies. Mycoses. 2017;60:104-11. https://doi.org/10.1111/myc.12556

40. Ramesh N, Priyadharsini M, Sumathi CS, Balasubramanian V, Hemapriya J, Kannan R. Virulence factors and antifungal sensitivity pattern of *Candida* sp. isolated from HIV and TB patients. Indian J Microbiol. 2011;51:273-8. https://doi.org/10.1007/s12088-011-0177-3

41. Law D, Moore CB, Wardle HM, Ganguli LA, Keaney MGL, Denning DW. High prevalence of antifungal resistance in *Candida* spp. from patients with AIDS. J Antimicrob Chemother. 1994;34:659-68. https://doi.org/10.1093/jac/34.5.659

42. Osaigbovo II, Lofor PV, Oladele RO. Fluconazole resistance among oral *Candida* isolates from people living with HIV/AIDS in a Nigerian tertiary hospital. J Fungi (Basel). 2017;3:69. https://doi.org/10.3390/jof3040069

Biomédica 2023;43(Supl.1):132-43
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.6888

Artículo original

Diagnóstico micológico de paracoccidioidomicosis en un hospital de área no endémica: metodología clásica y molecular

Norma B. Fernández[1], Adriana Toranzo[2], Luciana Farias[1], Cristina E. Canteros[3]

[1] Laboratorio de Micología, Hospital de Clínicas "José de San Martín", Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina
[2] Servicio Micosis Profundas, Departamento de Micología, INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina
[3] Departamento de Micología, INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

Introducción. La paracoccidioidomicosis es una micosis sistémica y endémica en Latinoamérica. El cambio climático y el movimiento migratorio del huésped enfatizan la necesidad de optimizar el diagnóstico de esta infección.
Objetivo. Evaluar la implementación de la detección de ADN de *Paracoccidioides* spp. al diagnóstico micológico de pacientes con sospecha de paracoccidioidomicosis.
Materiales y métodos. Estudio retrospectivo con datos de laboratorio de pacientes con sospecha de paracoccidioidomicosis en un hospital de área no endémica.
Resultados. Se analizaron los resultados de las muestras de 19 pacientes con sospecha clínica de paracoccidioidomicosis. El 90 % de los pacientes había nacido o visitado un área endémica de esta micosis en Latinoamérica. En 14 pacientes varones adultos se confirmó paracoccidioidomicosis por diagnóstico convencional. El examen directo fue positivo en 12 pacientes con enfermedad comprobada y en 4 de ellos se obtuvo crecimiento del hongo. Se detectaron anticuerpos contra *Paracoccidioides* spp. en ocho pacientes con la enfermedad. Se realizó PCR anidada con muestras de 14 pacientes para detectar ADN de *Paracoccidioides* spp. En 9 de los 10 pacientes con diagnóstico convencional de paracoccidioidomicosis se obtuvo una prueba de PCR positiva.
Conclusiones. La implementación de técnicas moleculares para detectar ADN de *Paracoccidioides* spp. complementa el diagnóstico convencional de paracoccidioidomicosis y permite instaurar el tratamiento antifúngico, sobre todo en los casos clínicos donde no se observa la presencia del hongo en las muestras clínicas. La migración actual de poblaciones humanas dificulta el diagnóstico de paracoccidioidiomicosis y otras infecciones endémicas, por lo que se requiere optimizar el diagnostico micológico en los laboratorios clínicos para tratar pacientes con este tipo micosis desatendida.

Palabras clave: *Paracoccidioides;* paracoccidioidomicosis; técnicas de diagnóstico molecular; ADN; micosis.

Mycological diagnosis of paracoccidioidomycosis in a hospital from a nonendemic area: classical and molecular methods

Introduction. Paracoccidioidomycosis is a systemic mycosis endemic in Latin America. Climate change and host migration emphasize the need to optimize this infection diagnosis.
Objective. To evaluate the implementation of *Paracoccidioides* spp. DNA detection in the mycological diagnosis of patients with suspected paracoccidioidomycosis.
Materials and methods. It is a retrospective study with laboratory data from patients with clinical suspicion of paracoccidioidomycosis, who consulted a university hospital from a non-endemic area.
Results. We analyzed the laboratory results of samples from 19 patients with suspected paracoccidioidomycosis. Seventeen out of 19 patients were born in or had visited an endemic area in Latin America. Fourteen adult male patients were confirmed to have paracoccidioidomycosis by conventional diagnosis: the direct examination was positive in 12 samples while fungal growth was found only in 4. Anti-*Paracoccidioides* spp. antibodies were detected in 10 patients, 8 of them with proven paracoccidioidomycosis. Nested PCR for *Paracoccidioides* spp. detection was performed on clinical samples from 14 patients, and positive results were obtained for 9 out of 10 patients with the conventional diagnosis of paracoccidioidomycosis.
Conclusions. The incorporation of molecular techniques to detect *Paracoccidioides* spp. DNA complements the conventional diagnosis of paracoccidioidomycosis. This tool allows the prescription of antifungal treatment in those cases where the fungus is not observed in the clinical samples.

Recibido: 01/02/2023
Aceptado: 02/05/2023
Publicado: 05/05/2023

Citación:
Fernández NB, Toranzo A, Farias L, Canteros CE. Diagnóstico micológico de paracoccidioidomicosis en un hospital de área no endémica: metodología clásica y molecular. Biomédica. 2023;43(Supl.1):132-43. https://doi.org/10.7705/biomedica.6888

Correspondencia:
Norma B. Fernández, Laboratorio de Micología, Hospital de Clínicas "José de San Martín", Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina
Teléfono: (54 11) 3448 0263
normafer38@gmail.com

Contribución de los autores:
Todos los autores participaron en todas las etapas del estudio.

Financiación:
Este trabajo no cuenta con financiación.

Conflicto de intereses:
Ninguno para declarar.

Current human migrations difficult the mycological diagnosis of paracoccidioidomycosis and other fungal infections. For this reason, it is necessary to improve mycological diagnosis in clinical laboratories to adequately treat patients with this neglected mycosis.

Keywords: *Paracoccidioides*; paracoccidioidomycosis; molecular diagnostic techniques; DNA; mycoses.

La paracoccidioidomicosis es una micosis endémica y sistémica, de distribución geográfica limitada a Latinoamérica, producida por especies de *Paracoccidioides*. Se considera una enfermedad desatendida, cuyo verdadero impacto está poco definido debido a la falta de datos de su incidencia real. Probablemente esto se deba a los pocos estudios epidemiológicos que discuten las formas clínicas, las manifestaciones relacionadas con la diversidad filogenética de las especies, la escasez de diagnóstico oportuno y la falta del reporte obligatorio de casos al sistema de salud regional (1-3).

Durante el 2022, *Paracoccidioides* spp. fue incorporado por la Organización Mundial de la Salud a la lista de agentes patógenos de prioridad moderada para fomentar su investigación y acciones en salud pública (4).

El diagnóstico de paracoccidioidiomicosis se basa en los hallazgos clínicos, epidemiológicos y de laboratorio. Es importante hacer el diagnóstico diferencial de esta micosis con otras enfermedades que presentan características clínicas similares y que en algunos casos se presentan como coinfecciones (5-7). La detección del ADN de *Paracoccidioides* spp. brinda resultados rápidos y precisos, y podría incorporarse como herramienta diagnóstica al laboratorio de micología clínica (8).

Antecedentes epidemiológicos, clínicos y de laboratorio

La paracoccidioidomicosis fue reconocida en 1908 como una enfermedad mucocutánea crónica. En 1928, en Brasil, se denominó al agente etiológico de esta enfermedad como *Paracoccidioides* y en 1930 como *Paracoccidioides brasiliensis*. Durante ese año, en Argentina, Pablo Negroni reportó 50 pacientes con paracoccidioidomicosis y demostró *in vitro* el dimorfismo de este hongo. Desde entonces se reportan casos de paracoccidioidomicosis en Latinoamérica, principalmente en Brasil, Colombia, Argentina, México, Paraguay, Bolivia, Ecuador, Venezuela y Perú. (9-12).

En las últimas décadas, se observaron cambios en las características demográficas y la distribución geográfica de la paracoccidioidomicosis. Estos cambios podrían atribuirse al impacto de factores ambientales tales como el cambio climático, la tala de bosques, el aumento de la producción de diversos cultivos en Latinoamérica, la expansión de los asentamientos urbanos y la urbanización de áreas rurales y la presencia de comorbilidades e inmunosupresión de la población, todo esto sumado a la optimización de los métodos de diagnóstico micológico (13,14).

En Latinoamérica, Brasil se destaca por reportar el 80 % de los casos de paracoccidioidomicosis, con una incidencia anual estimada de 3 a 4 casos por millón de habitantes (9); y en áreas hiperendémicas, de 90 a 400 casos por millón de habitantes. En el estado de Rondônia, se reportaron 52,7 casos por año, y en la cuenca de Tocantins-Araguaia, 47,1 casos por año. (15-20).

En Argentina, el área endémica de paracoccidioidomicosis está localizada al norte del paralelo 34° S. En el noreste se registra el 85 % de los casos y en el noroeste, los casos restantes. Luego de la construcción de la represa hidroeléctrica Yaciretá, en el 2009, en el noreste del país se alteraron las

condiciones ecológicas del valle del río Paraná. Esto se tradujo en cambios climáticos y antropogénicos que impactaron las tasas de paracoccidioidomicosis de los habitantes de la región, en especial, la de la forma infanto-juvenil diagnosticada en el 26 % de los casos de la región norte del país. (1,15,21).

En zonas geográficas no endémicas de América, como también fuera del continente, se reportan casos en personas que nacieron, habitaron o visitaron zonas endémicas (22).

En la naturaleza, *Paracoccidioides* spp. se desarrolla como micelio y produce conidias infectantes que son transportadas por el aire después de la remoción de suelos. Estas conidias llegan a los alvéolos pulmonares del huésped susceptible y se convierten en estructuras levaduriformes, que pueden permanecen en los ganglios linfáticos y pulmonares. Las lesiones primarias pueden subsistir silenciosas durante muchos años y progresar en los pulmones o diseminarse por vía linfohematógena (5).

Las manifestaciones clínicas de la forma progresiva crónica de paracoccidioidomicosis ocurre en adultos, principalmente en hombres entre los 30 y los 50 años, que realizan actividades rurales. Ocasionalmente, en personas que vivieron o visitaron áreas endémicas de paracoccidioidomicosis. Se inicia como una neumonitis que puede extenderse por el sistema linfático a los ganglios, donde a menudo forma granulomas. Puede convertirse en una enfermedad latente, de evolución lenta y progresiva a lo largo de meses o años, capaz de reactivarse con manifestaciones unifocales o multifocales (2).

Una disminución de la respuesta inmune puede provocar la reactivación del microorganismo y la diseminación hematógena a diferentes tejidos y órganos. Los síntomas iniciales de la reactivación son inespecíficos. Las lesiones mucocutáneas con frecuencia son el motivo por el que los pacientes buscan atención médica (16,19) y se presentan como estomatitis ulcerosa.

Otros síntomas como la ronquera, la odinofagia, la disfagia, la faringitis, la disnea y las lesiones periodontales son manifestaciones clínicas prevalentes. Los pacientes también pueden presentar pérdida de peso, anorexia, tos, lesiones ulceradas en la orofaringe, y compromiso cutáneo, linfático, neurológico y suprarrenal (2,9,16,19).

Actualmente, se reconoce que el género *Paracoccidioides* es un complejo de especies filogenéticas: *P. brasiliensis sensu stricto* (S1), *P. americana* (PS2), *P. restrepiensis* (PS3), *P. venezuelensis* (PS4) y *P. lutzii.* La especie *P. brasiliensis* predomina en Brasil y Paraguay. En Argentina, las especies circulantes son *P. brasiliensis, P.restrepiensis* y *P. americana*. Recientemente, se describieron dos nuevas especies, no cultivables y asociadas a micosis subcutánea: *P. loboi* y *P. cetti*. (Teixeira MM, Cattana ME, Doyle A, Barker BM, Litvintseva A, Sosa MA, *et al*. Whole genome sequencing typing suggests multiple *P. brasiliensis* dispersion events into endemic areas of paracoccidioidomycosis in Argentina and Paraguay. 29º Congresso Brasileiro Microbiologia - CBM 2017- XIII International Meeting on Paracoccidioidomycosis, Foz de Iguazú, Parana, Brazil, 22-25 de octubre de 2017) (19,21,23-26).

Todas las especies del género se caracterizan por desarrollar, tanto en la naturaleza (15-30 °C), como *in vitro* (28 °C), un micelio hialino y tabicado con clamidioconidias y, raramente, conidias menores de 5 µm, llamadas

propágulos. A temperaturas de 35 a 37 °C, en cultivos *in vitro* o en los tejidos del huésped susceptible, los propágulos se transforman en levaduras, multigemantes o no, de tamaño variable (4-40 µm) (1). La investigación sobre el dimorfismo térmico de *Paracoccidioides* spp. permitió comprender la versatilidad y la interacción entre las células fagocíticas del huésped y las conidias de este agente patógeno (27).

Diagnóstico

Se define como criterio diagnóstico de caso probado todo paciente con manifestaciones clínicas compatibles con paracoccidioidomicosis e identificación de hongos levaduriformes, correspondientes a *Paracoccidioides* spp., en las muestras clínicas evaluadas mediante examen microscópico directo, con coloraciones o sin ellas, o recuperación del hongo en cultivo.

Por su parte, se establece caso probable cuando las manifestaciones clínicas del paciente son compatibles con paracoccidioidomicosis y presenta anticuerpos séricos específicos. En estos casos puede haber exposición previa al hongo teniendo en cuenta antecedentes de residencia, viaje a una zona geográfica endémica o excepcionalmente al contacto con fómites, como tierra o vegetación, procedentes de dichas zonas (19).

En el examen directo de las muestras clínicas se presenta *Paracoccidioides* spp. como una levadura con gemaciones simples o múltiples (forma parasitaria). En el examen microscópico de los cultivos (18-24 °C) idealmente se observa la forma típica de hifas hialinas tabicadas con microconidias tipo aleurioconidias, y ocasionalmente, clamidoconidias luego de 14 y hasta 40 días de incubación.

La observación microscópica de los exámenes directos requiere una buena calidad del espécimen clínico y un observador entrenado, en tanto que el cultivo requiere tiempo para identificar al hongo.

La detección de anticuerpos de *Paracoccidioides* spp. por técnicas serológicas presenta dificultades en cuanto a la falta de protocolos unificados y estandarizados para la producción de antígenos y antisueros. Actualmente, se reconoce que las diferentes especies del género *Paracoccidioides* pueden presentar antígenos inmunodominantes diferentes. Gp43, de 43 kDa, es el principal antígeno específico de superficie utilizado en pruebas serológicas que tienen una sensibilidad entre el 85 y el 100 %. Sin embargo, se han informado falsos negativos en pacientes infectados con *P. lutzii,* probablemente, por cambios genéticos de la especie que disminuyen la expresión de *gp43*, así como resultados falsos positivos por reacciones cruzadas con otros hongos (28-31).

Estas dificultades hacen que sea necesario incorporar técnicas moleculares, que complemenenten el diagnóstico micológico convencional, para identificar las especies de *Paracoccidioides* a partir de cultivos y detectar la presencia de ADN del género en los especímenes clínicos. A partir de muestras clínicas se utilizan: reacción en cadena de la polimerasa (PCR) simple, PCR doble, PCR anidada o semianidada, PCR en tiempo real (qPCR) y amplificación isotérmica mediada por bucles (LAMP).

Diferentes autores han llevado a cabo experimentos con PCRs anidada y semianidada para amplificar regiones espaciadoras internas transcritas (*Internal Transcribed Spacer,* ITS) y *gp43*, a partir de muestras clínicas, y han logrado buena sensibilidad y especificidad. Bialek *et al*. desarrollaron una PCR anidada para detectar *P. brasiliensis* mediante la amplificación de una

región de *gp43.* Esta se evaluó con muestras de cultivos y tejidos de ratones infectados y obtuvieron alta especificidad analítica (32). Otros autores evaluaron esta PCR sobre muestras clínicas frescas o parafinadas para el diagnóstico de paracoccidioidomicosis (33,34).

En el presente trabajo demostramos que la detección de ADN de *Paracoccidioides* spp. en una PCR anidada, complementó el diagnóstico convencional de laboratorio de paracoccidioidomicosis en un hospital general fuera del área endémica (31).

El objetivo de este trabajo fue implementar la detección de ADN de *Paracoccidioides* spp. en el diagnóstico micológico convencional de pacientes con sospecha de paracoccidioidomicosis, atendidos en un hospital universitario de un área no endémica de esta micosis.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio retrospectivo con los datos del laboratorio de micología de un hospital universitario ubicado en la ciudad de Buenos Aires (Argentina) desde enero de 2015 hasta diciembre de 2022. Se incluyeron los resultados del examen directo, el cultivo, el serodiagnóstico por inmunodifusión y la detección de ADN de *Paraccoccidiode*s spp. de muestras de pacientes con sospecha clínica de paracoccidioidomicosis.

Se recolectaron los datos demográficos: edad, sexo, lugar de nacimiento y de residencia al momento de la consulta. Las muestras clínicas fueron procesadas para la observación del examen directo por microscopía y el cultivo según el procedimiento establecido por el Laboratorio de Micología del Hospital de Clínicas “José de San Martín” de la Universidad de Buenos Aires.

El examen se realizó con muestras en fresco, coloreadas con tinción de Giemsa y observadas con microscopia a 40 y 100 aumentos. Se sembraron dos juegos de tubos con agar Saboraud, Mycosel™ e infusión cerebro-corazón. Uno de los juegos se incubó a 28 °C y el otro a 37 °C durante 40 días. Se realizó la prueba de inmunodifusion en muestras de suero para detectar la presencia de anticuerpos anti- *Paracoccidioides* spp., con antígeno y antisuero control de la cepa *P. brasiliensis* B339, provistos por el Laboratorio Nacional de Referencia en Micología Clínica, Departamento de Micología del INEI - ANLIS “Carlos G. Malbrán”.

La extracción y la detección del ADN de *Paracoccidioides* spp. a partir de las muestras clínicas, se realizaron en el Servicio de Micosis Profundas del Departamento de Micología del INEI - ANLIS “Carlos G Malbrán”. En resumen, la extracción se realizó con el kit comercial, DNeasy Blood & Tissue Kit™ (QIAGEN) y la proteinasa K (QIAGEN), según instrucciones del fabricante, previo tratamiento de la muestra con liticasa, para degradación efectiva de la pared celular, y enzima proteolítica proveniente de *Thrichoderma harzianum*.

La detección de ADN de *Paracoccidioies* spp. se realizó por la técnica de PCR anidada, descrita por A. Bialek *et al*. (32), que amplifica un fragmento de 196 pares de bases del gen *gp43.* Esta prueba se llevó a cabo en el laboratorio de Micosis Profundas del Laboratorio Nacional de Referencia “Dr. Carlos G. Malbrán”.

Resultados

En esta revisión, 9 de los 10 pacientes con paracoccidioidomicosis residentes en Argentina provenían o habían visitado zonas endémicas: seis provenían de países sudamericanos y para los tres restantes no se pudo determinar la procedencia geográfica. Solo un paciente, residente de la Provincia de Buenos Aires, expresó no haber visitado ninguna área endémica.

En el lapso de ocho años, se analizaron en el Laboratorio de Micología del Hospital de Clínicas 37 muestras clínicas con sospecha clínica de paracoccidioidomicosis de 19 pacientes adultos (17 hombres y 2 mujeres). Los pacientes habían nacido o habitaban, al momento de la consulta, en la región noreste de Argentina (8), Buenos Aires (2) Paraguay (3), Bolivia (1) y Perú (2). Tres pacientes no reportaron estos datos.

Las muestras procesadas fueron: ocho raspados de mucosa oral, ocho biopsias de laringe, cinco biopsias de piel, tres raspados de mucosa nasal, diez muestras respiratorias (lavado bronquial, lavado broncoalveolar, biopsia transbronquial, esputo), dos biopsias de ganglio y una biopsia de glándula suprarrenal. Se buscaron anticuerpos contra *Paracoccidioides* spp. en 15 sueros usando la técnica de inmunodifusión.

Se diagnosticó paracoccidioidomicosis en 12 de los 19 pacientes, con dos probables casos adicionales. Estos 14 pacientes con paracoccidioidomicosis probada y probable fueron hombres adultos con edad promedio de 53 años (rango: 23 a 72).

La observación microscópica directa evidenció levaduras multigemantes típicas, sugestivas de *Paracoccidioides* spp., en muestras de 11 pacientes y levaduras con morfologías aberrantes en un paciente (35). El hongo solo pudo ser recuperado en 4 de 12 pacientes con microscopía positiva; en uno de los cultivos se desarrolló la fase levaduriforme a 37 °C, mientras que en los otros tres se desarrolló la fase micelial a 28 °C. El serodiagnóstico detectó anticuerpos anti-*Paracoccidioides* spp. en ocho pacientes con paracoccidioidomicosis probada y en los dos pacientes con paracoccidioidomicosis probable (exámenes directos y cultivos negativos). Un paciente con examen directo positivo, en fresco y por observación histológica, no mostró anticuerpos anti-*Paracoccidioides* (cuadro 1).

En las muestras clínicas de 14 de los 19 pacientes se realizó PCR anidada para detectar ADN de *Paracoccidioides* spp. En 8 de los 9 pacientes con paracoccidioidomicosis probada, la PCR fue positiva, al menos, en una de las muestras clínicas, mientras que solo uno de los casos de paracoccidioidomicosis probable tuvo PCR positiva. Los cuatro pacientes restantes tuvieron resultados negativos en todas las pruebas realizadas y no se pudo diagnosticar paracoccidioidomicosis.

Discusión

La paracoccidioidomicosis es una de las micosis endémicas más frecuentes en Latinoamérica y se caracteriza por un largo periodo de latencia (2,15,16). En área no endémica, como la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, se reportaron casos de paracoccidioidomicosis de pacientes que vivieron o visitaron un área endémica y desarrollaron formas progresivas de la enfermedad. (1,36,37).

Cuadro 1. Diagnóstico micológico de muestras clínicas de pacientes con sospecha de paracoccidioidomicosis

Paciente	Procedencia	Muestras	Examen directo	Histología	Cultivo	Serología	PCR	Paracoccidioidomicosis
1	Paraguay	Glándula suprarrenal, suero	LcP	NR	Positivo	Positiva	Positiva	Probada
2	Misiones	Suero	NR	NR	NR	Positiva	NR	Probable
3	Buenos Aires	Ganglio	Negativo	NR	Negativo	NR	Negativa	Negativa
4	Paraguay	Laringe, suero	Negativo	NR	Negativo	Positiva	Positiva	Probable
5	Misiones	Laringe	LcP	NR	Negativo	NR	Positiva	Probada
6	Entre Ríos	Esputo, suero	LcP	NR	Negativo	Positiva	Positiva	Probada
7	Misiones	Laringe, Paladar, suero	La	Positiva	Positivo	Positiva	Positiva	Probada
8	Paraguay	Piel	LcP	NR	Negativo	NR	Positiva	Probada
9	Buenos Aires	Laringe, suero	LcP	NR	Positivo	Positiva	Positiva	Probada
10	SD	Laringe, suero	Negativo	NR	Negativo	Negativa	Negativa	Negativa
11	Bolivia	Laringe, LB, suero	LcP	NR	Negativo	Positiva	Positiva	Probada
12	Chaco	Mucosa oral, suero	LcP	NR	Negativo	Positiva	NR	Probada
13	SD	Mucosa nasal, suero	Negativo	NR	Negativo	Negativa	NR	Negativa
14	Perú	Piel, suero	Negativo	Negativa	Negativo	Negativa	Negativo	Negativa
15	Formosa	Paladar	LcP	Positiva	Negativo	NR	NR	Probada
16	Entre Ríos	Piel, suero	Negativo	NR	Negativo	Negativa	Negativa	Negativa
17	Perú	Paladar, suero	LcP	Positiva	Negativo	Negativa	Negativa	Probada
18	Chaco	Mucosa oral, suero	LcP	Positiva	Negativo	Positiva	NR	Probada
19	Buenos Aires	Piel, BAL, suero	LcP	Positiva	Positivo	Positiva	Positiva	Probada

NR no remitida; BAL: lavado broncoalveolar; LB: lavado bronquial. LcP: levaduras compatibles con *Paracoccidioides* spp
La: levaduras atípicas. SD: sin datos

En un trabajo previo en el Hospital de Clínicas de la Universidad de Buenos Aires, con más de 350.000 consultas externas por año, se atendieron 18 pacientes adultos varones con paracoccidioidomicosis entre el 2002 y el 2017. El 61 % de estos pacientes provenía de área endémica, el 33,3 % había nacido en área endémica y migrado años atrás (entre 11 a 45 años) a Buenos Aires, y un paciente de la provincia de Buenos Aires manifestó no haber estado en área endémica (Fernández NB, Canteros C, Farias l, Toranzo A, Tiraboschi N, Stecher D. Paracoccidioidomicosis in a universitary hospital of Buenos Aires city. P092. 20th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. June 30 - July 4, 2020. Amsterdam, The Netherlands. https://doi.org/10.1093/mmy/myy036).

Todos los pacientes diagnosticados con paracoccidioidomicosis provenían de las áreas endémicas de Argentina y del resto de Sudamérica, excepto el paciente mencionado, residente de la Provincia de Buenos Aires, que manifestó nunca haber visitado las áreas endémicas del hongo. Entre el 2002 y el 2004, un estudio piloto realizado en zonas colindantes con el río Riachuelo, que limita el sur de la capital de Argentina, se identificaron dos sueros con anticuerpos anti-*Paracoccidioides* spp. en 141 perros estudiados. Los perros difícilmente se trasladan fuera de su lugar de nacimiento, por lo que de manera indirecta se registró la presencia del hongo en la zona (Canteros C., comunicación personal). Es probable que el área endémica de paracoccidioidomicosis se pueda estar extendiendo a zonas más australes de Argentina. Sin embargo, esto requiere la confirmación mediante estudios epidemiológicos y de detección de casos autóctonos.

El diagnóstico de paracoccidioidomicosis requiere un análisis crítico por parte de microbiólogos y clínicos, ya que no todas las pruebas diagnósticas están disponibles en los laboratorios de micología clínica en Latinoamérica. En una encuesta realizada por D. Falci *et al.,* en 2018, entre laboratorios de la región y otros países de Latinoamérica (Brasil: 74 %; otros países, 26 %), se destacó que solo el 68 % de ellos hace observación microscópica (tratamiento con hidróxido de potasio) de las muestras clínicas, el 47 % de los centros realiza o deriva la detección serológica de

anticuerpos contra *Paracoccidioides* spp. y muy pocos laboratorios utilizan herramientas moleculares para el diagnóstico de patógenos fúngicos; de ellos, el 59 % remite las muestras centros de referencia (38). Esta situación complica la capacidad de diagnosticar y tratar a los individuos con paracoccidioidomicosis, sumado a que el estado inmunológico del paciente y la manifestación de la enfermedad influyen en la eficacia del diagnóstico.

Los reportes de los resultados del examen directo de muestras de pacientes con paracoccidioidomicosis de áreas endémicas tienen sensibilidad variable. En un estudio de casos entre 1974 y 2008 en Botacatu, Brasil, se encontró que el 86 % de los exámenes directos fue positivo (345/401), mientras que, en otra área endémica, en el estado de Espirito Santo, entre 1978 y 2012, solo se hallaron levaduras sugestivas de *Paracoccidioides* spp. en el 30,7 % (168/546) de las muestras analizadas por examen directo (5,7,39).

En nuestro estudio, 12 de los 14 (85,7 %) pacientes con paracoccidioidomicosis fueron diagnosticados por examen directo en fresco, por estudios histológicos o ambos; en los dos pacientes restantes, no se observó el hongo en las muestras clínicas. Esto probablemente se deba a limitaciones en la toma de la muestra o a la baja carga fúngica. Una de las desventajas de la observación directa es que requiere, además de la experiencia del operador, muestras clínicas representativas y abundantes para poder observar las estructuras características de *Paracoccidioides* spp.

Otra dificultad en el diagnóstico de paracoccidioidomicosis es el difícil crecimiento de *Paracoccidioides* spp. *in vitro* y la probabilidad de contaminación por otros microorganismos de crecimiento más rápido, lo que hace que la recuperación en cultivo sea muy baja.

La temperatura es otro factor importante: aunque *Paracoccidioides* spp. puede crecer a 37 °C, esta no es su temperatura óptima de crecimiento sino de 25 a 30 °C, después de 2-3 semanas de incubación (5). También es importante considerar el uso de medios de cultivos específicos, como agar hecho con infusión cerebro corazón o con medio FavaNetto, que mejoran el rendimiento del cultivo. Por ejemplo, Hahn *et al*. obtuvieron un rendimiento del 97,1 % para el aislamiento de *P. lutzii* frente al 88,2 % de positividad en el examen micológico directo, utilizando estos medios de cultivos específicos (19). También Gonçalves Pinheiro *et al*. (2020) observaron una sensibilidad entre el 86 y el 100 % en los cultivos hechos a partir de muestras respiratorias y tejidos utilizando medio Fava-Netto (30). En nuestro trabajo, el hongo creció a partir de las muestras clínicas de cuatro (28,6 %) pacientes con paracoccidioidomicosis probada, probablemente varios de los factores enumerados estén relacionados con la baja recuperación del agente y, sobre todo, el hecho de que el medio enriquecido de Fava-Netto no se utiliza en la rutina de nuestro laboratorio.

Si bien el serodiagnóstico es una prueba clásica complementaria, esta posee una alta sensibilidad en el diagnóstico de paracoccidioidomicosis. En nuestro análisis, 10 de 11 pacientes con paracoccidioidomicosis probada o probable tuvieron anticuerpos contra el microorganismo. En dos pacientes con epidemiología y clínica compatible con paracoccidioidomicosis no se pudo observar el hongo, ni se obtuvo crecimiento en los medios de cultivo, pero la serología dio positiva. Inclusive, en uno de estos dos pacientes, se detectó ADN de *Paracoccidioides* spp.

Se evaluaron diferentes PCR para la detección de ADN de *Paracoccidioides* spp. Buitrago *et al*. utilizaron una PCR en tiempo real con ITS1 rDNA como blanco de amplificación, a partir de suero, sangre, esputo y biopsia de dos pacientes de áreas no endémicas (40). Rocha-Silva *et al.* realizaron una PCR en tiempo real amplificando una región del gen *pb27,* obteniendo alta sensibilidad y especificidad al evaluar el ADN contenido en muestras de sangre, suero, biopsia y lavado broncoalveolar (41). En 2022, A. Krakhecke-Teixeira *et al*. detectaron ADN de *Paracoccidioides* spp. mediante la amplificación por PCR en tiempo real de fragmentos del gen *gp43* y *hsp70* en 37 muestras biológicas (esputo, lavado broncoalveolar y muestras de tejido) (20).

La técnica molecular LAMP también ha sido analizada por otros autores, quienes amplificaron como blanco un fragmento del gen *gp43* a partir de muestras clínicas (42-44).

Pinheiro *et al*. (2021) evaluaron una PCR dúplex para diferenciar el complejo *P. brasiliensis* de *P. lutzii.* Los investigadores obtuvieron un límite de detección de 1 pg de ADN de *Paraccocidiodes* spp. y 100 % de especificidad, sin reacción cruzada con otros hongos patógenos (28).

En nuestro trabajo se utilizó una PCR anidada descrita por Bialek *et al*. (32) que dio resultado positivo en el 88,9 % de los casos de paracoccidioidomicosis probada y en uno de los casos probables. La detección de ADN de *Paracoccidioides* spp. permitió confirmar las morfologías atípicas observadas en el paciente 7, que luego fueron corroboradas por aislamiento del hongo, y complementar el diagnóstico con la serología positiva. Las formas atípicas o aberrantes fueron descritas por Restrepo en el 2000 para determinar si la morfología fúngica en los tejidos podría ser indicador de la viabilidad de las células de levadura de *P. brasiliensis* (35); de igual manera, en el paciente 4, la PCR positiva complementó el serodiagnóstico positivo. En estos dos pacientes, definidos como paracoccidioidomicosis probable, puede que la escasa cantidad de carga fúngica en las muestras dificultara la observación microscópica.

En el paciente 11 se detectó ADN de *Paracoccidioides* spp. en una muestra respiratoria en fresco y en una biopsia parafinada de glotis. Cabe señalar que la detección de ADN a partir de tejido fijado e incluido en parafina es útil cuando el material no llega al laboratorio de micología para realizar examen directo y siembra de este, por lo cual, la PCR complementó el resultado de las técnicas histológicas.

En la PCR utilizada en este trabajo, amplificamos una región del gen *gp43* que codifica para una glicoproteína expresada por *Paracoccidioid*es spp. Sin embargo, se conoce que existen diferencias epigenéticas entre las especies del complejo que pueden afectar el resultado de la PCR (falsos negativos) (33,34). Si bien la PCR demostró ser sensible y específica para el diagnóstico, al encontrarnos en un área no endémica, con amplio movimiento migratorio de población proveniente de áreas endémicas para *Paracoccidioides* spp., deberíamos incluir otros sitios blanco para poder detectar las distintas especies del género y mejorar la sensibilidad diagnóstica. Es importante recalcar que la toma de la muestra, su calidad, su adecuado transporte y su conservación son importantes en el laboratorio para aumentar la sensibilidad y especificidad diagnóstica.

En nuestro estudio retrospectivo, la implementación de una PCR anidada para detectar ADN de *Paracoccidioides* spp. complementó el diagnóstico convencional de paracoccidioidomicosis. Esta técnica molecular permitió demostrar la presencia del hongo cuando el examen directo fue negativo, cuando las estructuras microscópicas no fueron las esperadas o se necesitó esperar el tiempo del crecimiento fúngico para confirmar paracoccidioidomicosis, mejorando el diagnóstico micológico.

Hasta el momento solo se han evaluado unos pocos métodos moleculares *in house* sobre muestras clínicas que deberían continuar estudiándose, teniendo en cuenta la diversidad genética de las diferentes especies circulantes de *Paracoccidioides* spp. en la región.

La migración actual de poblaciones humanas por diversos motivos es un reto para el sistema de salud pública en Latinoamérica, que requerirá el acompañamiento de políticas públicas para atender una de las micosis desatendidas más prevalentes.

Referencias

1. Canteros CE. Paracoccidioidomicosis: crónica de una enfermedad olvidada. Medicina. 2018;78:180-4.
2. Queiroz-Telles F, Hassan Fahal A, Falci D, Cáceres DH, Chiller T, Pasqualotto A. Neglected endemic mycoses. Lancet Infect Dis. 2017;17. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30306-7
3. Fernández NB, Davel G. Micosis de declaración obligatoria: utopía o realidad. Una cuestión olvidada por resolver. Rev Arg Microbiol. 2019;51:101-2. https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.04.001
4. World Health Organization. WHO fungal priority pathogens list to guide research development and public health action. Geneva: World Health Organization; 2022. Fecha de consulta: 8 de enero de 2023. Disponible en https://www.who.int/publications/i/item/9789240060241
5. Zancope-Oliveira RM, Pizzini CV, de Medeiros MM, Valle ACDF, AlmeidaPaes R. Diagnostic aspects of paracoccidioidomycosis. Curr Trop Med Rep. 2014;1:111-8. https://doi.org/10.1007/s40475-014-0022-y
6. Montalvo R, Díaz A, Montalvo J, Pomazongo M, Montalvo M, Tunque E. Disseminated paracoccidioidomycosis associated with lymph node tuberculosis in a non-immunocompromised child. IDCases. 2022;29:e01507. https://doi.org/10.1016/j.idcr.2022.e01507
7. Peçanha PM, Batista ME, Massaroni MA, Schmidt EB, Lamas M, Zanotti RL, *et al.* Paracoccidioidomycosis: Epidemiological and clinical aspects in 546 cases studied in the State of Espírito Santo, Brazil. Am J Trop Med Hyg. 2017;97:836-44. https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0790
8. Gómez BL. Molecular diagnosis of endemic and invasive mycoses: Advances and challenges. Rev Iberoam Micol. 2014;31:35-41. https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.09.009
9. Martínez R. Epidemiology of paracoccidioidomicosis. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2015;57 (Suppl. 19):S11-20. https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000700004
10. Olivero R, Domínguez A, Sánchez C, Di-Liberti D. Diagnóstico de paracoccidioidomicosis en el Laboratorio de Micología de la Universidad de Carabobo durante 14 años (1992-2005). Rev Soc Ven Microbiol. 2007;27:349-63.
11. López-Martínez R, Hernandéz-Hernandéz F, Mendez-Toiar LJ, Manzano-Gayosso P, Bonifaz A, Arenas R, *et al.* Paracoccidioidomycosis in Mexico: Clinical and epidemiological data from 93 new cases (1972-2012). Mycoses. 2014;57:525-30. https://doi.org/10.1111/myc.12190
12. Torrado E, Castañeda E, de la Hoz F, Restrepo A. Paracoccidioidomicocis: definición de las áreas endémicas de Colombia. Biomédica. 2000;20:327-34. https://doi.org/10.7705/biomedica.v20i4.1076

13. Arenas Guzmán R, Torres Guerrero E. Paracoccidioidomicosis. En: *Micología médica ilustrada. 6 edición.* McGraw Hill; 2020. Fecha de consulta: 8 de enero de 2023. Disponible en: https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2791&sectionid=234860916.

14. Restrepo A, Mc Ewen JG, Castañeda E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: How far from solving the riddle? Med Mycol. 2001;39:233-41. https://doi.org/10.1080/mmy.39.3.233.241

15. Colombo AL, Tobón A, Restrepo A, Queiroz-Telles F, Nucci M. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. Med Mycol. 2011;49:785-98. https://doi.org/10.3109/13693786.2011.577821

16. Shikanai-Yasuda MA, Mendes RP, Colombo AL, de Queiroz-Telles F, Kono AS, Paniago AM, *et al*. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. Rev Soc Brasil Med Trop. 2017;50:715-40. https://doi.org/10.1590/0037-8682-0230-2017

17. de Almeida JN Jr, Peçanha-Pietrobom PM, Colombo AL. Paracoccidioidomycosis in immunocompromised patients: a literature review. J Fungi (Basel). 2018;5:2. https://doi.org/10.3390/jof5010002

18. Lockhart SR, Toda M, Benedict K, Caceres DH, Litvintseva AP. Endemic and other dimorphic mycoses in the Americas. J Fungi. 2021;7:151. https://doi.org/10.3390/jof7020151

19. Hahn RC, Hagen F, Mendes RP, Burger E, Nery AF, Siqueira NP, *et al*. Paracoccidioidomycosis: Current and future trends. Clin Microbiol Rev. 2022;35:e0023321. https://doi.org/10.1128/cmr.00233-21

20. Krakhecke-Teixeira AG, Yamauchi DH, Rossi A, de Sousa HR, Graces HG, Júnior JL, *et al*. Clinical and eco-epidemiological aspects of a novel hyperendemic area of Paracoccidioidomycosis in the Tocantins-Araguaia Basin (Northern Brazil), caused by *Paracoccidioides* ssp. J Fungi (Basel). 2022;8:502. https://doi.org/10.3390/jof8050502

21. Giusiano G, Aguirre C, Vratnica C, Rojas F, Corallo T, Cattana ME, *et al*. Emergence of acute/subacute infant-juvenile paracoccidioidomycosis in Northeast Argentina: Effect of climatic and anthropogenic changes? Med Mycol. 2019;57:30-7. https://doi.org/10.1093/mmy/myx153

22. Buitrago MJ, Cuenca-Estrella M. Epidemiologia actual y diagnóstico de laboratorio de las micosis endémicas en España. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2012:30:407-13. https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.09.014

23. Matute DR, Sepúlveda VE, Quesada LM, Goldman GH, Taylor JW, Restrepo A, *et al*. Microsatellite analysis of three phylogenetic species of *Paracoccidioides brasiliensis*. J Clin Microbiol. 2006;44:2153-7. https://doi.org/10.1128/JCM.02540-05

24. Turissini DA, Gómez OM, Teixeira MM, McEwen JG, Matute DR. Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides.* Fungal Genet Biol. 2017;106:925. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2017.05.007

25. Rodríguez AM, Hagen F, Puccia R, Hahn RC, Pires de Camargo Z. *Paracoccidioides* and paracoccidioidomicosis in the 21st century. Mycopathologia. 2023;188:129-33. https://doi.org/10.1007/s11046-022-00704-y

26. Mavengere H, Mattox K, Teixeira MM, Sepúlveda VE, Gómez OM, Hernández O, *et al*. Paracoccidioides genomes reflect high levels of species divergence and little interspecific gene flow. mBio. 2020;11:e019920. https://10.1128/mBio.01999-20

27. Restrepo A, Cano LE, Gonzalez Á. The power of the small: The example of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2015;57 (Suppl. 19):S5-10. https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000700003

28. Pinheiro BG, Possa AP, Della PP, de Carvalho JA, Ricci G, Nishikaku, AS, *et al*. A new duplex PCR-assay for the detection and identification of *Paracoccidioides* species. J Fungi. 2021;7:169. https://doi.org/10.3390/jof7030169

29. Griffiths J, Lopes Colombo A, Denning D.W. The case for paracoccidioidomycosis to be accepted as a neglected tropical (fungal) disease. PLoS Negl Trop Dis. 2019;13. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007195

30. Peçanha PM, Peçanha-Pietrobom PM, Grão-Velloso TR, Rosa M, Falqueto A, Gonçalves SS. Paracoccidioidomycosis: What we know and what is new in epidemiology, diagnosis, and treatment. J Fungi. 2022;8:1098. https://doi.org/10.3390/jof8101098

31. Almeida-Paes R, Bernardes-Engemann AR, da Silva Motta B, Pizzini CV, de Abreu Almeida M, de Medeiros Muñiz M, *et al*. Immunologic diagnosis of endemic mycoses. J Fungi. 2022;8:993. https://doi.org/10.3390/jof8100993

32. Bialek R, Ibricevic A, Aepinus C, Najvar L, Fothergill A, Knobloch J, *et al*. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in tissue samples by a Nested PCR assay. J Clin Microbiol. 2000;8:2940-2. https://doi.org/10.1128/JCM.38.8.2940-2942.2000

33. Ricci G, Campanini EB, Nishikaku AS, Puccia R, Marques M, Bialek R, *et al*. PbGP43 genotyping using paraffin-embedded biopsies of human paracoccidioidomycosis reveals a genetically distinct lineage in the *Paracoccidioides brasiliensis* complex. Mycopathologia. 2022;187:157-68. https://doi.org/10.1007/s11046-021-00608-3

34. Gaviria M, Rivera V, Muñoz-Cadavid C, Cano LE, Naranjo TW. Validation and clinical application of a nested PCR for paracoccidioidomycosis diagnosis in clinical samples from Colombian patients. Braz J Infect Dis. 2015;19:376-83. https://doi.org/10.1016/j.bjid.2015.04.008

35. Restrepo A. Morphological aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* in lymph nodes: Implications for the prolonged latency of paracoccidioidomycosis? Med Mycol. 2000;38:317-22. https://doi.org/ 10.1080/mmy.38.4.317.322

36. Messina F, Romero M, Benchetrit A, Marin E, Arechavala A, Depardo R, *et al*. Clinical and microbiological characteristics of paracoccidioidomycosis in patients with AIDS in Buenos Aires, Argentina. Med Mycol. 2020;58:22-9. https://doi.org/0.1093/mmy/myz021

37. Taicz M, Rosanova MT, Bes D, Lisdero ML, Iglesias V, Santos P, *et al*. Paracoccidioidomicosis en pediatría: descripción de 4 casos. Rev Iberoam Micol. 2014;31:141-4. https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.05.013

38. Falci DR, Pasqualotto AC. Clinical mycology in Latin America and the Caribbean: A snapshot of diagnostic and therapeutic capabilities. Mycoses. 2019;62:368-73. https://doi.org/10.1111/myc.12890

39. Moreto TC, Marques ME, de Oliveira ML, Moris DV, de Carvalho LR, Mendes RP. Accuracy of routine diagnostic tests used in paracoccidioidomycosis patients at a university hospital. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2011;105:473-8. https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2011.03.001

40. Buitrago MJ, Merino P, Puente S, Gómez-López A, Arribi A, ZancopeOliveira RM, *et al*. Utility of real-time PCR for the detection of *Paracoccidioides brasiliensis* DNA in the diagnosis of imported paracoccidioidomycosis. Med Mycol. 2009;47:879-882. https://doi.org/10.3109/13693780802713208

41. Rocha-Silva F, Gomes LI, Gracielle-Melo C, Goes AM, Caligiorne RB. Real time polymerase chain reaction (rt-PCR): a new patent to diagnostic purposes for paracoccidioidomycosis. Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov. 2017;10:1439. https://doi.org/10.2174/1872214810666160905150958

42. Endo S, Komori T, Ricci G, Sano A, Yokoyama K, Ohori A, *et al*. Detection of gp43 of *Paracoccidioides brasiliensis* by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. FEMS Microbiol Lett. 2004;234:93-7. https://doi.org/10.1016/J.FEMSLE.2004.03.01546

43. Tatibana BT, Sano A, Uno J, Kamei K, Igarashi T, Mikami Y, *et al*. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* gp43 gene in sputa by loop-mediated isothermal amplification. J Clin Lab Anal. 2009;23:139-43. https://doi.org/10.1002/jcla.20304

44. Hahn RC, Rodrigues AM, Della Terra PP, Nery AF, Hoffmann-Santos HD, Gois HM, *et al*. Clinical and epidemiological features of paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides lutzii*. PLoS Negl Trop Dis. 2019;13. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007437

Biomédica 2023;43(Supl.1):144-55
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.6852

Original article

Expression of *ERG11*, *ERG3*, *MDR1* and *CDR1* genes in *Candida tropicalis*

Ana Elisa Rojas[1], Leidy Yurany Cárdenas[2], María Camila García[1], Jorge Enrique Pérez[3]

[1] Grupo de Investigación en Enfermedades Infecciosas - GINEI, Universidad Católica de Manizales, Manizales, Colombia.
[2] Grupo de Investigación en Enfermería - GRIEN, Universidad Católica de Manizales y Universidad de Caldas, Manizales, Colombia.
[3] Grupo de Investigación BIOSALUD, Universidad de Caldas, Manizales, Colombia.

Introduction. Drug resistance to azoles is a growing problem in the *Candida* genus.
Objective. To analyze molecularly the genes responsible for fluconazole resistance in *Candida tropicalis* strains.
Materials and methods. Nineteen strains, with and without exposure to fluconazole, were selected for this study. The expression of *MDR1*, *CDR1*, *ERG11*, and *ERG3* genes was analyzed in sensitive, dose-dependent sensitive, and resistant strains exposed to different concentrations of the antifungal drug.
Results. *MDR1, ERG11* and *ERG3* genes were significantly overexpressed in the different sensitivity groups. *CDR1* gene expression was not statistically significant among the studied groups. Seven of the eight fluconazole-resistant strains showed overexpression of one or more of the analyzed genes. In some dose-dependent sensitive strains, we found overexpression of *CDR1*, *ERG11*, and *ERG3*.
Conclusion. The frequency of overexpression of *ERG11* and *ERG3* genes indicates that they are related to resistance. However, the finding of dose-dependent resistant/sensitive strains without overexpression of these genes suggests that they are not exclusive to this phenomenon. More basic research is needed to study other potentially involved genes in the resistance mechanism to fluconazole.

Keywords: *Candida tropicalis*; drug resistance, fungal; fluconazole.

Expresión de los genes *ERG11*, *ERG3*, *MDR1* y *CDR1* en *Candida tropicalis*

Introducción. La farmacorresistencia a los azoles es un problema creciente en el género *Candida*.
Objetivo. Analizar molecularmente los genes responsables de la resistencia a fluconazol en cepas de *Candida tropicalis*.
Materiales y métodos. Para este estudio, se seleccionaron 19 cepas, con exposición a fluconazol y sin ella. Se analizó la expresión de los genes *MDR1*, *CDR1*, *ERG11* y *ERG3* en cepas sensibles, sensibles dependiente de la dosis, y resistentes, previamente expuestas a diferentes concentraciones del fármaco antifúngico.
Resultados. Se encontró que los genes *MDR1*, *ERG11* y *ERG3* estaban significativamente sobreexpresados en los diferentes grupos de sensibilidad. La expresión del gen *CDR1* no fue estadísticamente significativa entre los grupos estudiados. Siete de las ocho cepas resistentes a fluconazol mostraron sobreexpresión de uno o más de los genes analizados. En algunas cepas sensibles dependientes de la dosis, se encontró sobreexpresión de *CDR1*, *ERG11* y *ERG3.*
Conclusión. La sobreexpresión de los genes *ERG11* y *ERG3* indica que están relacionados con la resistencia de las cepas de *Candida.* Sin embargo, el hallazgo de cepas resistentes o sensibles según la dosis, sin sobreexpresión de estos genes, sugiere que pueden existir otros genes involucrados en este fenómeno. Se necesitan más investigaciones básicas que contribuyan al estudio de otros genes potencialmente involucrados en el mecanismo de resistencia al fluconazol.

Palabras clave: *Candida tropicalis*; farmacorresistencia fúngica; fluconazol.

Different *Candida* species are associated with infections involving mucous membranes, spreading to the bloodstream and even reaching deep tissues (1). In particular, *Candida tropicalis* has been related to infections in patients with neutropenia or those in intensive care units (2). It is recognized as the etiologic agent of acute cutaneous candidiasis in neutropenic patients, and some studies have reported that deep infections caused by this species are usually more lethal than those caused by other non*albicans* species (3).

Received: 18/01/2023
Accepted: 08/05/2023
Published: 09/05/2023

Citation:
Rojas AE, Cárdenas LY, García MC, Pérez JE. Expression of *ERG11*, *ERG3*, *MDR1* and *CDR1* genes in *Candida tropicalis*. Biomédica. 2023;43(Supl.1):144-55.
https://doi.org/10.7705/biomedica.6852

Corresponding author:
Ana Elisa Rojas, Carrera 23 N°60-63, Manizales, Colombia
Teléfono: (57-606) 893 3050, extensión: 3142; fax: (57-606) 878 2937
arojas@ucm.edu.co

Author's contributions:
Ana Elisa Rojas: adquisición de los datos, concepción, diseño y revisión crítica del contenido
Leidy Yurany Cárdenas: análisis e interpretación de los datos y redacción del manuscrito
María Camila García: adquisición, análisis e interpretación de los datos y redacción del manuscrito
Jorge Enrique Pérez: concepción, diseño y revisión crítica de contenido

Funding:
This project was funded by the *Universidad Católica de Manizales*, through agreement N° 159 of the academic council of December 16th, 2016; and by the *Universidad de Calda*s, project code: 0184917 of February 8, 2017.

Conflicts of interest:
The authors declare that there is no conflict of interest for the publication of this manuscript.

Currently, there are some antifungal treatment options for *Candida* spp. infections. Azoles, polyenes, and echinocandins are among the most widely used pharmacological groups (1,4). The azoles, especially fluconazole, are extensively applied in prophylaxis and direct intervention in patients with *Candida* spp. infections. In fact, some reports relate the frequent use of this pharmacological group with the acquired resistance (5).

The azoles are broad-spectrum fungistatic compounds whose primary mechanism of action, after entering the yeast, is its interaction with the enzyme lanosterol 14-alpha-demethylase. This interaction decreases the enzyme affinity for the endogenous substrate, lanosterol. As a result, there is a blockage of the signaling pathway involved in ergosterol synthesis, which is the main lipid component of the *Candida*'s membrane (6,7).

A worldwide problem has emerged around *Candida* spp. infections and their pharmacological intervention: antifungal resistance. The definition of resistance is the nonsusceptibility of the fungus to the drug or pharmacological group of intervention. It can be of two types: primary (intrinsic) or secondary (acquired) (5). This resistance undermines the efficacy of the pharmacological intervention and is associated with therapeutic failure. Thus, the use of some drugs, such as fluconazole, has been controversial, not only because of reported resistance but also because it contributes to generate. Greater resistance, complications and waste of healthcare resources (8).

It has been reported that *C. tropicalis* shows significant azole resistance, with high resistance to fluconazole compared to *C. albicans* and *C. parapsilosis* (9). According to reported data by the SENTRY antifungal surveillance program, worldwide resistance of *C. tropicalis* to fluconazole ranges from 2.5% to 4.9%, with rates above 9% in the Asia-Pacific region (10). The main factors involved in resistance development are decreased concentrations of the drug inside the yeast and reduced affinity with lanosterol 14-alpha-demethylase (11). It is common to find that these resistance mechanisms are associated with alterations in gene expression or mutations and deletions in particular genes. For example, *CDR1* and *MDR1* encoding proteins of the ABC family (Adenosine Triphosphate Binding Cassette) and the Major Facilitator Superfamily (MFS) superfamily, involved in the transport and exit of fluconazole through the yeast plasma membrane, have been widely reported to be overexpressed (12). Overexpression or mutations of the *ERG11* gene coding for the enzyme lanosterol 14-alpha-demethylase have also been identified in resistant strains, leading to a lower affinity between fluconazole and its pharmacological target (13,14). Another molecular mechanism associated with fluconazole resistance expressed by *C. tropicalis* involves mutations in the *ERG3* gene, which encodes the enzyme sterol 5,6demethylase, responsible for converting non-toxic intermediate sterols – derived from the pharmacological action of fluconazole – into toxic sterols (13). These mutations cause a reduction of the aforementioned toxic intermediates in the yeast cell membrane, with the consequent inability to cause fungal death (8). The main mechanism described in the literature, justifying the resistance of *C. tropicalis* to azoles, corresponds to drug concentrations decrease inside the fungus by overexpression of efflux or extrusion pumps. However, other related mechanisms can configure resistance in isolation or simultaneously occur, such as mutations in the *ERG11* and *ERG3* genes (11).

In a previous study, conducted in an intensive care unit of a hospital in the city of Manizales, the frequency of *Candida* spp. colonization was detected in admitted patients. The authors found a high frequency of colonization with different *Candida* species, being *C. tropicalis* the third in frequency after *C. albicans* and *C. glabrata* (unpublished data) (15). Given the high frequency of colonization by *C. tropicalis*, the aim of this study was to analyze the relative expression of *MDR1*, *CDR1*, *ERG11*, and *ERG3* genes in strains exposed/not-exposed to fluconazole according to their antifungal sensitivity profile.

Materials and methods

Sample selection and group analysis

In the performed gene expression experiments, we followed the guidelines proposed in the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE) (16). Nineteen strains of *C. tropicalis* from a previous investigation entitled "Study of the colonization of *Candida* species in older adults at intensive care admission" were selected. The strains were plated on potato dextrose agar (PDA, Scharlau Microbiology), and their identification was performed on the Vitek 2 compact device (Biomerieux). Each strain was tested for antifungal susceptibility using the protocols proposed by *The Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), version M27-A3 (17). According to the obtained results, the strains were classified into three susceptibility groups: sensitive with a minimum inhibitory concentration ≤ 2µg/ml, dose-dependent sensitive with a minimum inhibitory concentration of 4 µg/ml, and resistant with minimum inhibitory concentration ≥ 8 µg/m.

Macrodilution assay with and without fluconazole

Each strain was subjected to a macrodilution assay according to the protocol proposed by CLSI (M27-A3), and liquid Sabouraud was used as a culture medium. All tubes were incubated at 35 °C until reaching the yeast logarithmic growth phase. At the time of the minimum inhibitory concentration assessment, the size of the cell sediment of each fluconazole concentration was compared with the positive control. Cells were collected from the tube when growth was higher than 50%. The cell concentration was adjusted to a value between 2-3 x 10^8 blastoconidia per ml for all the samples and the control. The tubes were centrifuged, and the yeast sediment was stored in Eppendorf tubes, free of DNAse and RNAse, containing RNA later (RNAaseZap solution, Ambion RNA technology), and frozen at -80 °C until the moment of RNA extraction.

RNA extraction

To obtain RNA, we followed the protocol proposed in the RiboPure-Yeast Kit (Ambion RNA technology) according to the manufacturer's recommendations.

RNA extraction quality criteria

The RNA samples were subjected to 1% agarose gel electrophoresis to observe the integrity of the genetic material. The RNA was considered not degraded when two bands appeared on the gel. RNA purity was measured using the UVIS Drop UVS99™ spectrophotometer (Avans Biotechnology) with absorbance readings at 230, 260, and 280 nm. Those RNAs with a 260:280 and 260:230 ratio higher than or equal to 2, were of high purity and were used in RT-qPCR assays.

To evaluate the presence of DNA after treatment with DNase I, we performed PCR amplification of one RNA sample, without reverse transcription, using an universal primer for *C. tropicalis*. The DNA-contaminated strains were subjected to a new DNase I treatment.

Protocol standardization

The *C. tropicalis* strain from the American Type Culture Collection, ATCC750 was used as a sensitive strain reference, and a strain from the fluconazole-resistant group was randomly selected as resistance reference. All procedures were performed according to previously established guidelines to ensure adequate purity of the reactions and to avoid contamination with RNA from other microorganisms.

Reverse transcription protocol

The reverse transcription process was performed in the StepOnePlus™ Real-Time PCR System thermocycler (Applied Biosystems), with the following protocol: Incubation at 25 °C for 10 minutes, then at 42 °C for 15 minutes, and finally, the enzyme was inactivated at 85 °C for 5 minutes. The obtained RNA was converted to cDNA using the SensiFast™ cDNA kit (Bioline). The manufacturer's instructions were carefully followed, with no modifications.

Selection and optimization of primers for qPCR

The primer sequences for *MDR1* and *CDR1* amplification were proposed by Jiang *et al*. (18), and the primer sequences for *ACT1*, *ERG11*, and *ERG3* amplification were designed in the laboratory (table 1). The algorithm used to generate the primers was the OligoPerfect Primer Design™ (Thermo Fisher), and the reference sequence corresponded to *C. tropicalis* MYA3404 (GenBank accession number XM_002550136 - National Center for Biotechnology of information - NCBI). The ideal alignment temperatures were selected by melting curve analysis, ensuring the specificity of the evaluated primers.

qPCR experiment

Each qPCR assay with the samples exposed or non-exposed to fluconazole was performed in triplicate (a replicate technique to monitor the precision of real-time PCR amplification) on the StepOnePlus™ Real-Time PCR machine using the PowerUp SYBR Green Master Mix kit (Applied Biosystems). *ACT1* was used as a reference gene to evaluate the transcriptional relative expression of the *MDR1*, *CDR1*, *ERG11*, and *ERG3* genes. The specificity of the products of q-PCR reactions was evaluated through dissociation curves analysis (melting curve).

Table 1. First sequence

Gene		Primer sequence (5'-3')	Size (bp)	Melting temperature (Tm) (°C)
ACT1	Forward	GTGTTACCCACGTTGTCCCA	139	81,42
	Reverse	GCGGTGGTGGAGAAAGTGTA		
MDR1	Forward	TAAAGCAGGCTGGAGATGGA	444	78,11
	Reverse	ACAACCTCCAACTATAGCTA		
CDR1	Forward	TGAAGCCAGACCCGTAGTTG	379	78,22
	Reverse	CCACTTTGCCCATCCTAACA		
ERG11	Forward	CCATGGTTTGGTCTGCTGC	140	75,86
	Reverse	TCGTGACCTTTTGGACCCA		
ERG3	Forward	TGGAAATCGGTTTGGCAACT	149	76,26
	Reverse	AGGAAATTGCCATAAAAGTGCCT		

Each q-PCR quantification reaction contained 5 µl of 2X PowerUp SYBR Green Master Mix, 0.8 µl of each primer at a final concentration of 0,8 µM, 1 µl of cDNA (cDNA adjusted concentration to 1 ng/µl), the volume was made up to 10 µl with RNAse/DNAse-free water. The program consisted of an initial denaturation in two steps: 50 °C for two minutes and 95 °C for 10 minutes, followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 15 seconds and an extension at 60 °C for 1 minute. To establish the cDNA dissociation temperature and identify non-specific amplification reactions, the following parameters were used: 95 °C for 15 seconds, 60 °C for 1 minute, and 95 °C for 15 seconds.

Relative expression assessment of MDR1, CDR1, ERG11 and ERG3

The relative expression was calculated using the difference between the amplification cycle (Ct) of the resistance genes (*MDR1*, *CDR1*, *ERG11*, *ERG3*) and the reference endogenous control gene (*ACT1*), per sample. *C. tropicalis* ATCC-750 was used as the reference strain. Analysis of the results was performed in StepOne Plus™ Real-Time PCR software, applying double-delta Ct equation (2-ΔΔCT) (Applied Biosystems). This same software allowed efficiency calculation of each evaluated reaction.

Statistical analysis

Data normality Kolmogorov-Smirnov test was performed, and according to the result, we used t Student for parametric data and Wilcoxon test for non-parametric data. These statistical analyses were applied to establish gene expression significance when comparing the samples in two conditions: Exposed to fluconazole (test group) and notexposed to fluconazole (control group). A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

The relative expression of the studied genes of the 19 strains exposed and not-exposed to the antifungal indicated that *MDR1*, *ERG11*, and *ERG3* expression in the fluconazole-exposed strains was higher compared to the unexposed strains expression. However, the greatest increase in the relative expression of the exposed *versus* unexposed strains corresponded to *ERG11* (fold change of 2.48, $p = 0.009$), followed by *MDR1* (fold change of 1.69, $p = 0.099$), and finally *ERG3* (fold change of 1.35, $p = 0.0045$). On the contrary, the *CDR1* gene in fluconazole-exposed strains showed a lower relative expression than those not-exposed (fold change of -0.22, $p = 0.035$).

Of the 19 strains tested, 8 were resistant (samples: 68-1, 100-1, 132-2, 48-2, 23-1, 95-1, 176-1, 103-1), 6 were dose-dependent sensitive (samples: 84-1, 46-1, 109-1, 68-2, 2-2B, 159-1) and 5 were sensitive (samples: 105-1, 108-1, 156-1, 135-1, 85-1). Here, we described the findings obtained when comparing the relative expressions of the ATCC reference strain, exposed and not-exposed to fluconazole, with different strains according to their fluconazole sensitivity profile.

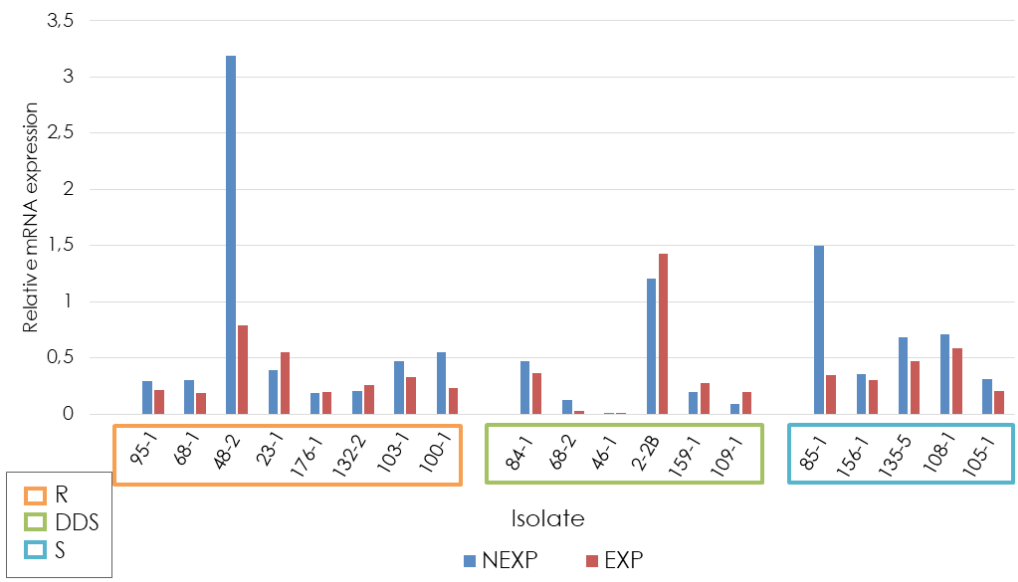
When analyzing the expression of the *CDR1* gene, we found that ATCC reference strain relative expression (fold change of 1) was exceeded by the resistant strain 48-2 (notexposed to fluconazole), by the dose-dependent sensitive strain 2-2B (exposed and not-exposed to fluconazole), and by the sensitive strain 85-1 (not-exposed to fluconazole). The average relative expression of the *CDR1* gene in the other analyzed strains did not exceed the relative expression of the ATCC reference strain. The relative expression

was higher in strains exposed to fluconazole compared to non-exposed strains in the dose-dependent sensitive group. However, this difference was not statistically significant (p = 0.275). Concerning relative expression in the resistant and sensitive groups, we found lower expression in those exposed to fluconazole in both groups (figure 1).

In general, the average relative expression of the *MDR1* gene of the antifungalexposed and not-exposed strains did not exceed the relative expression of the ATCC reference strain. However, overexpression of this gene was observed in one of the strains fluconazole-exposed and resistant to it (95-1) with a fold change higher than 30. Additionally, it was found that strains exposed and resistant to fluconazole had a higher relative expression than those not-exposed (fold change of 4.08, p= 0.0085). Regarding the groups classified as sensitive and dose-dependent sensitive, we identified that strains exposed to fluconazole had a lower relative expression than non-exposed strains (figure 2).

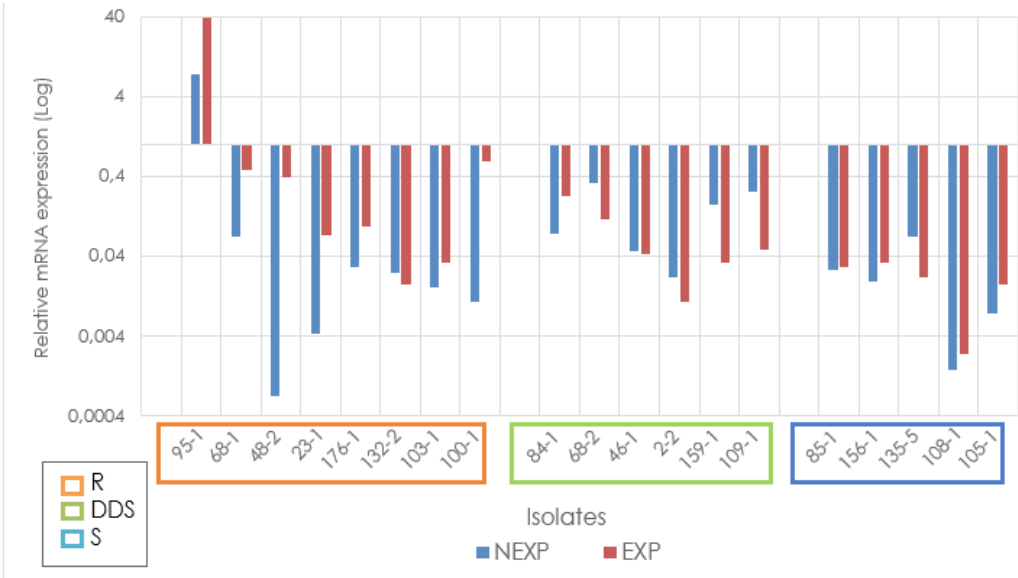
The average relative expression of the *ERG11* gene, independent of the classification according to the fluconazole sensitivity profile and the condition of exposure or not to the antifungal, always exceeded the relative expression of the ATCC reference strain. Six of the eight samples exposed and resistant to fluconazole showed overexpression with a fold change higher than 3 (23-1, 48-2, 100-1, 103-1, 132-2, and 176-1). In contrast, in the dose-dependent sensitive group, four of the six samples showed overexpression higher than 2 (2-2, 46-1, 84-1, and 159-1), and in the sensitive group, four of the five samples showed values between 2 and 4 (105-1, 108-1, 135-5 and 156-1) (figure 3).

The highest average relative expression was observed in the exposed strains from the dose-dependent resistant and dose-dependent sensitive groups. There was a higher relative expression in fluconazole-exposed strains compared with those not-exposed in all groups classified according to the sensitivity profile (resistant group fold change = 2.24, p = 0.14; dose-dependent sensitive group fold change = 3.53, p = 0.035; and sensitive group fold change 1.61, p = 0.036).



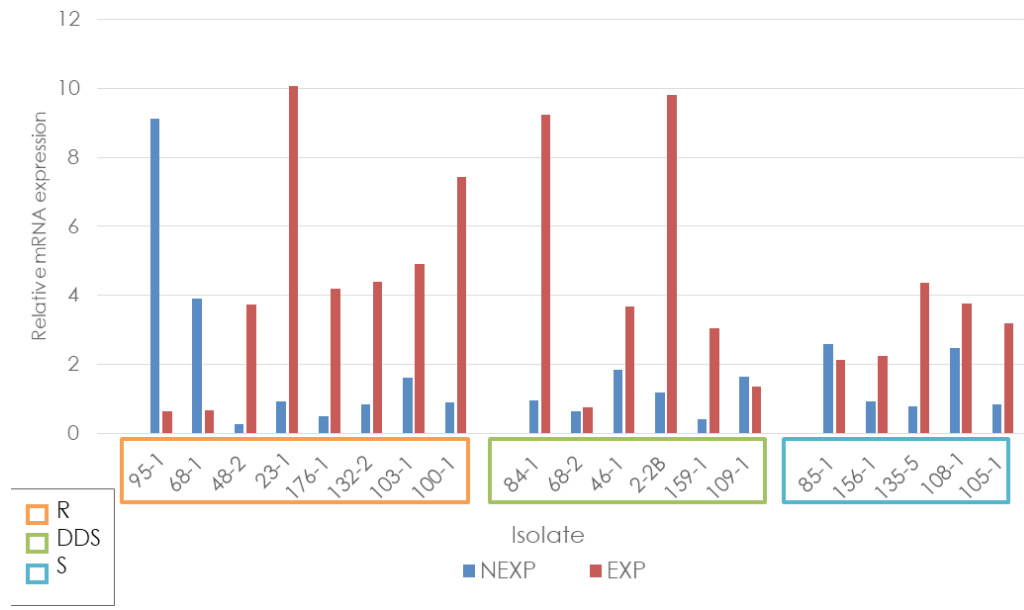
R: Resistant; DDS: Dose-dependent sensitive; S: Sensitive; NEXP: Not-exposed to fluconazole; EXP: Exposed to fluconazole

Figure 1. Relative expression of the *CDR1* gene in *Candida tropicalis*



R: Resistant; DDS: Dose-dependent sensitive; S: Sensitive; NEXP: Not-exposed to fluconazole; EXP: Exposed to fluconazole
Note: Due to the extreme values of the relative expression of some isolates, it is graphed on a logarithmic scale to facilitate visualization.

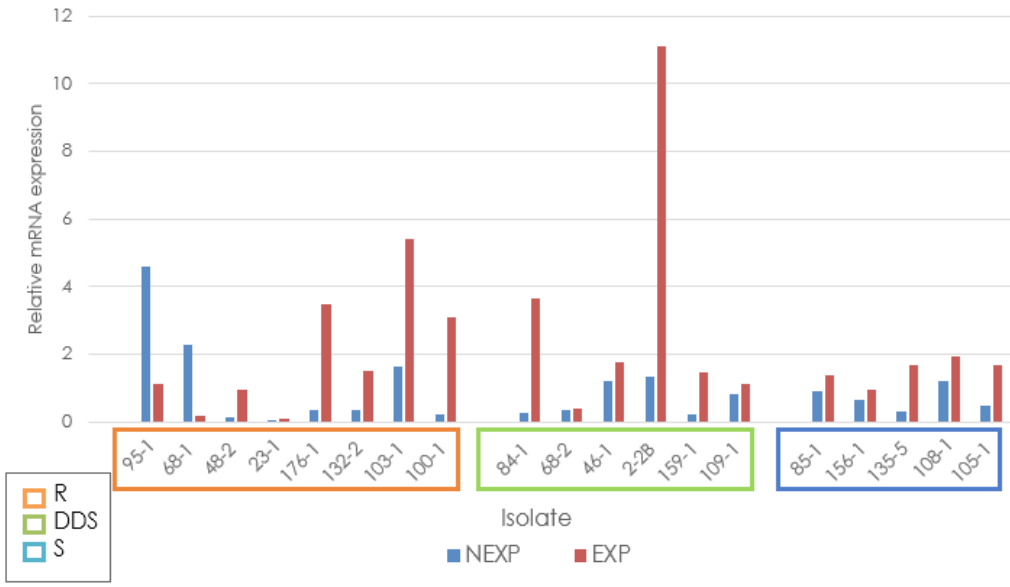
Figure 2. Relative expression of the *MDR1* gene in *Candida tropicalis*



R: Resistant; DDS: Dose-dependent sensitive; S: Sensitive; NEXP: Not-exposed to fluconazole; EXP: Exposed to fluconazole

Figure 3. Relative expression of the *ERG11* gene in *Candida tropicalis*

Independent of the antifungal sensitivity profile classification, the average relative expression of the ERG3 gene in fluconazole-exposed strains always exceeded the relative expression of the ATCC reference strain. Among the exposed resistant strains, 103-1 showed overexpression with a fold change of 4, while strains 100-1, 132-2, and 176-1 showed a fold change between 1 and 4. In the dose-dependent sensitive strains, overexpression was identified in 2-2B with a fold change higher than 10, and in strains 461, 84-1, 109-1, and 159-1, fold changes were between 1 and 4. In the sensitive group, four samples had fold changes between 1 and 2 (85-1, 105-1, 108-1, and 135-5), and one was below 1 (156-1) (figure 4).



R: Resistant; DDS: Dose-dependent Sensitive; S: Sensitive; NEXP: Not-exposed to fluconazole; EXP: Exposed to fluconazole

Figure 4. Relative expression of the *ERG3* gene in *Candida tropicalis*

There was a higher relative expression in fluconazole-exposed strains in all groups of analysis classified according to the sensitivity profile in comparison with the notexposed: resistant group fold change = 0.78, p = 0.20; dose-dependent sensitive group fold change = 2.55, p = 0.014; sensitive group fold change = 0.81, p = 0.0085).

From the group of strains classified as resistant, seven samples overexpressed at least one gene (48-1, 95-1, 23-1, 100-1, 103-1, 132-2, and 176-1), and two of these seven overexpressed two or more genes (100-1 and 103-1); in the dose-dependent sensitive strains, two samples overexpressed at least two genes (2-2 and 84-1). Strain 95-1 exposed to fluconazole showed a much higher expression of the *MDR1* gene but not of the other genes analyzed in this study.

Discussion

Given the growing importance of the azole resistance phenomenon in *Candida* spp., multiple studies worldwide have focused their interest on basic research intending to broaden and deepen the theoretical reference, which allows taking elements of analysis with clinical projection. Research has been conducted on resistance, especially in *C. albicans*. In Colombia, this would be the first study on resistance mechanisms in the species *C. tropicalis,* the study of which has recently focused on resistance (13,19-21). In the region, researchers published a study about the identification and frequency of molecular mechanisms associated with fluconazole resistance expressed by *C. albicans* species (22). However, similar studies have not been reported for *C. tropicalis*, an etiologic agent frequently isolated from infections and, according to some studies, causative of higher mortality (23).

The results of this study indicate that fluconazole-exposed strains, independent of the sensitivity profile, had a higher expression of the *ERG11,* followed by *ERG3* and *MDR1.* These results could suggest that the drug-stimuli exposure could lead to biological modifications in *C. tropicalis* strains, at the gene expression level, affecting enzymesencoding genes more than

transporters-encoding genes potencially involved in drug extrusion; a similar finding reported in other studies (2comprising 9 FNS (fluconazole MIC, 4 to 64 µg/ml0). On the other hand, fluconazole-exposed strains did not overexpress the *CDR1* gene. This result coincides with other analyses showing that the ABC family transporters are nonspecific and are not-determinant in conferring resistance to fluconazole in *C. tropicalis* species (24).

Concerning the results obtained for the eight strains classified as resistant, we identified overexpression of the *CDR1* gene in one strain of the *MDR1* gene in one strain, of the *ERG11* gene in six strains, and of the *ERG3* gene in four strains. Overexpression of the *MDR1* gene in the resistant strain had the highest relative value found in this study and interestingly, in this same strain, there was no overexpression of any other genes. This finding can indicate the function of *MDR1* as an independent molecular factor that does not need the overexpression of other genes to confer resistance to fluconazole.

Although some studies report overexpression of both *MDR1* and *ERG11* in resistant strains (25-27), others suggested that the *MDR1* gene, coding for efflux transporters of the MFS family, is a specific fluconazole-transporter among other azole drugs and can be sufficient to independently generate resistance to this antifungal drug (20which was confirmed by determination of MICs. Considering the relationship between azole susceptibility and the respiration reported for other yeast species, the respiratory activity of this isolate was investigated. Flow cytometry using rhodamine 123 and oxygraphy demonstrated an increased respiratory activity, which was not linked to an overexpression or increased number of copies of the mitochondrial genome. Among previously described resistance mechanisms, an increased activity of efflux pumps was investigated by flow cytometry using rhodamine 6G. However, the efflux of rhodamine 6G was lower in the resistant isolate than in susceptible ones. Likewise, real-time reverse transcription-PCR quantification of the expression of C. tropicalis MDR1 (CtMDR1). Previous studies reported this particular finding for *C. albicans* (24), and considering the virulence similarities between *C. albicans* and *C. tropicalis*, we hypothesize about the possible similitude between the azole-resistance mechanisms of these two species (18).

In this study, the most frequently overexpressed genes in resistant strains were *ERG11* and *ERG3*, as other researchers also indicated (20). This molecular phenomenon of azole resistance is likely promoted by the long and repeated exposure to this type of antifungal or by the static mechanism of action on the ergosterol biosynthesis pathway. The study by Jiang *et al.* reported that efflux transporters are not a vital mechanism to confers azoles-resistance to *C. tropicalis* and, in this sense, others would be more closely related (18).

Half of the fluconazole-exposed and resistant strains overexpressed both the *ERG11* and *ERG3* genes. Some studies described it as a mechanism contributing to azole resistance in *Candida* spp. However, the involvement of *ERG3* overexpression as a unique mechanism in the development of resistance has been poorly described for *C. tropicalis* (26,27). A study reported that *C. tropicalis* strains with a loss-of-function mutation in *ERG11* can only survive if a mutation in *ERG3* is also present (28). Therefore, it is plausible that syncronic overexpression of both genes be a complementary molecular mechanism involved in the fluconazole-resistance phenomenon.

As a noteworthy finding, the resistant strain and fluconazole-exposed 23-1 had a higher overexpression of *ERG11* than the other strains. As a differentiating element, it did not have overexpression of *ERG3*. Some studies reported that *ERG11* overexpression may be the most frequent mechanism of azole resistance, but this does not necessarily imply overexpression of *ERG3* (22,29,30). On the other hand, the lack of *ERG3* overexpression could somehow favor the overexpression of *ERG11* to survive against fluconazole. The scientific community could investigate this hypothesis to clarify and deepen the understanding of these specific resistance mechanisms associated with the *C. tropicalis* species.

The biological and molecular mechanisms associated with *Candida* spp. resistance to the pharmacological agent fluconazole are multiple and variable (31-33). In our region, this antifungal and others of the pharmacological group of azoles are regularly used. Therefore, it is essential to promote research that expands and elucidates the mechanisms associated with resistance. Several researchers have documented mutations in the *ERG11* and *ERG3* genes. Currently, this manuscript's authors are developing a project in which *ERG11* will be sequenced to evaluate its mutations, and *ERG3* sequencing is intended in the future. We expect this type of research provides the regional scientific and clinical community with considerable elements for early screening of resistant strains to make effective intervention decisions.

Acknowledgments

To the assistants of the research laboratory of the Biosalud group and other personnel of the Universidad de Caldas for their collaboration, logistic support, and co-financing of the project; to the directors and administrative and support personnel of the Research and Postgraduate Department of the Universidad Católica de Manizales for contributing with the technical and financial resources necessary for the execution of this research project.

References

1. Bhattacharya S, Sae S, Fries BC. Candidiasis and mechanisms of antifungal resistance. Antibiotics (Basel). 2020;9:312. https://doi.org/10.3390/antibiotics9060312
2. Barac A, Cevik M, Colovic N, Lekovic D, Stevanovic G, Micic J, *et al.* Investigation of a healthcare-associated *Candida tropicalis* candidiasis cluster in a hematology unit and a systematic review of nosocomial outbreaks. Mycoses. 2020;63:326-33. https://doi.org/10.1111/myc.13048
3. Fan X, Xiao M, Liao K, Kudinha T, Wang H, Zhang L, *et al.* A notable increasing trend in azole non-susceptible *Candida tropicalis* causing invasive candidiasis in China (August 2009 to July 2014): Molecular epidemiology and clinical azole consumption. Front Microbiol. 2017;8:464. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00464
4. Campoy S, Adrio JL. Antifungals. Biochem Pharmacol. 2017;133:86-96. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.11.019
5. Arendrup MC, Patterson TF. Multidrug-resistant *Candida*: Epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. J Infect Dis. 2017;216(Suppl.3):S445-51. https://doi.org/10.1093/infdis/jix131
6. Ksiezopolska E, Gabaldón T. Evolutionary emergence of drug resistance in *Candida* opportunistic pathogens. Genes (Basel). 2018;9:461. https://doi.org/10.3390/genes9090461
7. Sari S, Kart D, Öztürk N, Kaynak FB, Gencel M, Taşkor G, *et al.* Discovery of new azoles with potent activity against *Candida* spp. and *Candida albicans* biofilms through virtual screening. Eur J Med Chem. 2019;179:634-48. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.06.083

8. Cárdenas LY, Cárdenas JE. Mecanismos de resistencia a fluconazol expresados por *Candida glabrata*: una situación para considerar en la terapéutica. Inv Enf. 2020;20:112. https://doi.org/10.11144/Javeriana.ie22.mrfe

9. Tan TY, Hsu LY, Alejandria MM, Chaiwarith R, Chinniah T, Chayakulkeeree M, *et al.* Antifungal susceptibility of invasive *Candida* bloodstream isolates from the AsiaPacific region. Med Mycol. 2016;54:471-7. https://doi.org/10.1093/mmy/myv114

10. Pfaller MA, Diekema DJ, Turnidge JD, Castanheira M, Jones RN. Twenty years of the SENTRY antifungal surveillance program: Results for *Candida* species from 19972016. Open Forum Infect Dis. 2019;6(Suppl.1):S79-94. https://doi.org/10.1093/ofid/ofy358

11. Oliveira JS, Pereira VS, Castelo D, Cordeiro R, Sidrim JC, Brilhante SN, *et al.* The yeast, the antifungal, and the wardrobe: A journey into antifungal resistance mechanisms of *Candida tropicalis*. Can J Microbiol. 2020;66:377-88. https://doi.org/10.1139/cjm-2019-0531

12. Prasad R, Nair R, Banerjee A. Multidrug transporters of *Candida* species in clinical azole resistance. Fungal Genet Biol. 2019;132:103252. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2019.103252

13. Paul S, Singh S, Sharma D, Chakrabarti A, Rudramurthy SM, Ghosh AK. Dynamics of *in vitro* development of azole resistance in *Candida tropicalis*. J Glob Antimicrob Resist. 2020;22:553-61. https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.04.018

14. Fan X, Xiao M, Zhang D, Huang JJ, Wang H, Hou X, *et al.* Molecular mechanisms of azole resistance in *Candida tropicalis* isolates causing invasive candidiasis in China. Clin Microbiol Infect. 2019;25:885-91. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.11.007

15. Hernández JS. Estudio básico-clínico de la colonización de especies de candida en adultos mayores al ingreso de cuidados intensivos. Manizales: Universidad de Caldas; 2015. p. 1-191.

16. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, *et al.* The MIQE Guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem. 2009;55:611-22. https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797

17. Rex J, Barbara D, Andes D, Arthintong B, Brown S, Chaturvedi V, *et al.* M27-A3 reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast approved standard. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008. p. 1-13.

18. Jiang C, Dong D, Yu B, Cai G, Wang X, Ji Y, *et al.* Mechanisms of azole resistance in 52 clinical isolates of *Candida tropicalis* in China. J Antimicrob Chemother. 2013;68:778-85. https://doi.org/10.1093/jac/dks481

19. Chen PY, Chuang YC, Wu UI, Sun HY, Wang JT, Sheng WH, *et al.* Mechanisms of azole resistance and trailing in *Candida tropicalis* bloodstream isolates. J Fungi. 2021;7:612. https://doi.org/10.3390/jof7080612

20. Choi MJ, Won EJ, Shin JH, Kim SH, Lee WG, Kim MN, *et al.* Resistance mechanisms and clinical features of fluconazole-nonsusceptible *Candida tropicalis* isolates compared with fluconazole-less-susceptible isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2016;60:3653-61. https://doi.org/10.1128/AAC.02652-15

21. Sasani E, Yadegari MH, Khodavaisy S, Rezaie S, Salehi M, Getso MI. Virulence factors and azole-resistant mechanism of *Candida tropicalis* isolated from candidemia. Mycopathologia. 2021;186:847-56. https://doi.org/10.1007/s11046-021-00580-y

22. Rojas AE, Pérez JE, Hernández JS, Zapata Y. Quantitative analysis of the expression of fluconazole-resistant genes in strains of *Candida albicans* isolated from elderly people at their admission in an intensive care unit in Manizales, Colombia. Biomédica. 2020;40:153-65. https://doi.org/10.7705/biomedica.4723

23. Chapman B, Slavin M, Marriott D, Halliday C, Kidd S, Arthur I, *et al.* Changing epidemiology of candidaemia in Australia. J Antimicrob Chemother. 2017;72:1103-8. https://doi.org/10.1093/jac/dkw422

24. Vandeputte P, Larcher G, Bergès T, Renier G, Chabasse D, Bouchara JP. Mechanisms of azole resistance in a clinical isolate of *Candida tropicalis*. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49:4608-15. https://doi.org/10.1128/AAC.49.11.4608-4615.2005

25. Jin L, Cao Z, Wang Q, Wang Y, Wang X, Chen H, *et al.* MDR1 overexpression combined with ERG11 mutations induce high-level fluconazole resistance in *Candida tropicalis* clinical isolates. BMC Infect Dis. 2018;18:162. https://doi.org/10.1186/s12879-018-3082-0

26. Pandey N, Tripathi M, Gupta MK, Tilak R. Overexpression of efflux pump transporter genes and mutations in *ERG11* pave the way to fluconazole resistance in *Candida tropicalis*: A study from a North India region. J Glob Antimicrob Resist. 2020;22:374-8. https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.02.010

27. You L, Qian W, Yang Q, Mao L, Zhu L, Huang X, *et al. ERG11* gene mutations and MDR1 upregulation confer pan-azole resistance in *Candida tropicalis* causing disseminated candidiasis in an acute lymphoblastic leukemia patient on posaconazole prophylaxis. Antimicrob Agents Chemother. 2017;61:e02496-16. https://doi.org/10.1128/AAC.02496-16

28. Barchiesi F, Calabrese D, Sanglard D, Falconi L, Caselli F, Giannini D, *et al.* Experimental induction of fluconazole resistance in *Candida tropicalis* ATCC 750. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44:1578-84. https://doi.org/10.1128/AAC.44.6.1578-1584.2000

29. Li QQ, Tsai HF, Mandal A, Walker BA, Noble JA, Fukuda Y, *et al.* Sterol uptake and sterol biosynthesis act coordinately to mediate antifungal resistance in *Candida glabrata* under azole and hypoxic stress. Mol Med Rep. 2018;17:6585-97. https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8716

30. Lotfali E, Ghajari A, Kordbacheh P, Zaini F, Mirhendi H, Mohammadi R, *et al.* Regulation of *ERG3*, *ERG6*, and *ERG11* genes in antifungal-resistant isolates of *Candida parapsilosis*. Iran Biomed J. 2017;21:275-81. https://doi.org/10.18869/acadpub.ibj.21.4.275

31. Eddouzi J, Parker JE, Vale-Silva LA, Coste A, Ischer F, Kelly S, *et al.* Molecular mechanisms of drug resistance in clinical *Candida* species isolated from Tunisian hospitals. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57:3182-93. https://doi.org/10.1128/AAC.00555-13

32. Jiang C, Dong D, Yu B, Cai G, Wang X, Ji Y, *et al.* Mechanisms of azole resistance in 52 clinical isolates of *Candida tropicalis* in China. J Antimicrob Chemother. 2013;68:778-85. https://doi.org/10.1093/jac/dks481

33. Jiang C, Ni Q, Dong D, Zhang L, Li Z, Tian Y, *et al.* The role of *UPC2* gene in azoleresistant *Candida tropicalis*. Mycopathologia. 2016;181:833-8. https://doi.org/10.1007/s11046-016-0050-3

Biomédica 2023;43(Supl.1):156-69
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.6883

Original article

In vitro and *Quantitative and Structure Activity Relationship* (QSAR) evaluation of the antifungal activity of terpenoid constituents of essential oils against *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum*

Sergio Andrade-Ochoa[1,2], Daniela Sánchez-Aldana[1], Luz María Rodríguez-Valdez[1], Guadalupe Virginia Nevárez -Moorillón[1]

[1] Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua, Chihuahua, México
[2] Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Chihuahua, Chihuahua, México

Introduction. Fungal *genera Alternaria* and *Fusarium* include human and plant pathogenic species. Several antifungals have been used for their control, but excessive use has contributed to resistance development in pathogens. An alternative to searching for and developing new antifungal agents is using essential oils and their main components, which have biological activities of interest in medicine and food production.
Objective. To evaluate *in vitro* and *in silico* the antifungal activities of terpenoids against *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum*.
Materials and methods. The minimum inhibitory concentration and minimum fungicidal concentration values of 27 constituents of essential oils used against *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum* were evaluated *in vitro*. In addition, using genetic algorithms, quantitative models of the structure-activity relationship were used to identify the structural and physicochemical properties related to antifungal activity.
Results. The evaluated compounds proved to be effective antifungals. Thymol was the most active with a minimum inhibitory concentration of 91.6 ± 28.8 µg/ml for *A. alternata* and *F. oxysporum*. Quantitative structure-activity relationship models revealed the octanol-water cleavage ratio as the molecular property, and the phenols as the main functional group contributing to antifungal activity.
Conclusion. Terpenoids exhibit relevant antifungal activities that should be incorporated into the study of medicinal chemistry. Inclusion of *in silico* assays in the *in vitro* evaluation is a valuable tool in the search for and rational design of terpene derivatives as new potential antifungal agents.

Keywords: *Fusarium*; *Alternaria*; oils, volatile; quantitative structureactivity relationship.

Evaluación *in vitro* y *QSAR* (*Quantitative and Structure-Activity Relationship*) de la actividad antifúngica de terpenoides obtenidos de aceites esenciales frente a *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*

Introducción. Los géneros *Alternaria* y *Fusarium* contienen especies patógenas para los humanos y los cultivos. Para su control, se han utilizado diversos antifúngicos. Sin embargo, su uso desmedido ha contribuido al desarrollo de agentes patógenos resistentes. Una alternativa para buscar y desarrollar nuevos agentes antimicóticos son los aceites esenciales y sus componentes principales, los cuales poseen diversas actividades biológicas de interés para la medicina y en la preservación de alimentos.
Objetivo. Evaluar *in vitro* e *in silico* las actividades antifúngicas de terpenoides contra *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*.
Materiales y métodos. Se evaluaron *in vitro* las concentraciones inhibitorias mínimas y las concentraciones fungicidas mínimas de 27 constituyentes de aceites esenciales contra *A. alternata* y *F. oxysporum*. Además, mediante algoritmos genéticos, se crearon modelos cuantitativos de la relación estructura-actividad para determinar las propiedades estructurales y fisicoquímicas relacionadas con la actividad antifúngica.
Resultados. Los compuestos evaluados mostraron ser antifúngicos activos. El timol fue el compuesto con mayor actividad, con un valor de concentración inhibitoria mínima de 91.6 ± 28.8 µg/ml, tanto para *Alternaria alternata* como para *Fusarium oxysporum*. Los modelos cuantitativos de la relación estructura-actividad incluyeron la avidez por los lípidos y los fenoles como los principales grupos funcionales que contribuyen en la actividad antifúngica.
Conclusión. Los terpenoides poseen actividades antifúngicas relevantes para ser incorporados en el estudio de la química medicinal. La inclusión de pruebas *in silico* a la evaluación *in vitro* es una herramienta útil para la búsqueda y el diseño racional de derivados terpénicos como posibles agentes antifúngicos.

Received: 03/02/2023
Accepted: 08/05/2023
Published: 12/05/2023

Citation:
Andrade-Ochoa S, Sánchez-Aldana D, Rodríguez-Valdez LM, Nevárez-Moorillón GV. *In vitro* and *Quantitative and Structure Activity Relationship* (QSAR) evaluation of the antifungal activity of terpenoid constituents of essential oils against *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum*. Biomédica. 2023;43(Supl.1):156-69. https://doi.org/10.7705/biomedica.6883

Corresponding author:
Guadalupe Virginia Nevárez-Moorillón, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua, Circuito Universitario s/n. Campus Universitario II, 31125 Chihuahua, Chihuahua, México
Teléfono: (+52) (614) 236 6000, extensión 4248
vnevare@uach.mx

Author's contributions:
Sergio Andrade-Ochoa: determinación de la concentración inhibitoria mínima y de la concentración fungicida mínima, optimización y generación de descriptores moleculares, construcción de modelos QSAR y redacción del manuscrito
Daniela Sánchez-Aldana: determinación de la concentración imínima nhibitoria y concentración fungicida mínima y redacción del manuscrito
Luz María Rodríguez-Valdez: coordinación y supervisión de las estrategias experimentales *in silico*
Guadalupe Virginia Nevárez-Moorillón: concepción y diseño del estudio, coordinación y supervisión de las estrategias experimentales *in vitro*

Funding:
Para el presente proyecto, no se recibió financiación externa.

Conflicts of interest:
Los autores declaran no tener conflicto de intereses en este trabajo.

Palabras clave: *Fusarium*; *Alternaria*; aceites volátiles; relación estructura-actividad cuantitativa.

Alternaria and *Fusarium* genera include human pathogenic species and pathogens causing wilting or root and crown rot in economically important crops (1,2). *Alternaria alternata* is an airborne fungal species continually reported in nasal secretions and with vigorous immunological activity in nasal epithelial cells, where it plays an essential role in the pathogenesis of chronic rhinosinusitis (3). In addition, *A. alternata* is recognized as an opportunistic mold responsible for skin lesions in patients under corticosteroid treatment, suffering from Cushing's syndrome, undergoing kidney, liver, or bone marrow transplants, and presenting solid and hematological neoplasms, aplastic anemia, or AIDS. Furthermore, several mycotoxins and secondary metabolites produced by *A. alternata* have been isolated from a wide range of harvested food products (4).

On the other hand, *Fusarium oxysporum*, a filamentous, hyaline, septate fungus belonging to the group of hyalohyphomycosis agents, is recognized as the cause of localized infections, such as keratitis and disseminated infections, with multisystemic involvement in immunocompromised patients (5). Similarly, these pathogens can affect ornamental and many garden crops (6) and are responsible for pre- and post-harvest diseases (7), generating significant economic losses (8).

Antifungals have been used in medicine and agriculture to control several pathogenic fungi (9). The widespread use of antifungals has inhibited the outbreak of fungal diseases but, at the same time, it has contributed to the development of resistant pathogens (10), as in the case of *A. alternata* or *Alternata solani*, which exhibits resistance against succinate dehydrogenase inhibitors (11,12). Strains of *A. alternata* resistant to fluconazole and 5fluorocytosine have also been reported (13). *Fusarium* species are intrinsically resistant to azole antifungals (14), but some studies described resistance to echinocandins and polyenes (15).

Some essential oils display relevant antifungal activities (16,17). There are reports of essential oils exhibiting antifungal activity against *Candida* spp. (18), *Aspergillus* spp. (19), *Alternaria* spp. (20), and *Fusarium* spp. (21,22), among other pathogenic fungi (23-25). Essential oils have broad applications in folk medicine and food preservation (26). Volatile compounds in essential oils, such as terpenoids, and aliphatic and aromatic compounds, constitute a rich source of potential agents against pathogenic microorganisms.

Currently, it is possible to use computational tools to analyze the biological activity of compounds with pharmacological potential to accelerate new antimicrobial agents' development. Computer-aided drug design is a valuable technique that saves time and resources in the design process of new drugs (27). Computational models can identify the most promising compounds for further development, reducing the testing and experimentation required to obtain an effective drug (28).

Among the computational tools for drug development are quantitative and structureactivity relationship (QSAR) models. This technique is based on the idea of a quantitative relationship between the chemical structure of a compound and its biological activity, which implies that changes in a compound chemical structure can affect its biological activity in a predictable way (29). In addition, QSAR studies can help identify the underlying molecular

mechanisms affecting a compound biological activity, providing a better understanding of how compounds interact and how they can be modified to improve their efficacy (30).

In light of the above, this study aimed to evaluate the antifungal activity of terpenoids against *A. alternata* and *F. oxysporum* using *in vitro* bioassays. In addition, QSAR studies were conducted between the physicochemical properties of the compounds and their antifungal effects.

Materials and methods

In vitro evaluations

The antifungal activity of 27 compounds was evaluated against environmental strains of *A. alternata* and *F. oxysporum* isolated in the Microbiology III Laboratory of the *Facultad de Ciencias Químicas* of the *Universidad Autónoma de Chihuahua*. The compounds evaluated were obtained from Sigma-Aldrich (México City, México) and are presented in figure 1.

Minimum inhibitory concentration values were determined following the methodology described by Rasooli and Mirmostafa (31), and Rasooli *et al.* (32), with certain modifications.

Fungal strains were plated in Sabouraud medium and incubated for two weeks at 37 °C. After incubation, spores were collected by adding 20 ml of phosphate buffer to the plate with 0.5% Tween 80. A spore count was conducted using a Neubauer chamber to adjust the number of spores to the required concentration.

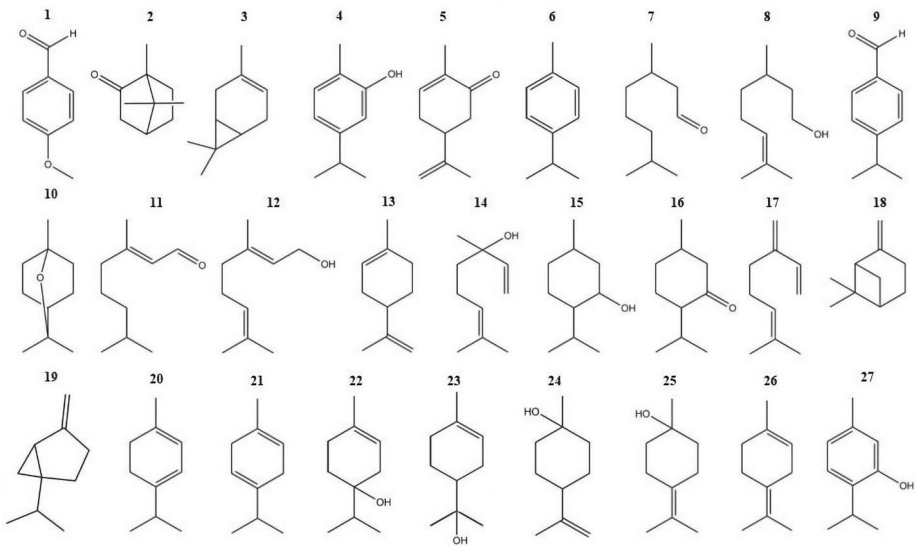


Figure 1. Chemical structure of evaluated terpenoids. (1) p-Anisaldehyde, (2) Canphor, (3) 3 Carene, (4) Carvacrol, (5) Carvone, (6) p-Cymene, (7) Citronellal, (8) β-Citronellol, (9) Cuminaldehyde, (10) Eucalyptol, (11) Geranial, (12) Geraniol, (13) Limonene, (14) Linalool, (15) Menthol, (16) Menthone, (17) β-Myrcene, (18) β-Pinene, (19) Sabinene, (20) α-Terpinene, (21) γ-Terpinene, (22) 4-Terpineol, (23) α-Terpineol, (24) β-Terpineol, (25) γ-Terpineol, (26) α Terpinolene, (27) Thymol.

To determine minimum inhibitory concentration values using the microdilution on microplate technique, we added to the microplate wells 100 µl of Sabouraud broth containing different concentrations of the selected compounds (1,250, 1,100, 1,000, 750, 500, 250, 100, 75, 50, and 25 µg/ml). Subsequently, 5 x 10^5 spores, suspended in 100 µl of Sabouraud broth, were added to the wells to obtain a final volume of 200 µl in each. The plates were incubated at 28 °C for 48 hours. Minimum inhibitory concentration corresponded to the highest without visible mold growth observed. Peripheral wells were filled with 200 µl sterile distilled water to minimize medium dehydration. The wells of column 11 were filled with 200 µl of medium and 500,000 spores, serving as positive controls for the experiment.

Minimum fungicidal concentration values were calculated by drawing 50 µl from the microwells without fungal growth and pouring them into a Petri dish with Sabouraud medium. We calculated the minimum fungicidal concentration as the one with no fungal growth. Each test was performed in triplicate.

In silico evaluations

The computational study was carried out with the methodology previously described (33,34). Structural, constitutional, physicochemical, and topological descriptors were generated using Dragon 5.4 software (35), and Koopman's theorem (36) was applied to calculate the chemical reactivity descriptors. All molecules were analyzed in the aqueous phase. The polarizable continuum model was used to model the solvent effects (37).

QSAR studies were carried out using all biological activities obtained from the *in vitro* tests and the calculated theoretical descriptors. The analysis was conducted using genetic algorithms with MobyDigs software (38). The quality of the model was considered statistically satisfactory based on the determination coefficient (R^2), leave-one-out cross-validated explained variance (Q^2), standard deviation (SD), and the ANOVA (F) of the model.

Results

Fungicidal activity

We evaluated the inhibitory and fungicidal activity of 27 terpenoids and structurally similar molecules that are major components of essential oils. The results showed that thymol exhibited the most relevant inhibitory activity, with a minimum inhibitory concentration of 91.6 ± 28.8 µg/ml for both *A. alternata* and *F. oxysporum* (table 1). Thymol was also the most relevant for its fungicidal effect, displaying slight differences in activity, with minimum fungicidal concentration values of 150 ± 28.8 µg/ml for *A. alternata* and 316.6 ± 57.7 µg/ml for *F. oxysporum* (table 2). Carvacrol, an isomer of thymol, was the compound with the second most relevant inhibitory and fungicidal activity, with a minimum inhibitory concentration of 200 ± 86.6 and 283 ± 86.6 µg/ml for *A. alternata* and *F. oxysporum*, respectively.

Most of the evaluated compounds presented minimum inhibitory concentrations between 500 and 900 µg/ml, while the minimum fungicidal concentrations ranged from 750 to over 1,000 µg/ml. Compounds displaying less activity were p-cymene for *Alternaria* spp. and citronellal for *Fusarium* spp. Tables 1 and 2 present the compounds' minimum inhibitory concentration and minimum fungicidal concentration values. The compounds are listed from the highest to the lowest antifungal activity to facilitate the analysis.

Table 1. Fungicidal activity of terpenoids and related compounds against *Alternaria alternata*. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) are expressed in µg/ml.

Alternaria alternata				
No.	**Compounds**	**MIC**	**MFC**	**Grouping**
T27	Thymol	91.6 ± 14.4	150 ± 28.8	I
T4	Carvacrol	200 ± 86.6	550 ± 86.6	HI
T1	Anisaldehyde	416.6 ± 57.7	683.3 ± 28.8	GH
T5	Carvone	416.6 ± 57.7	783.3 ± 57.7	GH
T17	β-Myrcene	466.6 ± 0.0	500 ± 0	FG
T22	4-Terpineol	466.7 ± 57.7	1000 ± 0	FG
T3	3-Carene	483.3 ± 28.8	966.6 ± 28.8	FG
T9	Cuminaldehyde	483.3 ± 28.8	966.6 ± 28.8	FG
T26	α-Terpinolene	483.3 ± 57.7	1,000 ± 0	FG
T23	α-Terpineol	483.3 ± 0	1,000 ± 0	FG
T2	Camphor	500 ± 0	950 ± 0	EFG
T12	Geraniol	516.6 ± 115.4	816.6 ± 115.4	EFG
T20	α-Terpinene	550 ± 0	1,000 ± 0	EFG
T24	β-Terpineol	550 ± 57.7	1,000 ± 0	EFG
T25	γ-Terpineol	633.3 ± 28.8	1,000 ± 0	DEFG
T15	Menthol	666.7 ± 28.8	983.3 ± 28.8	CDEFG
T21	γ-Terpinene	683.3 ± 28.8	1000 ± 0	CDEF
T11	Geranial	683.3 ± 28.8	966.6 ± 28.8	CDEF
T10	Eucalyptol	716.6 ± 28.8	983.3 ± 28.8	BCDEF
T8	β-Citronellol	750 ± 28.7	966.6 ± 28.8	BCDE
T14	Linalool	750 ± 28.8	966.6 ± 28.8	BCDE
T13	Limonene	816.6 ± 57.7	1,033.3 ± 57.7	ABCD
T19	Sabinene	883.3 ± 0	1000 ± 0	ABCD
T16	Menthone	883.3 ± 57.7	1,033.3 ± 57.7	ABCD
T7	Citronellal	900 ± 0	1,250 ± 0	ABC
T18	β-Pinene	966.8 ± 0	1,350 ± 0	AB
T6	p-Cymene	1,033.33 ± 0	1,250 ± 0	A

Grouping information was performed using the Tukey method and 95% confidence using the MIC values. Compounds that do not share a letter are significantly different.

Table 2. Fungicidal activity of terpenoids and related compounds against *Fusarium oxysporum*. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) are expressed in µg/ml.

Fusarium oxyporum				
No.	**Compounds**	**MIC**	**MFC**	**Grouping**
T27	Thymol	91.6 ± 28.8	316.6 ± 57.7	I
T4	Carvacrol	283.3 ± 86.6	400 ± 86.6	HI
T12	Geraniol	483.3 ± 57.7	783.3 ± 57.7	GH
T23	α-Terpineol	500 ± 144.3	916.7 ± 144.3	GH
T24	β-Terpineol	583.3 ± 0	1,000 ± 0	FG
T10	Eucalyptol	633.3 ± 57.7	1,033.3 ± 57.7	EFG
T20	α-Terpinene	650 ± 57.7	816.6 ± 57.7	EFG
T2	Camphor	650 ± 86.6	1,200 ± 86.6	EFG
T3	3-Carene	650 ± 86.6	1,200 ± 86.6	EFG
T17	β-Myrcene	666.6 ± 57.7	883.3 ± 57.7	EFG
T22	4-Terpineol	666.6 ± 57.7	1,033.3 ± 57.7	EFG
T11	Geranial	700 ± 0	1,000 ± 0	DEFG
T13	Limonene	716.6 ± 125.8	1,083.3 ± 125.8	CDEFG
T26	α-Terpinolene	750 ± 0	750 ± 0	BCDEFG
T21	γ-Terpinene	783.3 ± 0	1,000 ± 0	BCDEF
T15	Menthol	783.3 ± 57.7	1,066.6± 57.7	BCDEF
T25	γ-Terpineol	783.3 ± 0	1,000 ± 0	BCDEF
T14	Linalool	816.6 ± 57.7	1,033.3 ± 57.7	BCDEF
T9	Cuminaldehyde	833.3 ± 202.7	1,283.3 ± 125.8	BCDEF
T18	β-Pinene	866.6 ± 86.6	1,166.6 ± 125.8	BCDE
T16	Menthone	900 ± 186.6	1,083.3 ± 86.6	BCDE
T1	Anisaldehyde	950 ± 100	1,100 ± 100	ABCD
T19	Sabinene	950 ± 0	1,250 ± 0	ABCD
T5	Carvone	983.3 ± 0	1,250 ± 0	ABC
T6	p-Cymene	983.3 ± 0	1,250 ± 0	ABC
T8	β-Citronellol	1,000 ± 0	1,250 ± 0	AB
T7	Citronellal	1,200 ± 144.3	1,416.6 ± 125.8	A

Grouping information was performed using the Tukey method and 95% confidence using the MIC values. Compounds that do not share a letter are significantly different.

Table 3. Summary of the statistics of quantitative structure-property-fungicidal activity relationship models against *Alternaria alternata*

Statistical parameter	QSAR			QPAR		
	Model 1	Model 2	Model 3	Model 4	Model 5	Model 6
n	27	27	27	27	27	27
Q^2	67.8	66.7	59.21	73.21	70.2	68.9
R^2	82.65	82.52	82.31	87.78	86.98	85.87
F	19	18.9	18.6	23.8	21	20.8
SD	0.108	0.108	0.108	0.78	0.85	0.94
Descriptors	**Contributions**					
	Model 1	Model 2	Model 3	Model 4	Model 5	Model 6
nCt	0.0824	0.0687	WC	WC	WC	WC
nRCO	-0.1076	WC	WC	WC	WC	WC
nArOH	0.6793	0.5963	0.6687	WC	WC	WC
nOHt	-0.1487	-0.0904	-0.1304	WC	WC	WC
nArCHO	WC	0.1723	0.2026	WC	WC	WC
nCconj	WC	WC	0.08572	WC	WC	WC
UNIP	WC	WC	WC	0.0435	0.5847	0.0324
Ui	WC	WC	WC	0.293	0.2812	0.2627
Hy	WC	WC	WC	-0.4902	-0.5682	-0.4753
AMR	WC	WC	WC	-0.0275	WC	WC
J	WC	WC	WC	WC	-0.3045	WC
Qtot	WC	WC	WC	WC	WC	-0.1052
Intercept	2.7269	2.7483	2.9291	3.2548	2.3392	2.4404

n: Number of systems evaluated; Q^2: The square of the coefficient of cross-validation; R^2: The square of the correlation coefficient; F: Fisher statistic; SD: Standard deviation; WC: Without contribution; nCt: Number of total tertiary C (sp^3); nRCO: Number of ketones (aliphatic); nArOH: Number of aromatic hydroxyls; nOHt: Number of tertiary hydroxyl groups; nArCHO: Number of aromatic aldehydes; nCconj: Number of non-aromatic conjugated C (sp^2); UNIP: Unipolarity; Ui: Unsaturation index; Hy: Hhydrophilic factor; AMR: Ghose-Crippen molar refractivity; J: Balaban-like index; Qtot: Total absolute charge (electronic charge index-ECI)

Quantitative structure-activity relationship

Through a structure-property relationship approach, the present work generated mathematical models to determine the structure-property characteristics contributing to the inhibitory activity of terpenoids against *A. alternata* and *F. oxysporum*. For this, multiple linear regressions were generated using genetic algorithms with only structural descriptors (QSAR models) and incorporating topological, physicochemical, and chemical reactivity properties (QPAR models).

In the case of *A. alternata*, linear multiple regression models found a direct relationship between minimum inhibitory concentration values and phenolic groups, benzaldehydes, and the number of tertiary carbons, while their relationships with the number of ketonic groups and tertiary alcohols were indirectly proportional. Regarding the molecular properties, we observed that the topological descriptors unipolarity and the unsaturation index contributed to the inhibitory activity. In contrast, physicochemical properties, such as the hydrophilic factor, Ghose-Crippen molar refractivity, and total absolute charge, exhibited an inverse relationship with activity. Table 3 shows the contribution of each descriptor value. The quality of the model is indicated by its statistical values. A plot of the predicted *versus* experimental activity for molecules, using a training set for models of *A. alternata*, is shown in figure 2.

Models of the inhibitory activity of terpenic compounds and derivatives against *F. oxysporum* yielded similarities to the activity against *A. alternata*. First, the structural components that contribute the most to the inhibitory activity are the phenolic groups, but in this case, the number of conjugated non-aromatic carbons is more relevant than the benzaldehydes. Regarding

molecular properties, the topological descriptors unipolarity and unsaturation index also contribute to the inhibitory activity. However, the models for *F. oxysporum* showed that the Ghose-Crippen octanol-water partition coefficient is the physicochemical property that contributes the most, while the hydrophilic factor and the Ghose-Crippen molar refractivity descriptors continue to have an indirect relationship with the minimum inhibitory concentration. A plot of the predicted *versus* experimental activity for molecules, using a training set for *F. oxysporum* models, is shown in figure 3. The statistics of the models generated by the analysis of the genetic algorithms are shown in table 4.

A complete theoretical characterization of the evaluated molecules, with the precise value of each descriptor incorporated into the QSAR models, has been previously reported (33).

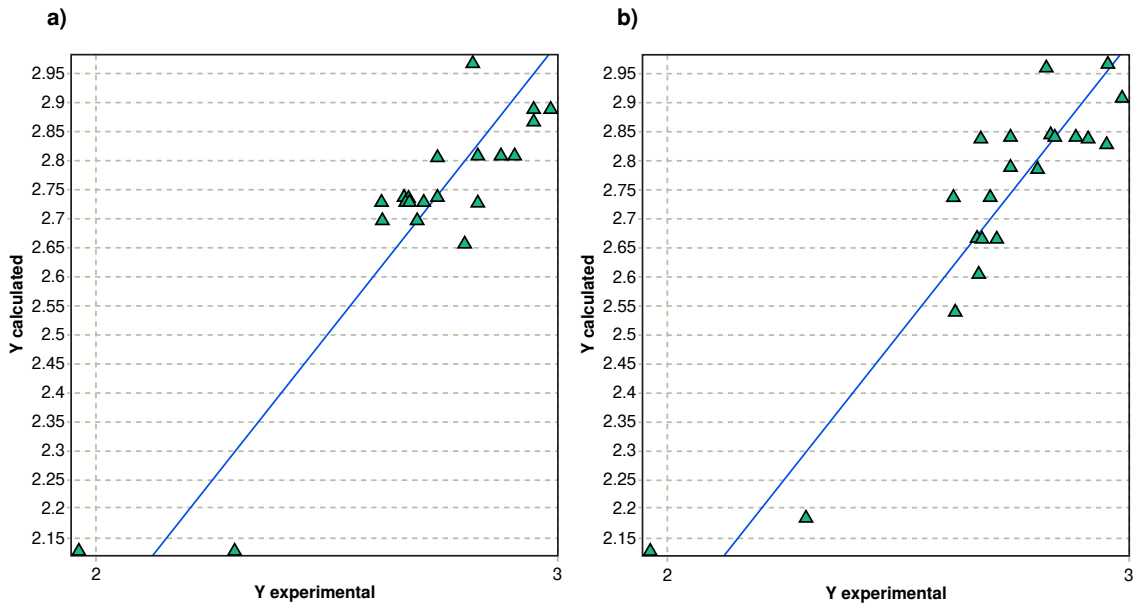


Figure 2. Predicted *versus* experimental activity against *Alternaria alternata* from (a) quantitative structure-activity relationship, and (b) quantitative property-activity relationship models.

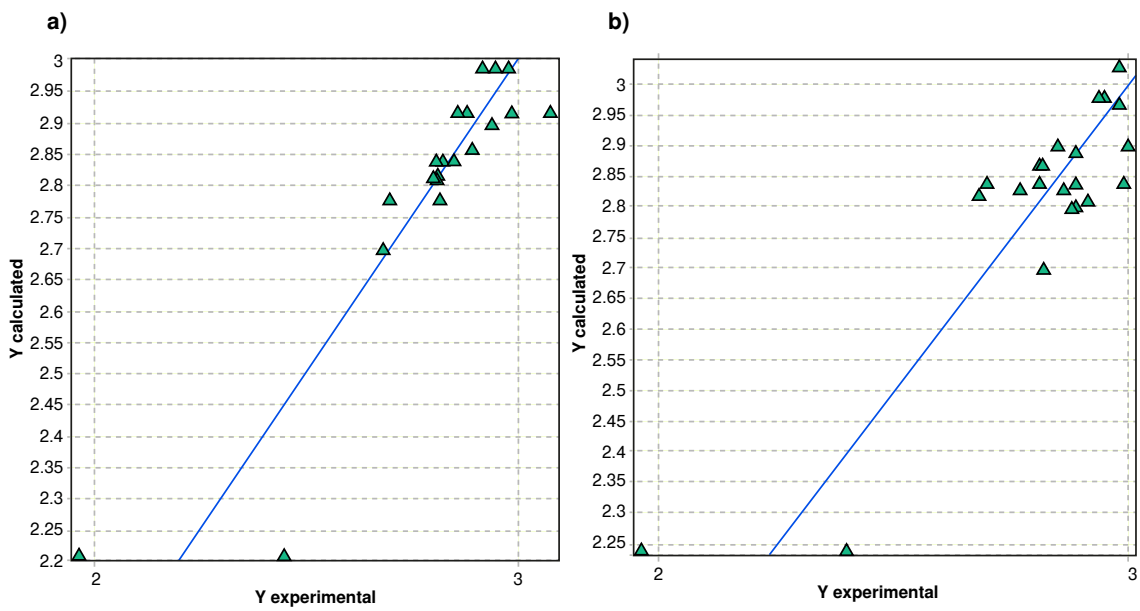


Figure 3. Predicted versus experimental activity against *Fusarium oxysporum* from (a) quantitative structure-activity relationship, and (b) quantitative property-activity relationship models

Table 4. Summary of the statistics of quantitative structure-property-larvicidal activity relationship models against *Fusarium oxysporum*.

Statistical parameter	QSAR			QPAR		
	Model 1	Model 2	Model 3	Model 4	Model 5	Model 6
n	27	27	27	27	27	27
Q^2	68.48	68.48	61.74	64.66	64.25	60.9
R^2	83.6	83.6	82.55	83.54	82.2	80.94
F	20.4	20.4	18.9	18.9	17.6	12.7
SD	0.105	0.105	0.109	0.123	0.123	0.126
Descriptors	**Contributions**					
	Model 1	Model 2	Model 3	Model 4	Model 5	Model 6
nCt	0.09185	WC	0.0525	WC	WC	WC
nRCO	WC	-0.1018	WC	WC	WC	WC
nArOH	0.7896	0.7896	0.668	WC	WC	WC
nOHt	-0.13508	-0.13508	WC	WC	WC	WC
nArCHO	WC	WC	0.149	WC	WC	WC
nCconj	0.0794	0.0794	0.0549	WC	WC	WC
UNIP	WC	WC	WC	0.0535	0.5652	WC
Ui	WC	WC	WC	0.1909	0.2538	0.2234
AlogP	WC	WC	WC	0.2492	WC	0.2591
Hy	WC	WC	WC	WC	-0.4842	WC
AMR	WC	WC	WC	-0.0394	-0.0437	-0.0484
Pol	WC	WC	WC	WC	WC	-0.0453
Intercept	2.9946	2.9946	3.0307	4.2175	3.7956	4.0975

n: Number of systems evaluated; Q^2: The square of the coefficient of cross-validation; R^2: The square of the correlation coefficient; F: Fisher statistic; SD: Standard deviation; WC: Without contribution; nCt: Number of total tertiary C (sp^3); nRCO: Number of ketones (aliphatic); nArOH: Number of aromatic hydroxyls; nOHt: Number of tertiary hydroxyl groups; nArCHO: Number of aromatic aldehydes; nCconj: Number of non-aromatic conjugated C (sp^2); UNIP: Unipolarity; Ui: Unsaturation index; AlogP: Ghose-Crippen octanol-water partition coefficient; Hy: Hydrophilic factor; AMR: Ghose-Crippen molar refractivity; Pol: Number of polarity

Discussion

In the second half of the 20th. century, the prevalence of fungal infections steadily increased due to a higher number of immunosuppressed patients and the generalization of diagnostic practices and aggressive therapies (39). Although information on diseases caused by filamentous fungi is limited, reports of infections by fungi belonging to the *genus Aspergillus* are more frequent (40). However, the incidence of infections by other *genera*, including *Fusarium* and *Alternaria* (41), has increased in recent years.

New pathogenic fungal species have recently been described, and invasive fungal infections with *in vitro* resistance to antifungals, that were previously nonpathogenic or only caused superficial infections, are becoming more frequent (42).

In the search for new agents with antimicrobial activity, essential oils provide a potential alternative for controlling pathogenic microorganisms. Essential oils and their components have been extensively studied as antibacterial and antifungal agents in the food safety context and are being widely explored as insecticidal agents (43). However, it was not until the last decade that researchers studied their antimicrobial properties from a medicinal chemistry point of view by integrating them into studies of rational design, elucidating their mechanisms of action, and evaluating their antimicrobial activities using *in vitro*, *in silico*, and *in vivo* models.

Essential oils may represent one of the most promising natural products for fungal inhibition (44). Essential oils obtained from different plants or herbs have been reported to exhibit relevant antifungal properties, and many of them are classified as “Generally Recognized as Safe” (GRAS) by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) (45).

Essential oils are not pure subtances so it is difficult to determine their mechanisms of action. However, their antimicrobial properties are related to their terpenic constituents since these lipophilic and low-molecular-weight compounds can alter the cell membrane and wall, thus inhibiting fungal sporulation and germination (16).

Accordingly, in this study, we evaluated the *in vitro* antifungal activity of the 27 constituent compounds of essential oils, including terpenoids and other structurally similar molecules. The results allowed us to recognize ten compounds with minimum inhibitory concentrations below 500 µg/ml for *A. alternata.* For *F. oxysporum*, only three compounds had inhibitory values under this range, indicating the higher sensitivity of the *Alternaria genus* to the terpenoids presence.

The results for both microorganisms quantitatively demonstrate that phenolic groups contribute to antifungal activity, with thymol and carvacrol being the most significant. These two compounds are abundantly present in oregano and thyme essential oils. For example, the efficacy of the essential oil derived from the Mexican oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) has been evaluated against *Penicillium*, *Geotrichum*, *Aspergillus*, and *Rhizopus* (46,47), and again, the phenolic compounds carvacrol and thymol are mainly responsible for the antifungal activity (48,49). Other studies showed that thyme essential oil and thymol display relevant antifungal activities against *A. alternata*, inhibiting mycelial growth (50) at minimum inhibitory concentrations below 200 µg/ml (51).

Other studies evidenced the *in vitro* antifungal activity of thymol on *Fusarium* spp. A recent study showed that thymol can inhibit the mycelial growth of *F. oxysporum*, finding a half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of 26.4 mg/L. This same study reported an 80% reduction of *F. oxysporum* germination induced by a thymol concentration of 60 mg/L (52). Another study found thymol-induced inhibition of conidia production and *Fusarium graminearum* hyphae growth at a mean effective concentration (EC_{50}) of 26.3 µg/ml for 59 isolates of this microorganism (53).

As mentioned, the results obtained from the QSAR models showed the importance of the phenol group in antifungal activity. This finding was confirmed in the activity differences between thymol and carvacrol compared to other aromatic compounds. A relevant difference in activity was observed when compared to its precursor, p-cymene. It has a benzene group but lacks the hydroxyl to form a phenol.

The importance of the phenolic group can be appreciated when comparing the activity of thymol with menthol since both compounds have the hydroxyl group in the same position. However, menthol lacks the aromatic ring to form the phenol, resulting in decreased antifungal activity.

The hydroxyl group position in the phenol has relevant ramifications for biological activity: When it is in the meta position, it displays more significant antifungal activity than in the ortho position. This activity difference, with thymol having more antifungal activity than carvacrol, has also been reported against *Botrytis cinerea, Colletotrichum acutatum, Botryodiplodia theobromae*, and *Aspergillus niger* (54-56).

Another structural characteristic related to the antifungal activity is observed when the hydroxyl groups (nOH) are replaced by ketone groups

(nCO). The QSAR models showed that the ketone groups have an indirect relationship with biological activity, becoming evident when analyzing how the minimum inhibitory concentration and minimum fungicidal concentration values for geraniol, citronellol, and menthol increase in comparison with geranial, citronellal, and menthone. In particular, the five compounds with the most significant activity against *F. oxysporum* have phenolic and hydroxyl groups.

However, in the case of *A. alternata*, carvone is a rule exception since it contains a ketone group but is the fourth compound with the greatest antifungal activity. A possible explanation is the presence of conjugated non-aromatic carbons (nCconj), and their unsaturation index (Ui), considered by the QSAR models as relevant structural and topological features in antifungal activity. Although myrcene is the compound found to have the fifth highest activity level against *A. alternata*, it does not have a hydroxyl group. However, the carbon conjugation, its unsaturation index, and its lipophilicity values can be related to its biological activity.

Another relevant structural feature in biological activity considered by the QSAR models is the presence of the benzaldehyde group. It was observed how anisaldehyde and cuminaldehyde exhibited relevant activity against *A. alternata*, both with minimum inhibitory concentrations below 500 µg/ml. However, in the case of *F. oxysporum*, these compounds presented activities above 800 µg/ml.

In contrast, Ghose-Crippen octanol-water partition coefficient (AlogP) and topological descriptors, such as UNIP and Ui, contributed directly.

Regarding the molecular properties related to antifungal activity, those descriptors associated with the molecule's polarity, such as the Ghose-Crippen molar refractivity (AMR), the total absolute charge (Qtot), or the hydrophilic factor (HY) (such as AMR, Qtot, or Hy), were found to be only indirectly related. In contrast, the Ghose-Crippen octanol-water partition coefficient (AlogP) and topological descriptors, such as unipolarity (UNIP) and unsaturation index (UI), contributed directly. Molecular hydrophobicity, usually quantified as logP (the logarithm of the 1-octanol-water partition coefficient), is an important molecular characteristic in drug discovery. Ghose-Crippen octanol-water partition coefficient (AlogP) is one of the most widely used methods for estimating logP. This descriptor plays a significant role in the mechanism of action of essential oils.

The hypotheses suggest that the hydrophobic character of terpenes and their derivatives allows them to accumulate in the cellular lipid bilayer and generate changes in its permeability, causing the subsequent death of the microorganism (57). Likewise, its lipophilic character could alter the synthesis of ergosterol or α-glucans, inhibiting the formation of the cell membrane and wall (58). However, essential oils and their constituents have other effects, such as forming reactive oxygen species, inhibiting efflux pumps, and causing the dysfunction of fungal mitochondria (59,60). In the case of *F. oxysporum*, thymol induces the accumulation of superoxide radicals with a consequent increase in the activity of antioxidant enzymes and lipid peroxidation (61).

Despite the current evidence, we need more research to elucidate the cellular effects and potential biological targets behind the antifungal activity of essential oils and their constituents. Molecular modeling tools help to reduce the time and costs required to reveal the structural and molecular properties behind the antifungal activity and its mechanism of action. Therefore, it is

proposed that future research continue the study of thymol and carvacrol using the tools of screening and molecular dynamics to identify possible biological targets and the generation of analogous compounds under the rational design. At the same time, more experimentation is required on these compounds' effects on *Alternaria* spp. since most of the found reports focus on *Fusarium* spp. or other *genera*, such as *Aspergillus* spp., *Penicillum* spp., or *Candida* spp.

The present study demonstrated the antifungal activity of terpenoid compounds against *A. alternata* and *F. oxysporum*, contributing to the identification of the structural characteristics required for these compounds to exert their antifungal action. The obtained experimental evidence and the proposed mathematical models provide promising tools for developing new antifungal agents, mainly derivatives of phenolic terpenoids, such as thymol and carvacrol. However, it remains necessary to continue experimental and computational studies to optimize the potential of such compounds and elucidate their mechanisms of action.

References

1. Wolters PJ, Faino L, van Den Bosch TB, Evenhuis B, Visser RG, Seidl MF, *et al.* Gapless genome assembly of the potato and tomato early blight pathogen *Alternaria solani*. Mol Plant Microbe Interact. 2018;31:692-4. https://doi.org/10.1094/MPMI-12-17-0309-A
2. Edel-Hermann V, Lecomte C. Current status of *Fusarium oxysporum Formae Speciales* and races. Phytopathology. 2019;109:512-30. https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-18-0320-RVW
3. Didehdar M, Khoshbayan A, Vesal S, Darban-Sarokhalil D, Razavi S, Chegini Z, *et al.* An overview of possible pathogenesis mechanisms of *Alternaria alternata* in chronic rhinosinusitis and nasal polyposis. Microb Pathog. 2021;155:104905. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.104905
4. Velázquez-Contreras F, Acevedo-Parra H, Nuño-Donlucas SM, Núñez -Delicado E, Gabaldón JA. Development and characterization of a biodegradable PLA food packaging hold monoterpene–cyclodextrin complexes against *Alternaria alternata*. Polymers. 2019;11:1720. https://doi.org/10.3390/polym11101720
5. Dallé da Rosa P, Aquino V, Fuentefría AM, Goldani LZ. Diversity of *Fusarium* species causing invasive and disseminated infections. J Mycol Med. 2021;31:101137. https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2021.101137
6. Chilaka CA, De Boevre M, Atanda OO, De Saeger S. The status of *Fusarium* mycotoxins in sub-Saharan Africa: A review of emerging trends and postharvest mitigation strategies towards food control. Toxins. 2017;9:19. https://doi.org/10.3390/toxins9010019
7. Tewoldemedhin YT, Mazzola M, Botha WJ, Spies CF, McLeod A. Characterization of fungi (*Fusarium* and *Rhizoctonia*) and oomycetes (*Phytophthora* and *Pythium*) associated with apple orchards in South Africa. Eur J Plant Pathol. 2011;130:215-29. https://doi.org/10.1007/s10658-011-9747-9
8. Oli N, Singh UK, Jha SK. Antifungal activity of plant's essential oils against post-harvest fungal disease of apple fruit. Forestry. Int J For Res Nepal. 2019;16:86-100. https://doi.org/10.3126/forestry.v16i0.28361
9. Ouda SM. Antifungal activity of silver and copper nanoparticles on two plant pathogens, *Alternaria alternata* and *Botrytis cinerea*. Res J Microbiol. 2014;9:3442.
10. Lamsal K, Kim SW, Jung JH, Kim YS, Kim KS, Lee YS. Application of silver nanoparticles for the control of *Colletotrichum* species *in vitro* and pepper anthracnose disease in field. Mycobiology. 2011;39:194-9. https://doi.org/10.5941/MYCO.2011.39.3.194
11. Miles TD, Miles LA, Fairchild KL, Wharton PS. Screening and characterization of resistance to succinate dehydrogenase inhibitors in *Alternaria solani*. Plant Pathology. 2014;63:155-64. https://doi.org/10.1111/ppa.12077
12. Lucas JA, Hawkins NJ, Fraaije BA. The evolution of fungicide resistance. Adv Appl Microbiol. 2015;90:29-92. https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2014.09.001

13. Neoh CF, Leung L, Vajpayee RB, Stewart K, Kong DC. Treatment of *Alternaria keratitis* with intrastromal and topical caspofungin in combination with intrastromal, topical, and oral voriconazole. Ann Pharmacother. 2011;45:e24. https://doi.org/10.1345/aph.1P586

14. Al-Hatmi AM, van Diepeningen AD, Curfs-Breuker I, de Hoog GS, Meis JF. Specific antifungal susceptibility profiles of opportunists in the *Fusarium fujikuroi* complex. J Antimicrob Chemother. 2014;70:1068-71. https://doi.org/10.1093/jac/dku505

15. Al-Hatmi AM, Meis JF, de Hoog GS. Fusarium: Molecular diversity and intrinsic drug resistance. PLoS Pathog. 2016;12:e1005464. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005464

16. Nazzaro F, Fratianni F, Coppola R, Feo VD. Essential oils and antifungal activity. Pharmaceuticals (Basel). 2017;10:86. https://doi.org/10.3390/ph10040086

17. Debonne E, van Bockstaele F, De Leyn I, Devlieghere F, Eeckhout M. Validation of *in-vitro* antifungal activity of thyme essential oil on *Aspergillus niger* and *Penicillium paneum* through application in par-baked wheat and sourdough bread. LWT Food Sci Technol. 2018;87:368-78. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.09.007

18. Mandras N, Nostro A, Roana J, Scalas D, Banche G, Ghisetti V, *et al.* Liquid and vapour-phase antifungal activities of essential oils against *Candida albicans* and non-*albicans Candida*. BMC Complement Med Ther. 2016;16:330. https://doi.org/10.1186/s12906-016-1316-5

19. Mokbel AA, Alharbi AA. Antifungal effects of basil and camphor essential oils against *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. Aust J Crop Sci. 2015;9:532. https://doi.org/10.3316/INFORMIT.298113037575673

20. Bahraminejad S, Seifolahpour B, Amiri R. Antifungal effects of some medicinal and aromatic plant essential oils against *Alternaria solani*. J Crop Prot. 2017;5:603-16.

21. Roselló J, Sempere F, Sanz-Berzosa I, Chiralt A, Santamarina MP. Antifungal activity and potential use of essential oils against *Fusarium culmorum* and *Fusarium verticillioides*. J Essent Oil-Bear Plants. 2015;18:359-67. https://doi.org/10.1080/0972060X.2015.1010601

22. Sharma A, Rajendran S, Srivastava A, Sharma S, Kundu B. Antifungal activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* 1322, with emphasis on *Syzygium aromaticum* essential oil. J Biosci Bioeng. 2017;123:308-13. https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.09.011

23. Cavaleiro C, Salgueiro L, Gonçalves MJ, Hrimpeng K, Pinto J, Pinto E. Antifungal activity of the essential oil of *Angelica major* against *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* and dermatophyte species. J Nat Med. 2015;69:241-8. https://doi.org/10.1007/s11418-014-0884-2

24. Basak S, Guha P. Use of predictive model to describe sporicidal and cell viability efficacy of betel leaf (*Piper betle* L.) essential oil on *Aspergillus flavus* and *Penicillium expansum* and its antifungal activity in raw apple juice. LWT Food Sci Technol. 2017;80:510-6. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.03.024

25. Pinto E, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Salgueiro L. Antifungal activity of *Thapsia villosa* essential oil against *Candida*, *Cryptococcus*, *Malassezia*, *Aspergillus* and *Dermatophyte* species. Molecules. 2017;22:1595. https://doi.org/10.3390/molecules22101595

26. Rao J, Chen B, McClements DJ. Improving the efficacy of essential oils as antimicrobials in foods: Mechanisms of action. Annu Rev Food Sci Technol. 2019;10:365-87. https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121727

27. Surabhi S, Singh BK. Computer aided drug design: An overview. J Drug Deliv Ther. 2018;8:504-9. https://doi.org/10.22270/jddt.v8i5.1894

28. Medina-Franco JL. Grand challenges of computer-aided drug design: The road ahead. Front Drug Des Discov. 2021;1:728551. https://doi.org/10.3389/fddsv.2021.728551

29. Toropov AA, Toropova AP. QSPR/QSAR: State-of-art, weirdness, the future. Molecules. 2020;25:1292. https://doi.org/10.3390/molecules25061292

30. Achary PG. Applications of quantitative structure–activity relationships (QSAR) based virtual screening in drug design: A review. Mini-Rev Med Chem. 2020;20:1375-88. https://doi.org/10.2174/1389557520666200429102334

31. Rasooli I, Mirmostafa SA. Bacterial susceptibility to and chemical composition of essential oils from *Thymus kotschyanus* and *Thymus persicus*. J Agric Food Chem. 2003;51:2200-5. https://doi.org/10.1021/jf0261755

32. Rasooli I, Fakoor MH, Yadegarinia D, Gachkar L, Allameh A, Rezaei MB. Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils. Int J Food Microbiol. 2008;122:135-9. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.048

33. Andrade-Ochoa S, Correa-Basurto J, Rodríguez-Valdez LM, SánchezTorres LE, Nogueda-Torres B, Nevárez-Moorillón GV. *In vitro* and *in silico* studies of terpenes, terpenoids and related compounds with larvicidal and pupaecidal activity against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: *Culicidae*). Chem Cent J. 2018;12:53. https://doi.org/10.1186/s13065-018-0425-2

34. Andrade-Ochoa S, García-Machorro J, Bello M, Rodríguez-Valdez LM, Flores-Sandoval CA, Correa-Basurto J. QSAR, DFT and molecular modeling studies of peptides from HIV-1 to describe their recognition properties by MHC-I. J Biomol Struct Dyn. 2018;36:2312-30. https://doi.org/10.1080/07391102.2017.1352538

35. Todeschini R. (2006). Molecular descriptors, QSAR, chemometrics and chemoinformatics – Dragon software for Windows (Version 5.4) [Windows]. Milano: Talete SRL. Available at: http://www.talete.mi.it/

36. Koopmans T. Über die zuordnungwellenfunktionen von und zuden eigenwerteneinzelnen elektronenátomoseines. Physica. 1934;1:104-13.

37. Miertus S, Scrocco E, Tomasi J. Electrostatic interaction of a solute with a continuum. A direct utilization of AB initio molecular potentials for the prevision of solvent effects. Chem Phys. 1981;55:117-29. https://doi.org/10.1016/0301-0104(81)85090-2

38. Todeschini R, Consonni V, Mauri A, Pavan M. MobyDigs software for regression and classification models by genetic algorithms. Data Handling Sci Technol. 2003;23:141-67. https://doi.org/10.1016/S0922-3487(03)23005-7

39. García-Ruiz JC, Amutio E, Pontón J. Infección fúngica invasora en pacientes inmunodeficientes. Rev Iberoam Micol. 2004;21:55-62.

40. Holding KJ, Dworkin MS, Wan PCT, Hanson DL, Klevens RM, Jones JL, *et al.* Adult and adolescent spectrum of HIV disease project. Aspergillosis among people infected with human immunodeficiency virus: Incidence and survival. Clin Infect Dis. 2000;31:1253-7. https://doi.org/10.1086/317452

41. Fraeyman S, Croubels S, Devreese M, Antonissen G. Emerging *Fusarium* and *Alternaria* mycotoxins: Occurrence, toxicity and toxicokinetics. Toxins. 2017;9:228. https://doi.org/10.3390/toxins9070228

42. Gnat S, Łagowski D, Nowakiewicz A, Dyląg M. A global view on fungal infections in humans and animals: Opportunistic infections and microsporidioses. J Appl Microbiol. 2021;131:2095-113. https://doi.org/10.1111/jam.15032

43. Bassolé IHN, Juliani HR. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. Molecules. 2012;17:3989-4006. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.179

44. Hu Y, Zhang J, Kong W, Zhao G, Yang M. Mechanisms of antifungal and anti-aflatoxigenic properties of essential oil derived from turmeric (*Curcuma longa* L.) on *Aspergillus flavus*. Food Chem. 2017;220:1-8. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.179

45. Batista BG, Chaves MAD, Reginatto P, Saraiva OJ, Fuentefría AM. Human fusariosis: An emerging infection that is difficult to treat. Rev Soc Bras Med Trop. 2020;53. https://doi.org/10.1590/0037-8682-0013-2020

46. Portillo-Ruiz MC, Viramontes-Ramos S, Muñoz-Castellanos LN, Gastelum-Franco MG, Nevárez-Moorillón GV. Antifungal activity of Mexican oregano (*Lippia berlandieri* Shauer). J Food Prot. 2005;68:2713-7. https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.12.2713

47. Ávila-Sosa R, Gastélum-Franco MG, Camacho-Dávila A, Torres-Muñoz JV, Nevárez-Moorillón GV. Extracts of Mexican oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) with antioxidant and antimicrobial activity. Food Bioproc Tech. 2010;3:434-40. https://doi.org/10.1007/s11947-008-0085-7

48. Portillo-Ruiz MC, Sánchez RAS, Ramos SV, Muñoz JVT, NevárezMoorillón GV. Antifungal effect of Mexican oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) essential oil on a wheat flour-based Medium. J Food Sci. 2012;77. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02821.x

49. Andrade-Ochoa S, Chacón-Vargas KF, Sánchez-Torres LE, RiveraChavira BE, Nogueda-Torres B, Nevárez-Moorillón GV. Differential antimicrobial effect of essential oils and their main components: Insights based on the cell membrane and external structure. Membranes. 2021;11:405. https://doi.org/10.3390/membranes11060405

50. Hadizadeh I, Peivastegan B, Hamzehzarghani H. Antifungal activity of essential oils from some medicinal plants of Iran against *Alternaria alternata*. Am J Appl Sci. 2009;6:857-61. https://doi.org/10.3844/ajassp.2009.857.861

51. Perina FJ, Amaral DC, Fernandes RS, Labory CR, Teixeira GA, Alves E. *Thymus vulgaris* essential oil and thymol against *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler: Effects on growth, viability, early infection and cellular mode of action. Pest Manag Sci. 2015;71:1371-8. https://doi.org/10.1002/ps.3933

52. Liu Y, Liu S, Luo X, Wu X, Ren J, Huang X, *et al.* Antifungal activity and mechanism of thymol against *Fusarium oxysporum*, a pathogen of potato dry rot, and its potential application. Postharvest Biol Technol. 2022;192:112025. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2022.112025

53. Gao T, Zhou H, Zhou W, Hu L, Chen J, Shi Z. The fungicidal activity of thymol against *Fusarium graminearum* via inducing lipid peroxidation and disrupting ergosterol biosynthesis. Molecules. 2016;21:770. https://doi.org/10.3390/molecules21060770

54. Numpaque MA, Oviedo LA, Gil JH, García CM, Durango DL. Thymol and carvacrol: Biotransformation and antifungal activity against the plant pathogenic fungi *Colletotrichum acutatum* and *Botryodiplodia theobromae*. Trop Plant Pathol. 2011;36:313. https://doi.org/10.1590/S1982-56762011000100001

55. Moghtader M. Antifungal effects of the essential oil from *Thymus vulgaris* L. and comparison with synthetic thymol on *Aspergillus niger*. J Yeast Fungal Res. 2012;3:83-8. https://doi.org/0.5897/JYFR12.023

56. Zhang J, Ma S, Du S, Chen S, Sun H. Antifungal activity of thymol and carvacrol against postharvest pathogens *Botrytis cinerea*. J Food Sci Technol. 2019;56:2611-20. https://doi.org/10.1007/s13197-019-03747-0

57. Chen Y, Zeng H, Tian J, Ban X, Ma B, Wang Y. Antifungal mechanism of essential oil from *Anethum graveolen*s seeds against *Candida albicans*. J Med Microbiol. 2013;62:1175-83. https://doi.org/10.1099/jmm.0.055467-0

58. Ahmad A, Khan A, Kumar P, Bhatt RP, Manzoor N. Antifungal activity of *Coriaria nepalensis* essential oil by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. Yeast. 2011;28:611-7. https://doi.org/10.1002/yea.1890

59. Shen Q, Zhou W, Li H, Hu L, Mo H. ROS involves the fungicidal actions of thymol against spores of *Aspergillus flavus* via the induction of nitric oxide. PLoS ONE. 2016;11:e0155647. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155647

60. Haque E, Irfan S, Kamil M, Sheikh S, Hasan A, Ahmad A, *et al.* Terpenoids with antifungal activity trigger mitochondrial dysfunction in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology. 2016;85:436-43. https://doi.org/10.1134/S0026261716040093

61. Hao Y, Zhang J, Sun C, Chen X, Wang Y, Lu H, *et al.* Thymol induces cell death of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* via triggering superoxide radical accumulation and oxidative injury *in vitro*. Agronomy. 2023;13:189. https://doi.org/10.3390/agronomy13010189

Biomédica 2023;43(Supl.1):170-80
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.6874

Original article

Fast and cost-effective protocol to produce *Paracoccidioides* spp. antigens

Karolina Rosa Fernandes-Beraldo[1,2], Roseli Santos de Freitas-Xavier[3], Adriana Pardini-Vicentini[2,4]

[1] Laboratório Central, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brasil
[2] Programa de Pós-Graduação em Ciências, Coordenadoria de Controle de Doenças, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, São Paulo, Brasil
[3] Laboratório de Micologia Médica (LIM53), Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil
[4] Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses, Centro de Imunologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil

Introduction. The existing methods for *Paracoccidioides* spp. antigen production are problematic in terms of standardization, specificity, stability, repeatability, and reproducibility.
Objective. To optimize the methodology for *Paracoccidioides* spp. antigen production and evaluate its applicability in paracoccidioidomycosis immunodiagnosis.
Materials and methods. The antigens were obtained from *Paracoccidioides lutzii* isolates (01, 66, and 8334), *Paracoccidioides brasiliensis sensu stricto* (113), and *Paracoccidioides restripiensis* (B-339). These fungi were grown at 36 °C ± 1 °C, on modified Fava-Netto agar, according to Freitas *et al.* (2018). *Paracoccidioides lutzii* antigens were obtained after 5, 10, and 20 days of culture, whereas *P. brasiliensis* and *P. restripiensis* antigens were obtained after 10 days. Antigens were evaluated *in natura*, 10 and 20 times concentrated. Antigenic capacity was evaluated using a double immunodiffusion assay against serum samples from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, and aspergillosis, and random blood donors.
Results. Cross-reactivity between *Paracoccidioides* spp. antigens was observed when *P. brasiliensis*, *P. restrepiensis antigens, and P. lutzii* antigens were evaluated with the polyclonal antibodies against *P. lutzii* and *P. brasiliensis,* respectively. No cross-reactivity was obtained for polyclonal antibodies against *Histoplasma capsulatum*, *Aspergillus fumigatus,* and random blood donors. The proposed protocol allowed stable, repeatable, and reproducible genus-specific antigen production at a low cost and in a short cultivation time.
Conclusion. The proposed protocol allowed us to obtain genus-specific antigens that can be developed and reproduced in all laboratories in Brazil and South America, where paracoccidioidomycosis is a neglected disease, contributing to an early diagnosis, especially in endemic regions, regardless of the species.

Keywords. *Paracoccidioides*; paracoccidioidomycosis; antigens; immunologic tests.

Protocolo rápido y económico para la producción de antígenos de *Paracoccidioides* spp.

Introducción. Los métodos existentes para la producción de los antígenos de *Paracoccidioides* spp. son problemáticos en su estandarización, especificidad, estabilidad, repetibilidad y reproducibilidad.
Objetivo. Optimizar la metodología para la producción de antígenos de *Paracoccidioides* spp. y evaluar su aplicabilidad en el inmunodiagnóstico de la paracoccidioidomicosis.
Materiales y métodos. Los antígenos se obtuvieron de aislamientos de *P. lutzii* (01, 66 y 8334), *P. brasiliensis sensu stricto* (113) y *P. restripiensis* (B-339). Estos hongos se cultivaron a 36 °C ± 1 °C en agar Fava-Netto modificado, según Freitas *et al.* (2018). Los antígenos de *P. lutzii* se obtuvieron a los 5, 10 y 20 días de cultivo y los antígenos de *P. brasiliensis* y *P. restripiensis* se obtuvieron a los 10 días. Los antígenos se evaluaron *in natura*, concentrados 10 y 20 veces. La capacidad antigénica se evaluó mediante un ensayo de inmunodifusión doble con muestras de suero de pacientes con paracoccidioidomicosis, histoplasmosis, aspergilosis y donantes de sangre aleatorios.
Resultados. Se observó reacción cruzada con *Paracoccidioides* spp. cuando se evaluaron los antígenos de *P. brasiliensis, P. restrepiensis* y *P. lutzii* frente a los anticuerpos policlonales contra *P. lutzii* y *P. brasiliensis*, respectivamente. No hubo reactividad cruzada con los anticuerpos policlonales contra *Histoplasma capsulatum* y *Aspergillus fumigatus,* ni contra los donantes de sangre aleatorios. El protocolo propuesto permitió la producción estable, repetible y reproducible de antígenos dirigidos de un género específico (*Paracoccidiodes*) en un tiempo corto de cultivo y a un menor costo.
Conclusión. El protocolo propuesto permitió obtener antígenos específicos de un género, que pueden ser desarrollados y reproducidos en todos los laboratorios de

Received: 02/02/2023
Accepted: 05/05/2023
Published: 10/05/2023

Citation:
Fernandes-Beraldo KR, Santos de Freitas-Xavier R, Pardini-Vicentini A. Fast and cost-effective protocol to produce *Paracoccidioides* spp. antigens. Biomédica. 2023;43(Supl.1):170-80.
https://doi.org/10.7705/biomedica.6874

Corresponding author:
Adriana Pardini-Vicentini, Av. Dr. Arnaldo, 351, 11º andar, CEP 01246-000, Pacaembu, São Paulo, SP, Brasil
Telephone: (+55-11) 3068-2898
adriana.vicentini@ial.sp.gov.br

Author's contributions:
Karolina Rosa Fernandes-Beraldo conducted the laboratory evaluations and drafted the first version of the manuscript.
Adriana Pardini-Vicentini and Roseli Santos de Freitas-Xavier critically reviewed the text.
All authors read and approved the final manuscript.

Funding:
This study was supported by the Adolfo Lutz Institute (CTC-IAL#43-D/2011). Karolina Rosa Fernandes-Beraldo received grants from the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES).

Conflicts of interest:
None

Brasil y Surámerica donde la paracoccidioidomicosis es una enfermedad endémica y desatendida. Estos antígenos pueden contribuir al diagnóstico precoz de la infección, independientemente de la especie.

Palabras clave: *Paracoccidioides*; paracoccidioidomicosis; antígenos; pruebas inmunológicas.

Paracoccidioidomycosis is the most important systemic mycosis in South America. It is caused by thermally dimorphic fungi belonging to the genera *Paracoccidioides* (1-3). Approximately 80% of these cases were described in Brazil, followed by Colombia, Venezuela, and Argentina (4).

This mycosis presents a broad spectrum of clinical manifestations and occurs more frequently in males than females. The ratio is 1.7:1.0 among patients with the acute/subacute form and 22:1among those with the chronic form of the disease, affecting people aged 30 to 60 years, mostly in rural areas (5).

The definitive diagnosis of *Paracoccidioides* spp. infection is based on direct microscopic examination of biological specimens and their culturing, followed by macro- and microscopic observation for fungus identification (2,6). However, these procedures are insensitive and time-consuming, and it is difficult to obtain clinical specimens (7). In contrast, serological assays have played an important role in the early diagnosis of paracoccidioidomycosis and in monitoring its evolution and response to treatment (6-9). The standard serological assay involves double immunodiffusion; however, counter-immunoelectrophoresis, complement fixation, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), immunoblotting, and dot ELISA may also be used (2,6-9).

The existing methods for producing *Paracoccidioides* spp. antigens are problematic in terms of standardization, specificity, stability, repeatability, and reproducibility (10-12). Thus, in this study, we sought to optimize the methodology for antigen production described by Freitas et al., evaluating its applicability in paracoccidioidomycosis immunodiagnosis using a double immunodiffusion assay (13).

Material and methods

Isolates of Paracoccidioides spp.

We seleted one *P. brasiliensis senso strictu* (S1–Pb 113), one *P. restrepiensis* (PS3-B-339), and three *P. lutzii* (01, 66, and 8334) isolates for this study. The isolates were cultured on Fava-Netto modified agar medium at 36 °C ± 1 °C and were subcultured every 15 days.

Preparation of Paracoccidioides spp. antigens

We employed the method described by Freitas *et al*. to prepare antigens from *Paracoccidioides* spp. isolates (13). Briefly, P. *lutzii* yeast cells were grown on Fava-Netto modified agar medium at 36 °C ± 1 °C for 5, 10, and 20 days. *Paracoccidioides brasiliensis senso strictu* and *P. restrepiensis* were grown in the same medium and temperature for seven days. Following the incubation period, 20 ml of a thimerosal-borate aqueous solution (1:5,000; Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) was added to each culture tube.

Culture tubes containing the fungal cells were incubated and submerged in a thimerosal-borate aqueous solution at room temperature for 24 hours. The supernatants were then aspirated using a sterile serological pipette and filtered through a sterile filter unit of 0.22 µm (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). The antigen solutions were concentrated 10-20-fold by

lyophilization. After the protein dosage was determined using the Bradford method (14), the antigenic preparations were stored at −20 °C until use.

Serum samples

We evaluated 24 serum samples from patients with proven paracoccidioidomycosis and previously reactive to *P. brasiliensis* antigens; ten serum samples from patients with serological reactivity, by double immunodiffusion, for *Histoplasma capsulatum*; ten serum samples from patients with serological reactivity, by double immunodiffusion for *Aspergillus fumigatus*, and nine serum samples from random blood donors. Paracoccidioidomycosis cases were classified according to the clinical practice guidelines for this disease (3). Anti-*P. brasiliensis* and anti-*P. lutzii* polyclonal antibodies obtained from rabbits were used as positive controls, and anti-*Histoplasma capsulatum* and anti-*Aspergillus fumigatus* polyclonal antibodies were used as negative controls.

The paracoccidioidomycosis serum samples evaluated in this study were obtained from patients residing in the state of São Paulo, a region endemic for *P. brasiliensis sensu stricto*. The serum samples evaluated in this study were stored at -20 °C in the biorepository of Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil.

Ethics

The study was approved by the Internal Scientific Commissions and Bioethics in Human Research Committee of Instituto Adolfo Lutz (CEPIAL# 026/11).

Double immunodiffusion assay

Double immunodiffusion assays were performed using the modified Ouchterlony method (15). The glass slides were covered with 3 ml of 1% agarose gel type II medium (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) diluted in a buffered saline solution (pH 6.9) containing 0.4% sodium citrate and 7.5% glycine. Antigens (10 µl) were placed in the central well, while control and patient sera (10 µl) were added to the surrounding wells. The slides were incubated in a humid chamber at room temperature for 48 hours. Subsequently, they were washed with saline solution several times over a 24 hour-period. The gels were dried and stained in an ethanol-acetic acid-water mixture with 0.4% Coomassie brilliant blue R-250® (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed as previously described by Laemmli (1970) (16). *Paracoccidioides* spp. antigens were diluted in a buffer containing 62 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% (w/v) SDS, 50 mM 2-mercaptoethanol, 10% glycerol, and 0.01% bromophenol blue; boiled for three minutes, and centrifuged before being seeded into the gels. The antigens were subjected to electrophoresis (20 mA at room temperature) in a 10% discontinuous SDS buffer system in a Mini-Protean II Electrophoresis Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The molecular mass was determined using a 10-250 kDa standard pre-stained protein marker (Bio-Rad Precision Plus Protein All Blue Standards, cat. # 161–037, Bio-Rad Laboratory, Hercules, CA, USA). The electrophoretic profile was visualized using silver nitrate (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) stain, according to the protocol described by Ansorge (1985) (17).

Polyclonal antibodies against Paracoccidioides spp. *antigens*

Two New Zealand white rabbits were immunized subcutaneously on the back with 100 µg of *P. brasiliensis* (Pb 113) and *P. lutzii* (Pb 01) antigens, emulsified (3:1 v/v) with complete Freund's adjuvant (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) in the first immunization, and with incomplete Freund's adjuvant (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) in the subsequent ones, repeated every week for four weeks. Rabbit sera were collected one week after the fourth immunization to assess the production of circulating anti-species-specific polyclonal antibodies using an immunodiffusion assay. One week after the booster dose, the rabbits were anesthetized intramuscularly with 10 mg/kg ketamine. The same protocol was used to obtain polyclonal antibodies against *H. capsulatum* and *A. fumigatus* antigens.

Stability of Paracoccidioides spp. antigens

The stability of the antigens lyophilized and stored at -20°C was analyzed using a double immunodiffusion assay against species-specific polyclonal antibodies after three, six, and nine months.

Screening of Paracoccidioides spp. antigens

Screening of *P. brasiliensis sensu strictu* (Pb 113), *P. restrepiensis* (B-339), and *P. lutzii* (01, 66, and 8334) antigenic preparations was performed by determining the protein content, electrophoretic profile, and immunoreactivity against anti-*P. brasiliensis,* anti-*P. lutzii*, anti-*H. capsulatum*, and anti-*A. fumigatus* polyclonal antibodies and serum samples from random blood donors.

Results

Using different cultivation times (5, 10, and 15 days) and antigen concentrations (*in natura*, 10- and 20-fold), we obtained 18 antigens from *P. lutzii*. After the evaluation of the protein content, electrophoretic profile, and immunoreactivity against polyclonal species-specific antibodies, three antigenic preparations were selected: antigen obtained from 01 isolate, cultured for 20 days and 10X (Th 01 20d 10X), antigen obtained from 66 isolate, cultured for five days, 20X (Th 66, 5d 20X), and antigen obtained from 8334 isolates cultured for 10 days, 20X (Th 8334 10 d 20X) (table 1).

Four antigens from *P. brasiliensis sensu strictu* and *P. restrepiensis* were obtained, all produced after seven days of culture, following the laboratory's previous experience with the isolates employed (113 and B-339). After evaluating the same parameters mentioned for *P. lutzii*, 10-fold concentrated antigens were selected (Th 113 7d 10X and Th 339 7d 10X) (table 1).

Table 1. Profile of the selected antigens

Antigens	Protein dosage (mg/mL)	Reactivity with C+ Pb	Reactivity with C+ Pl	Reactivity with C+ Hc	Reactivity with C+ Af
Th 01 20d 10X (FN)	71.09	R	R	NR	NR
Th 66 5d 20X (FN)	66.34	R	R	NR	NR
Th 8334 10d 20X (FN)	230.19	R	R	NR	NR
Th 113 7d 10X (FN)	99.58	R	R	NR	NR
Th 339 7d 10X (FN)	102.50	R	R	NR	NR

Th: Thimerosal; FN: Modified Fava-Netto agar; 10X: 10X concentrate; 20X: 20X concentrate; R: Reagent; NR: Non-reactive

C+Pb: policlonal antibody anti-antigen of P. *brasiliensis sensu strictu*

C+Pl: policlonal antibody anti-antigen of P. *lutzii*

C+Hc: policlonal antibody anti-antigen of H. *capsulatum*

C+Af: policlonal antibody anti-antigen of A. *fumigatus*

Evaluation of antigenic preparations using double immunodiffusion assay demonstrated strong cross-reactivity when *P. brasiliensis sensu strictu* and *P. restrepiensis* antigens were evaluated against anti-*P. lutzii* polyclonal antibody; and when *P. lutzii* antigens were evaluated against the anti-*P. brasiliensis* polyclonal antibody (figure 1). Human serum samples with proven paracoccidioidomycosis also showed reactivity using double immunodiffusion assay against antigenic preparations of *P. lutzii,* reinforcing the desirable cross-reactivity between *Paracoccidioides* spp. and polyclonal antibodies. Out of the evaluated samples, 21 (87.5%) showed reactivity to Th 01 20d 10X antigen, 16 (66.66%) to Th 66 5d 20X antigen, and 20 (83.33%) to Th 8334 10d 20X antigen (figure 1 and table 2).

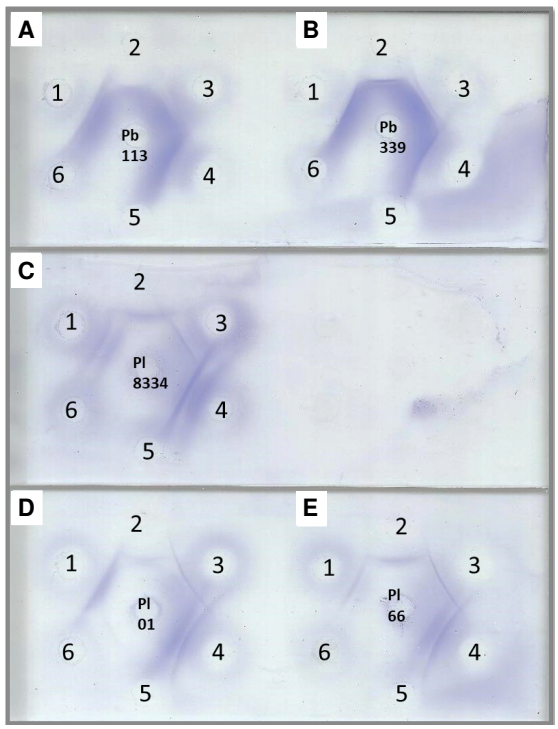
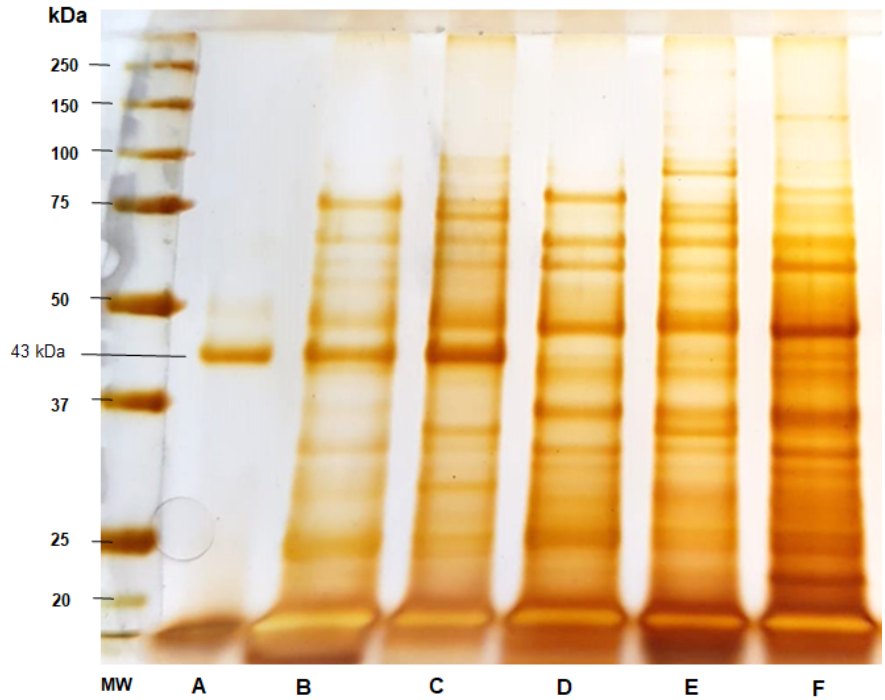


Figure 1. Double immunodiffusion assay with different *Paracoccidioides* spp. antigens. A) Th 113 7d 10X, B) Th 339 7d 10X, C) Th 8334 10d 20X, D) Th 01 20d 10X, and E) Th 66 5d 20X. 1) Anti-*P. lutzii* polyclonal antibody, 2) anti-*P. brasiliensis* polyclonal antibody, 3 and 4) paracoccidioidomycosis serum samples, 5) anti-*H. capsulatum* polyclonal antibody, and 6) anti-*A. fumigatus* polyclonal antibody.

Table 2. Sensitivity and specificity of *Paracoccidioides* spp. antigens

Antigens	Reactivity with proven PCM	Sensitivity %	Specificity %
Th 01 20d 10X (FN)	21/24	87.5	85.29
Th 66 5d 20X (FN)	16/24	66.66	85.29
Th 8334 10d 20X (FN)	20/24	83.33	85.29
Th 113 7d 10X (FN)	24/24	100.00	100.00
Th 339 7d 10X (FN)	24/24	100.00	100.00

Th: Thimerosal; FN: Modified Fava-Netto agar; 10X: 10X concentrate; 20X: 20X concentrate;
PCM: Paracoccidioidomycosis



MW: molecular weight

Figure 2. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of the *Paracoccidioides* spp. antigens. A) *Paracoccidioides brasiliensis* 113 culture-filtrate, B) Thimerosal 113 7d 10X, C) thimerosal B-339 7d 10X, D) Thimerosal 01 20d 10X, E) Thimerosal 66 5d 20X, and F) Thimerosal 8334 10d 20X.

There was no cross-reactivity between the *Paracoccidioides* antigens and the polyclonal antibodies anti-*H. capsulatum* and anti-*A. fumigatus,* neither with the random blood donors. However, we observed that three (3/10) serum samples from patients with histoplasmosis and two (2/10) from patients with aspergillosis showed cross-reactivity using double immunodiffusion assay when evaluated against *P. lutzii* antigens (Th01 20d 10X, Th 66 5d 20X, and Th 8334 10d 20X).

The stability results of the *Paracoccidioides* spp. antigens lyophilized and stored at -20 °C were analyzed after three, six, and nine months using double immunodiffusion assay against species-specific polyclonal antibodies. The results revealed that all the antigens retained their activity.

Analysis of the electrophoretic profile of the *Paracoccidioides* spp. antigens revealed several protein fractions with apparent molecular masses between 14 and 150 kDa. Some protein fractions were shared among *P. brasiliensis sensu strictu, P. restrepiensis,* and *P. lutzii* when obtained using the method described by Freitas *et al.* (13). Figure 2 shows gp43 production and secretion preferentially by B-339 and 113 *Paracoccidioides* spp. isolates (lanes A, B, and C). The culture-filtrate antigen of strain 113 predominantly comprised the fraction of gp43 (lane A).

Discussion

Different antigens have been used for the immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis using a double immunodiffusion assay. However, these antigen preparations were not standardized from one laboratory to another and included cytoplasmic extracts of yeast forms, concentrated filtrates, lyophilized filtrates, cell wall components, purified molecules, and

recombinant antigens (7,18). These antigens were prepared from different *Paracoccidioides* spp. isolates, grown in different culture media and under different growth conditions (12,18). Besides, distinct *Paracoccidioides* spp. isolates can produce remarkably diverse qualities and quantities of antigens, a response that is also influenced by the culture medium (11,18).

Considering all the above in *Paracoccidioides* spp. antigen production, considerable disagreement regarding the sensitivity and specificity of the double immunodiffusion assay is not surprising. Vidal *et al.* compared the performance of laboratories from six medical mycology reference centers in Brazil that conducted routine serology with *P. brasiliensis* antigen preparations for the paracoccidioidomycosis diagnosis (11). The results showed inconsistencies among laboratories strong enough to result in conflicting information regarding patient management.

In addition to these methodological variations, in the last few years, false negative results have been reported in patients with proven paracoccidioidomycosis, especially in endemic regions of *P. lutzii*, suggesting antigen differences between species. Therefore, a comparative assessment of the antigen profiles of *P. brasiliensis sensu strictu*, *P. restrepiensis,* and *P. lutzii* is urgently needed. However, it must be emphasized that the protocol for obtaining these antigen preparations needs to be carefully considered because different parameters can alter the expression or secretion of protein fractions, both important for immunodiagnosis. According to the latter, this study developed a useful methodology for obtaining antigens from *P. brasiliensis* and *P. lutzii*, in contrast to the culture-filtered exoantigen, which, despite being indicated for the *complex P. brasiliensis*, does not show good results for *P. lutzii* (19,20).

For several years, culture-filtrate preparations obtained from *P. restrepiensis* B-339 strain, rich in gp43, an immunodominant molecule of the species, was considered by several groups (12,21,22) as the “gold standard” antigen preparation, being distributed gracefully to different countries in South America like Colombia, Venezuela, and Argentina. However, Leitão *et al*. (2014) demonstrated that the gp43 of *P. lutzii* is produced in different amounts and has different epitopes according to the species (23). It strongly suggests that this molecule does not have the same serological importance between species.

These data confirm the need to reevaluate the parameters used to select antigen preparations to diagnose suspected cases. For example, it must be considered the migrating populations in Brazil. In addition, recent eco-epidemiological studies suggested that species can cohabit in the same ecological niche (24,25). In this study, we observed cross-reactivity when *P. brasiliensis sensu strictu* and *P. restrepiensis* antigens were evaluated against anti-*P. lutzii* polyclonal antibody, and when *P. lutzii* antigens were evaluated against the anti-*P. brasiliensis* polyclonal antibody, suggesting that both species share protein and/or glycoprotein fractions.

Our results agree with those of Buccheri *et al.* (2018) (26) and Lenhard-Vidal *et al.* (2018) (27). Buccheri *et al.* (2018) described a patient with the acute form of paracoccidioidomycosis caused by *P. brasiliensis* with negative results on two reference centers’ routine screening for *P. brasiliensis* antibodies but positive for *P. lutzii* antigens implying that antibodies elicited during *P. brasiliensis* infection recognized the antigen fractions shared by both species (25). Lenhard-Vidal *et al.* (2018) showed that rabbit and human immune sera recognized several antigens from *P. lutzii* and *P. brasiliensis* complex isolates (27).

Regarding the three serum samples that did not show reactivity to *P. lutzii,* we must emphasize that other factors may contribute to the occurrence of false negative results, such as the clinical form of the disease, patient's immunological status, and duration of antifungal therapy, all of which decrease the number of circulating antibodies and prevent their detection using serological methods, especially those with lower sensitivity (28). In such cases, immunoenzymatic assays, such as immunoblotting, can be used to improve the accuracy of immunodiagnostics. SDS-PAGE analysis of the antigen preparations revealed the presence of a wide variety of proteins in *Paracoccidiodes spp*. This method showed numerous protein and glycoprotein fractions in common for the three fungal species, corroborating the cross-reactivity observed in serological evaluations. It was also observed high gp43 secretion by *P. brasiliensis sensu stricto* and *P. restrepiensis*, with the majority being in the culture-filtered exoantigen. False negative results with this antigen preparation may be related to differences between species and the methods used to obtain the antigen preparations.

In this study, we evaluated the antigens obtained from three species of Paracoccidioides: *P. brasiliensis sensu stricto*, *P. restrepiensis,* and *P. lutzii*. Evaluation of the electrophoretic profile using SDS-PAGE revealed the presence of common protein fractions among different species, explaining the occurrence of cross-reactivity. Our results indicate the existence of genus-specific recognition, and we believe this characteristic is highly beneficial for the immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. In addition, we verified that using an antigen preparation composed of all the antigens obtained significantly increased the sensitivity of the agarose gel immunodiffusion assay (data not shown), thus contributing to not losing cases in serological evaluation.

Cross-reactivity between sera from patients with histoplasmosis or aspergillosis and *Paracoccidioides* spp. antigens has already been described in numerous studies and is related to antigen similarity between genera, translating it into a diagnostic problem, even when recombinant antigens are used in assays (29,30). Furthermore, overlapping ecological niches of different fungal species, cell wall composition, ubiquity of antigen determinants, and heterophile antibodies may contribute to cross-reactivity (31). Also, identified cross-reactivity may be influenced by memory antibodies or even rare co-infection by the two pathogens.

Dos Santos *et al.* (2015) evaluated latex assay performance using purified gp43 to identify circulating antibodies in serum samples from 65 patients with paracoccidioidomycosis. The specificity assay was determined using serum samples from 18 patients with histoplasmosis, 18 with aspergillosis, 13 with candidiasis, and 38 "healthy" individuals. The authors reported a sensitivity of 98.4% and a cross-reactivity of 16.6% for histoplasmosis, 11.11% for aspergillosis, and 7.7% for candidiasis.

In other study, the original 27 kDa recombinant protein was cloned and expressed in *Escherichia coli* to produce the 27 kDa molecular weight recombinant *Paracoccidioides* antigen. Indirect enzyme immunoassays were performed with the antigen against 160 human serum samples, of which 64 were from patients with paracoccidioidomycosis. The sensitivity mean was 73.4% compared with healthy individuals; specificity for patients with paracoccidioidomycosis was 87.5% but for patients with other fungal infections was 58.7%. These results showed high cross-reaction with the sera of patients infected with other mycoses (32,33).

Studies with a larger number of sera should be conducted. However, so far the preliminary evaluation of the antigen capacity by double immunodiffusion assay and the observed antigen profile by SDS-PAGE suggested a *Paracoccidioides* spp. antigen production with great potential for its use in the immunodiagnosis of patients with clinical suspicion of paracoccidioidomycosis.

This study proposes an alternative protocol for *Paracoccidioides* spp. antigen production. Among the advantages of the suggested methodology is the antigen obtention from *Paracoccidioides* spp. yeast stationary phase culture (without agitation). To dispense with a shaking incubator to obtain antigens results in savings for laboratories because this equipment costs an average of four to five times more than a conventional microbiological oven and requires more frequent corrective maintenance.

This protocol does not need an additional inactivation step of the fungal culture with thimerosal-borate solution (1:5,000), saving four days compared to obtaining culture filtrate. In this protocol, a thimerosal-borate aqueous solution (1:5,000) was used to extract and/or dissolve the soluble proteins (antigens) of *Paracoccidioides* spp. wall, for 24 hours. During that time, the yeasts were inactivated since this solution also has fungicidal and fungistatic functions, guaranteeing the safety of the obtained product.

In addition, most protocols aimed at obtaining culture filtrate recommend fungal culture for 20 days, culture inactivation, filtration on filter paper, and supernatant centrifugation in a refrigerated centrifuge (expensive equipment compared to a non-refrigerated centrifuge, which also requires a preventive maintenance contract). All of that to remove tiny fungal *Paracoccidioides* spp. cells, that escaped the filter paper, and thimerosal crystals.

In the proposed protocol, we obtained good results with antigens prepared after five days of culture (Th 66 5d 20X, *P. lutzii*) and seven days for *P. brasiliensis* and *P. restrepiensis* without the supernatant centrifugation and long filtering processes.

Finally, antigen concentration is often used to obtain culture-filtered antigens and other types of *Paracoccidioides* spp. antigens. Therefore, concentration does not make the process more expensive, as it is a common and necessary practice to obtain good antigen preparations. Although we used a lyophilizer, there are other economical and feasible methods for laboratories without this equipment (22).

We believe the advantages presented here support this simple, rapid, and accessible methodology for most mycoserology laboratories, particularly those with limited technological resources. The antigens obtained in this study have common antigen fractions among different species, allowing genus-specific recognition. Therefore, we think this protocol can be developed and reproduced in laboratories in Brazil and South America, where paracoccidioidomycosis is a neglected disease, contributing to an early diagnosis and favoring initiation of specific treatments, especially in endemic regions, regardless of the fungal species causing paracoccidioidomycosis.

Acknowledgements

We would like to thank Lúcia Cupertino Barreto (*in memoriam*), Mayra Simioni Zaparoli, Camila Mika Kamikawa, and Tânia Suely de Andrade, for representing the Núcleo de Coleção de Microorganismos (IAL-SP), and Viviane

Mazo Fávero Gimenes for their technical assistance. We also thank Dr. Zoilo Pires de Camargo, Dr. Gilda Maria Barbaro del Negro, and Dr. Gil Benard for donating *P. brasiliensis sensu stricto*, *P. restrepiensis,* and *P. lutzii* isolates.

References

1. Gonzalez A, Hernandez O. New insights into a complex fungal pathogen: the case of *Paracoccidioides* spp. Yeast. 2016;33:113-28. https://doi.org/10.1002/yea.3147
2. Queiroz-Telles F, Fahal AH, Falci DR, Caceres DH, Chiller T, Pasqualotto AC. Neglected endemic mycoses. Lancet Infect Dis. 2017;17:e377. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30306-7
3. Shikanai-Yasuda MA, Mendes RP, Colombo AL, Queiroz-Telles F, Kono ASG, Paniago AMM, *et al.* Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. Rev Soc Bras Med Trop. 2017;50:715-40. https://doi.org/10.1590/0037-8682-0230-2017
4. Martinez, R. New trends in Paracoccidioidomycosis epidemiology. J Fungi. 2017;3:1. https://doi.org/10.3390/jof3010001
5. Mendes RP, Cavalcante RS, Marques SA, Marques MEA, Venturini J, Sylvestre TF. Paracoccidioidomycosis: Current perspectives from Brazil. Open Microbiol J. 2017;31:224-82. https://doi.org/10.2174/1874285801711010224
6. da Silva JF, de Oliveira HC, Marcos CM, Assato PA, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJ. Advances and challenges in paracoccidioidomycosis serology caused by *Paracoccidioides* species complex: an update. Diagn Microbiol Infect Dis. 2016;8487-94. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.06.004
7. Ferreira CS, Ribeiro EMC, Goes AM, Silva BM. Current strategies for diagnosis of paracoccidioidomycosis and prospects of methods based on gold nanoparticles. Future Microbiol. 2016;11:973-85. https://doi.org/10.2217/fmb-2016-0062
8. Almeida-Paes R, Bernardes-Engemann AR, da Silva Motta B, Pizzini CV, de Abreu Almeida M, de Medeiros Muniz M, *et al.* Immunologic diagnosis of endemic mycoses. J Fungi (Basel). 2022;8:993. https://doi.org/10.3390/jof8100993
9. Peçanha PM, Peçanha-Pietrobom PM, Grão-Velloso TR, Rosa Júnior M, Falqueto A, Gonçalves SS. Paracoccidioidomycosis: What we know and what is new in epidemiology, diagnosis, and treatment. J Fungi (Basel). 2022;8:1098. https://doi.org/10.3390/jof8101098
10. Kamikawa CM, Mendes RP, Vicentini AP. Standardization and validation of Dot-ELISA assay for *Paracoccidioides brasiliensis* antibody detection. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2017;23:11. https://doi.org/10.1186/s40409-017-0101-3
11. Vidal MS, Del Negro GM, Vicentini AP, Svidzinski TI, Mendes-Giannini MJ, Almeida AM, *et al.* Serological diagnosis of paracoccidioidomycosis: high rate of inter-laboratorial variability among medical mycology reference centers. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8:e3174. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003174
12. de Camargo ZP. Serology of paracoccidioidomycosis. Mycopathologia. 2008;165:289-302. https://doi.org/ 10.1007/s11046-007-9060-5
13. de Freitas RS, Kamikawa CM, Vicentini AP. Fast protocol for the production of *Histoplasma capsulatum* antigens for antibody detection in the immunodiagnosis of histoplasmosis. Rev Iberoam Micol. 2018;35:27-31. https://doi.org/10.1016/j.riam.2017.04.004
14. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;72:248-54. https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999
15. Ouchterlony O. Antigen-antibody reactions in gels. Acta Pathol Microbiol Scand. 1949;26:507-15. https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1949.tb00751.x
16. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature.1970;227:680-5. https://doi.org/10.1038/227680a0
17. Ansorge W. Fast and sensitive detection of protein and DNA bands by treatment with potassium permanganate. J Biochem Biophys Methods. 1985;11:13-20. https://doi.org/10.1016/0165-022x(85)90037-5
18. Vicentini-Moreira AP. Paracoccidioidomicose: histórico, etiologia, epidemiologia, patogênese, formas clínicas, diagnóstico laboratorial e antígenos. Bol Epidemiol Paul. 2008;5:11-24.

19. Gegembauer G, Araujo LM, Pereira EF, Rodrigues AM, Paniago AM, Hahn RC, *et al*. Serology of paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides lutzii.* PLoS Negl Trop Dis. 2014;8:e2986. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002986

20. Queiroz Junior LDP, de Camargo ZP, Tadano T, Rodrigues AM, Takarara DT, Gegembauer G, *et al*. Serological and antigenic profiles of clinical isolates of *Paracoccidioides* spp. from Central Western Brazil. Mycoses. 2014;57:466-72. https://doi.org/10.1111/myc.12183

21. de Camargo ZP, de Franco MF. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. Rev Iberoam Micol. 2000;17:41-8.

22. Camargo ZP, Berzaghi R, Amaral CC, Silva SH. Simplified method for producing *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for use in immunodiffusion tests. Med Mycol. 2003;41:539-42. https://doi.org/10.1080/13693780310001615358

23. Leitão NP Jr, Vallejo MC, Conceição PM, Camargo ZP, Hahn R, Puccia R. *Paracoccidioides lutzii* Plp43 is an active glucanase with partial antigenic identity with *P. brasiliensis* gp43. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8:e3111. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003111

24. Arantes TD, Theodoro RC, Teixeira M de M, Bosco S de M, Bagagli E. Environmental mapping of *Paracoccidioides* spp. in Brazil reveals new clues into genetic diversity, biogeography and wild host association. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10:e0004606. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004606

25. Mendes JF, Klafke GB, Albano APN, Cabana AL, Teles AJ, de Camargo ZP, *et al*. Paracoccidioidomycosis infection in domestic and wild mammals by *Paracoccidioides lutzii*. Mycoses. 2017;60:402-6. https://doi.org/10.1111/myc.12608

26. Buccheri R, Morais VDS, Kamikawa CM, Vidal MSM, Naves G, Del Negro GMB, *et al.* Case Report: misleading serological diagnosis of paracoccidioidomycosis in a young patient with the acute form disease: *Paracoccidioides brasiliensis* or *Paracoccidioides lutzii*? Am J Trop Med Hyg. 2018;98:1082-5. https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0812

27. Lenhard-Vidal A, Assolini JP, Chiyoda FAS, Ono MA, Sano A, Itano EN. Polyclonal antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* are able to recognise antigens from different strains from *Paracoccidioides* species complex, including *Paracoccidioides lutzii* LDR2. Mycoses. 2018;61:826-32. https://doi.org/10.1111/myc.12819

28. Do Valle ACF, Costa RLB, Fialho Monteiro PC, Von Helder J, Muniz MM, Zancopé-Oliveira RM. Interpretation and clinical correlation of serological tests in paracoccidioidomycosis. Med Mycol. 2001;39:373-7. https://doi.org/10.1080/mmy.39.4.373.37

29. Torres Esteche V, Arteta Z, Torres G, Vaucher A, Gezuele E, Balleste R. Concomitant pulmonary paracoccidioidomycosis and pulmonary histoplasmosis: a rare case. J Bras Pneumol. 2012;38:264-8. https://doi.org/10.1590/s1806-37132012000200017

30. Fernandes VC, Coitinho JB, Veloso JM, Araújo SA, Pedroso EP, Goes AM. Combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* recombinant rPb27 and rPb40 antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. J Immunol Methods. 2011;367:78-84. https://doi.org/10.1016/j.jim.2011.02.006

31. Kamikawa CM, Vicentini AP. Multiparametric assay of screening for the diagnosis of mycoses of interest in Public Health: standardization of methodology. Rev Inst Adolfo Lutz. 2022;81:1-11,e37165. https://doi.org/10.53393/rial.2022.v.81.37165

32. Dos Santos PO, Rodrigues AM, Fernandes GF, da Silva SH, Burger E, de Camargo ZP. Immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides brasiliensis* using a latex test: detection of specific antibody anti-gp43 and specific antigen gp43. PLoS Negl Trop Dis. 2015;13:e0003516. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003516

33. Ortiz BL, Díez S, Urán ME, Rivas JM, Romero M, Caicedo, *et al*. Use of the 27-kilodalton recombinant protein from *Paracoccidioides brasiliensis* in serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. Clin Diagn Lab Immunol. 1998;5:826-30. https://doi.org/10.1128/CDLI.5.6.826-830.1998

Biomédica 2023;43(Supl.1):181-93.
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.6884

Artículo original

Descripción de la micobiota de los tubos endotraqueales de pacientes de unidades de cuidados intensivos en Bogotá, Colombia

Mónica Gabriela Huertas[1,2], Miguel Rodríguez[3], Patricia Castro[3], Sergio Danilo Cruz[3], Érika Alejandra Cifuentes[1], Andrés Felipe Yepes[3], María Mercedes Zambrano[1], Ana Margarita Baldión[3]

[1] Genética Molecular, Corporación CorpoGen, Bogotá, D.C., Colombia
[2] Escuela de Medicina, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Tunja, Colombia
[3] Departamento de Patología y Laboratorios, Hospital Universitario Fundación Santa Fe de Bogotá, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. La colonización por microorganismos patógenos de los dispositivos médicos usados en las unidades de cuidados intensivos es un factor de riesgo para el aumento de infecciones asociadas con la atención en salud y, por lo tanto, al de la morbilidad y la mortalidad de los pacientes intubados. En Colombia, no se ha descrito la colonización por hongos de los tubos endotraqueales, con lo cual se podrían considerar nuevas opciones terapéuticas para el beneficio de los pacientes.
Objetivo. Describir los hongos que colonizan los tubos endotraqueales de los pacientes en unidades de cuidados intensivos, junto con su perfil de sensibilidad a los antifúngicos.
Materiales y métodos. Se realizó un estudio observacional, descriptivo, en dos centros hospitalarios durante 12 meses. Se recolectaron tubos endotraqueales de pacientes de las unidades de cuidados intensivos. Estos fueron procesados para cultivar e identificar hongos, y para establecer su perfil de sensibilidad a los antifúngicos.
Resultados. Se analizaron 121 tubos endotraqueales obtenidos de 113 pacientes. De estos, el 41,32 % se encontró colonizado por los hongos *Candida albicans* (64,61 %), *C.* no-*albicans* (30,77 %), *Cryptococcus* spp. (3,08 %) o mohos (1,54 %). Todos los hongos evaluados presentaron una gran sensibilidad a los antifúngicos, con un promedio del 91 %.
Conclusión. Se encontró colonización fúngica en los tubos endotraqueales de pacientes con asistencia respiratoria mecánica. El perfil de sensibilidad en estos pacientes fue favorable. Se requiere un estudio clínico para correlacionar los microorganismos colonizadores y su capacidad de generar infección.

Palabras clave: micobioma; microbiota; neumonía asociada con el respirador; intubación endotraqueal; unidades de cuidado intensivo.

Description of the colonizing mycobiota of endotracheal tubes from patients admitted to two intensive care units in Bogotá, Colombia

Introduction. Medical device colonization by pathogenic microorganisms is a risk factor for increasing infections associated with health care and, consequently, the morbidity and mortality of intubated patients. In Colombia, fungal colonization of endotracheal tubes has not been described, and this information could lead to new therapeutic options for the benefit of patients.
Objective. To describe the colonizing fungi of the endotracheal tubes from patients in the intensive care unit, along with its antifungal sensitivity profile.
Materials and methods. We conducted a descriptive, observational study in two health centers for 12 months. Endotracheal tubes were collected from patients in intensive care units. Samples were processed for culture, fungi identification, and antifungal sensitivity profile assessment.
Results. A total of 121 endotracheal tubes, obtained from 113 patients, were analyzed: 41.32 % of the tubes were colonized by *Candida albicans* (64.62%), *C.* non-albicans (30.77%), *Cryptococcus* spp. (3.08%) or molds (1.54%). All fungi evaluated showed a high sensitivity to antifungals, with a mean of 91%.
Conclusion. Fungal colonization was found in the endotracheal tubes of patients under invasive mechanical ventilation. The antifungal sensitivity profile in these patients was favorable. A clinical study is required to find possible correlations between the colonizing microorganisms and infectivity.

Keywords: mycobiome; microbiota; pneumonia, ventilator-associated; intubation, intratracheal; intensive care units.

Recibido: 13/02/2023
Aceptado: 11/05/2023
Publicado: 15/05/2023

Citación:
Huertas MG, Rodríguez M, Castro P, Cruz SC, Cifuentes EA,Yepes AF, *et al.* Descripción de la micobiota de los tubos endotraqueales de pacientes de unidad de cuidados intensivos en Bogotá, Colombia. Biomédica. 2023;43(Supl.1):181-93. https://doi.org/10.7705/biomedica.6884

Correspondencia:
Mónica Gabriela Huertas, Genética Molecular, Corporación CorpoGen, Bogotá, D.C., Colombia
monica.huertas01@uptc.edu.co; mogahuertas@gmail.com

Contribución de los autores:
Mónica Gabriela Huertas: diseño del estudio, supervisión del trabajo, redacción del manuscrito
Miguel Rodríguez, Patricia Castro y Érika Alejandra Cifuentes: muestreo, trabajo de laboratorio y recolección de datos
Andrés Felipe Yépez: recolección de las muestras y análisis de datos
Sergio Danilo Cruz: análisis estadístico y redacción del manuscrito
María Mercedes Zambrano y Ana Margarita Baldión: diseño del estudio y supervisión del trabajo
Todos los autores participaron en el análisis de los datos y aceptaron el contenido de la versión final del artículo.

Financiación:
El presente trabajo fue financiado por Minciencias/Colciencias (proyectos 63967255342 y 6396100270500), aprobados en la convocatoria de salud de 2015, y con recursos propios de la Fundación Santa Fe y la Corporación Corpogen.

Conflicto de intereses:
Los autores han declarado no tener ningún conflicto de intereses.

El uso de dispositivos médicos en las unidades de cuidados intensivos es un factor de riesgo para el aumento de las infecciones asociadas con la atención en salud. En Colombia, para el 2020, el 25,8 % de las infecciones asociadas con dispositivos tuvo como resultado clínico, la muerte. Se reportaron 1.666 casos, de los cuales el 31,8 % por neumonía asociada con el respirador (1). Los gérmenes más frecuentes fueron las bacterias gramnegativas (74 %), seguidas de las grampositivas (19 %), los hongos (4 %) y otros (2 %). *Pseudomonas aeruginosa* fue el patógeno más frecuente (20 %), seguido de *Staphylococcus aureus* (11 %) y *Klebsiella pneumoniae* (10 %). En la neumonía precoz, el agente patógeno más frecuente fue *S. aureus* y, en la tardía, *P. aeruginosa* (2).

La neumonía asociada con el respirador se define como aquella que ocurre entre 48 y 72 horas después de la intubación y la asistencia respiratoria mecánica (3). Esta es la infección asociada con la atención de la salud más reportada en los pacientes en la unidad de cuidados intensivos y está asociada con mayor morbimortalidad e incremento de los costos (4). Es la segunda infección más frecuente asociada con dispositivos médicos, después de la asociada con catéteres, y es responsable del 30 % de las infecciones adquiridas en dicha unidad. Se estima que el 10 % de los pacientes que requieren asistencia respiratoria mecánica desarrollará una neumonía (2).

La intubación y la presencia del tubo endotraqueal se ha relacionado con un aumento entre tres y diez veces en el riesgo de padecer neumonía (5). La tasa de incidencia varía entre 4 y 50 casos por cada 100 pacientes (6), con una mortalidad de hasta el 76 % (5,7). Diversos estudios han demostrado que el tubo endotraqueal es colonizado por microbios orales pocas horas después de encontrarse en la vía aérea del paciente (5,8). Las neumonías ocurren entre el 8 y el 28 % de los pacientes intubados (9-12). Igualmente, se ha reconocido que la acumulación de microorganismos (bacterias y levaduras) en la luz del tubo endotraqueal puede generar biopelículas que, una vez terminan su ciclo, se desprenden y migran, y pueden introducirse en la vía aérea (13).

Las biopelículas son estructuras tridimensionales, biológicamente activas, conformadas por diversos microorganismos y pueden estar conformadas por una sola especie o por varias. Las biopelículas están embebidas en sustancias extracelulares producidas por los mismos microorganismos y tienen la capacidad de adherirse a distintos tipos de superficies bióticas y abióticas (14). Los microorganismos pueden unirse a superficies abióticas y, por lo tanto, convierten a los dispositivos médicos invasivos en un blanco importante de estudio y prevención de infecciones. Las muestras provenientes de secreciones traqueales indican que existe una relación entre los agentes causales de la neumonía asociada con el respirador y los microorganismos recuperados de biopelículas de tubos endotraqueales, en el 55 al 70 % de los casos (15).

La microbiota es el conjunto de microorganismos (bacterias, hongos, virus y parásitos) que viven en diferentes partes del cuerpo. Estas comunidades de microorganismos son dinámicas y cambian frente a diferentes estímulos o factores (16,17). Por otra parte, se deben diferenciar los sufijos -bioma (comunidad) y -oma (conjunto), y no confundirlos, como se hace en algunas ocasiones. El microbioma se refiere a todo el hábitat, con los microorganismos, sus genes y las condiciones ambientales (17). Los diferentes hongos que hacen parte del microbioma, forman lo que se conoce como micobiota (18-20).

El microbioma pulmonar parece jugar un papel relevante en la aparición de la neumonía asociada con el respirador; suele caracterizarse por una biomasa relativamente grande y el crecimiento excesivo de uno o más agentes patógenos (21). El número de estudios que describen el micobioma respiratorio es limitado. Sin embargo, en muestras de lavado broncoalveolar, se han reportado levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida* spp., *Meyerozyma guilliermondii* (*C. guilliermondii*), *Pichia jadini y Debaryomyces*; además, hongos filamentosos como *Cladosporium*, *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. (20).

Es frecuente encontrar colonización de la vía aérea por hongos, en especial, por *Candida* spp. Aunque la neumonía por este agente es rara, puede causarla, así como también otras enfermedades invasivas en pacientes críticos. En estudios previos, se ha documentado hasta un 27 % de incidencia de colonización de tubos endotraqueales por especies fúngicas (22). La incidencia de invasión por infecciones fúngicas en cuidados intensivos está en aumento. En pacientes con neoplasias hematológicas o en pacientes sometidos a trasplante de órgano sólido o alogénico de progenitores hematopoyéticos, se ha observado una mortalidad entre el 20 y el 30 % a causa de aspergilosis pulmonar invasiva y, más del 80 %, cuando la infección es por cepas resistentes a los azoles (23).

Este estudio hizo parte de una investigación previa, cuyo objetivo era explorar y caracterizar la microbiota del tubo endotraqueal de pacientes colombianos. En dicho estudio, se observó que las bacterias de la microbiota de los pacientes intubados, incluían principalmente los filos *Proteobacteria, Firmicutes* y *Bacteroidetes*. Se correlacionó su presencia con la unidad de cuidados intensivos en la que los pacientes fueron hospitalizados, mientras que el tiempo de intubación y el diagnóstico de neumonía asociada con el respirador no mostraron una asociación significativa (24).

Teniendo en cuenta los reportes de colonización de los tubos endotraqueales por especies fúngicas y la posibilidad de que sean agentes causales de infecciones asociadas con la atención en salud, el presente análisis tuvo como objetivo describir los hongos colonizadores de los tubos endotraqueales de los pacientes de la unidad de cuidados intensivos y su perfil de resistencia a los antimicóticos.

Materiales y métodos

Descripción del estudio

Se llevó a cabo un estudio observacional, descriptivo, en el cual se recolectaron tubos endotraqueales de pacientes adultos, hospitalizados en las unidades de cuidados intensivos del Hospital Universitario Fundación Santa Fe de Bogotá y de la Clínica Colombia entre diciembre de 2016 y diciembre de 2017, con el objetivo de describir el micobioma de los tubos endotraqueales. El resultado clínico no es una variable de este estudio.

El muestreo se hizo por conveniencia e incluyó todos los tubos endotraqueales de los pacientes que requirieron asistencia respiratoria mecánica por un período de 48 horas o más. Se excluyeron muestras que no se habían procesado en las dos horas siguientes a su recolección. El protocolo de investigación fue aprobado por el comité de ética clínica de las instituciones participantes: el Hospital Universitario Fundación Santa Fe de Bogotá, Colombia (CCEI-5788-2016), y la Clínica Universitaria Colombia (CEIFUS 416-17). Por el tipo de muestra, no fue necesario el consentimiento informado.

Recolección de la muestra y cultivo de hongos

Las muestras fueron recolectadas siguiendo el protocolo establecido por el grupo de investigación, y fueron procesadas simultáneamente para el cultivo de bacterias y hongos. Los resultados de los análisis bacterianos hacen parte de otra publicación (24). Después de la extubación, realizada por el personal médico, los tubos endotraqueales se introdujeron en frascos estériles de 500 ml (Schott, Maguncia, Alemania), y se transportaron al Laboratorio de Microbiología de la Fundación Santa Fe de Bogotá. Las muestras se transportaron en una nevera de poliestireno, destinada únicamente para tal fin, a una temperatura de 4 °C, y se procesaron dentro de las dos horas siguientes a su recolección.

Se ejecutó un corte de 5 cm de la parte inferior distal del tubo, se suspendió en solución salina (0,85 % NaCl) y se sometió a tres ciclos de vórtex (30 segundos) y a un ciclo de sonicación (tres minutos), de acuerdo con los protocolos estandarizados y reportados previamente (22). La suspensión obtenida del tubo endotraqueal se cultivó en medio de gérmenes comunes para la recuperación de bacterias (24) y en agar Sabouraud (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francia) para la identificación de hongos. Las cepas se incubaron a 25 °C entre 3 y 30 días.

Los microorganismos aislados fueron sometidos a identificación y sensibilidad antifúngica, utilizando el sistema automatizado Vitek® 2 (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francia). Los antifúngicos evaluados, fluconazol, voriconazol, caspofungina, micafungina y anfotericina B, estaban contenidos en las tarjetas del sistema Vitek®2.

Recolección de la información y análisis estadístico

A partir de la información recolectada, se construyó una base de datos en Excel® (Microsoft Office 2010). Se establecieron las variables: microorganismo aislado, carga microbiana y resistencia a antifúngicos, y se hizo el análisis con el paquete estadístico R®, versión 4.1.3. Se usó estadística descriptiva para caracterizar los aislamientos mediante frecuencias absolutas y relativas.

Resultados

Se analizaron 121 tubos endotraqueales, de 113 pacientes de los dos centros hospitalarios. Se identificaron 247 aislamientos, de los cuales 127 eran bacterias (50,55 %) del grupo ESKAPE (*Enterococcus* spp., *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa y Enterobacter* spp.), y 65 (26,32 %) eran hongos o levaduras (figura 1). Los resultados de los cultivos bacterianos fueron previamente publicados por el grupo de investigación (23).

Cincuenta tubos endotraqueales (41,3 %) fueron colonizados por hongos, de los cuales se aislaron 65 hongos diferentes (filamentosos y levaduras). De estos, el 64,62 % (n=42) correspondió a *C.albicans;* 30,77 % (n=20) a *C.* no-*albicans;* 3,08 % (n=2) a *Cryptococcus,* y 1,54 % (n=1) a mohos (cuadro 1).

De las *C.* no-*albicans,* se encontró *C. glabrata* (55,00 %; n=11), *C. tropicalis* (35,00 %; n=7), *C. parapsilosis* (5,00 %; n=1) y *C. krusei* (5,00 %; n=1). Dentro del género *Cryptococcus*, se identificó un aislamiento de *C. neoformans* y otro de *C. laurentii;* y entre los mohos*,* uno de *Aspergillus fumigatus* (cuadro 1).

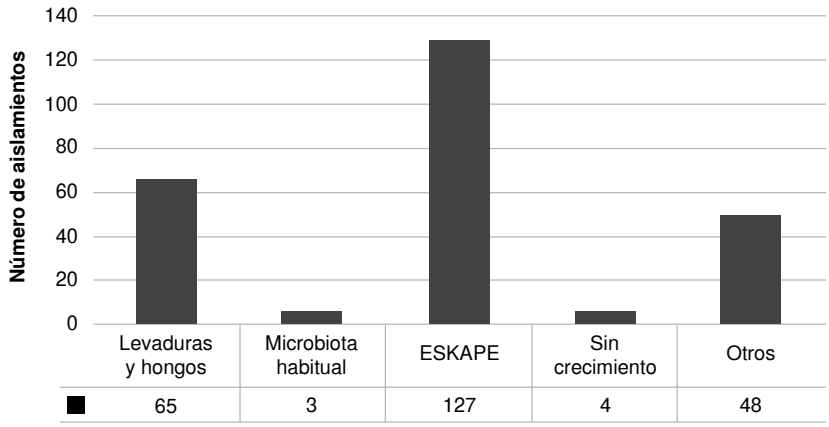


Figura 1. Clasificación de los microorganismos identificados mediante el sistema automatizado Vitek® 2 (BioMérieux, Marcy l'Étoile, Francia)

Cuadro 1. Aislamientos de hongos a partir de muestras tomadas de tubos endotraqueales, identificados con el sistema automatizado Vitek® 2 (BioMérieux, Marcy l'Étoile, Francia)

Aislamientos	n	%
Candida albicans	42	64,61
Candida no-albicans	20	30,77
Candida glabrata	11	55,00
Candida tropicalis	7	35,00
Candida parapsilopsis	1	5,00
Candida krusei	1	5,00
Cryptococcuss	2	1,65
Cryptococcus neoformans	1	50,00
Cryptococcus laurenti	1	50,00
Mohos	1	0,83
Aspergilus fumigatus	1	100,00
Más de un microorganismo	13	26,00
Dos géneros diferentes	1	7,69
Dos especies de *Candida* diferentes	12	92,31
Candida albicans y *Candida glabrata*	7	53,85
Candida albicans y *Candida tropicalis*	4	30,77
Candida tropicalis y *Candida krusey*	1	7,69
Candida glabrata y *Aspergillus*	1	7,69
Total	65	100,00

Se encontraron 13 (26 %) tubos endotraqueales colonizados por más de una especie fúngica. En una de las muestras, se identificó la colonización de géneros diferentes: *C. glabrata y A. fumigatus.* En cuanto a la colonización por diferentes especies de *Candida*, la combinación más frecuente fue *C. albicans* y *C. glabrata* (53,85 %), seguida de *C. albicans* y *C. tropicalis* (30,77 %), y *C. tropicalis* y *C. krusei* (7,69 %) (cuadro 1).

Al comparar los asilamientos entre los centros hospitalarios, el 58 % (n=29) de los hongos fue aislado en la Clínica Colombia y el 42 % (n=21) en la Fundación Santa Fe de Bogotá, pero hubo mayor cantidad de aislamientos positivos sobre el total de la muestra en la Fundación Santa Fe (47,72 %) que en la Clínica Colombia (37,66 %).

En la unidad de cuidados intensivso de la Clínica Colombia, se observó que el 25 % de las levaduras estaba asociado a bacterias del grupo ESKAPE, siendo *K. pneumoniae* la más frecuente. Se encontraron cocultivos frecuentes de *C. albicans* con *C. tropicalis* o con *C. glabrata* en los cultivos analizados (cuadro 2a).

En las muestras de la unidad de cuidados intensivos de la Fundación Santa Fe de Bogotá, se encontró una baja asociación en el cultivo, entre levaduras con bacterias del grupo ESKAPE. Se identificaron únicamente dos casos de cocultivo de *C. albicans* y *K. pneumoniae* y de *C. albicans* y *P. aeruginosa*, y un caso de *C. glabrata* y *K. pneumoniae.* La mayoría de los aislamientos fueron de una única levadura (40,91 %), seguidos por aquellos de más de una (31,82 %). La asociación más común fue la de *C. albicans* y *C. glabrata*. Estos hallazgos sugieren la necesidad de seguir explorando la dinámica microbiana en las unidades de cuidado intensivo y la potencial importancia clínica de las asociaciones entre levaduras y bacterias (cuadro 2b).

Se evaluó la sensibilidad antifúngica en 60 de los 65 hongos aislados. No se determinó el perfil de sensibilidad para *A. fumigatus*, debido a que no hay uno establecido para hongos filamentosos; y tampoco el de *C. laurentii*, porque el fabricante no dispone de la tarjeta de sensibilidad específica para esta especie fúngica (cuadro 3).

Cuadro 2. Asociaciones de levaduras con otros microorganismos y su distribución por centros hospitalarios

a. Asociaciones de levaduras con otros microorganismos en cultivo, aislados a partir de las muestras de la Clínica Colombia

Aislamientos	n	%
ESKAPE		
E. faecalis	3	13,04
P. aeruginosa	3	13,04
E. coli	2	8,70
K. pneumoniae	5	21,74
Otras levaduras		
C. tropicalis	2	8,70
C. glabrata	2	8,70
C. neoformans	1	4,35
C. kruseii	1	4,35
Otras bacterias		
S. marcescens	2	8,70
M. catarrhalis	1	4,35
Filamentosos		4,35
Aspergillus spp.	1	
Total	23	100,00

b. Asociaciones de levaduras con otros microorganismos en cultivo aislados a partir de las muestras de la Fundación Santa Fe de Bogotá

Aislamientos	n	%
ESKAPE		
K. pneumoniae	2	16,66
P. aeruginosa	2	16,66
Otras levaduras		
C. tropicalis	2	16,66
C. glabrata	6	50,00
Total	12	100,00

ESKAPE: microorganismos patógenos, virulentos y resistentes a antibióticos, que pertenecen a alguno de los siguientes géneros y especies: *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp.

Cuadro 3. Especies de hongos identificadas y su perfil de sensibilidad a los compuestos antifúngicos

Especies	Azoles								Equinocandinas								Polienos				Total
	Perfil de resistencia a fluconazol (n=62)				Perfil de resistencia a voriconazol (n=61)				Perfil de resistencia a caspofungina (n=60)				Perfil de resistencia a micafungina (n=59)				Perfil de resistencia a anfotericina B (n=60)				
	S		R		S		R		S		R		S		R		S		R		
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
Candida albicans	41	100	0	0	41	100	0	0	41	100	0	0	41	100	0	0	39	98	1	2,5	41
Candida no-albicans	18	90	2	20	19	5	1	20	20	100	0	0	19	100	0	0	19	100	0	0	20
Candida glabrata	11	100	0	0	11	100	0	0	11	100	0	0	11	100	0	0	11	100	0	0	11
Candida tropicalis	6	86	1	14	6	85	1	14	7	100	0	0	6	100	0	0	6	100	0	0	7
Candida parapsilopsis	1	100	0	0	1	100	0	0	1	100	0	0	1	100	0	0	1	100	0	0	1
Candida krusei	0	0	1	100	1	100	0	0	1	100	0	0	1	100	0	0	1	100	0	0	1
Cryptococcus neoformans	1	100	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1	100	0	0	1
																					62

T: total; S: sensible; R: resistente; ND: no determinado

Se encontró que el 92,30 % de los hongos aislados fue sensible, al menos, a un fármaco, mientras que la eficacia media de todos los antifúngicos evaluados (fluconazol, voriconazol, caspofungina, micafungina, anfotericina B) fue de 99,26 %. Se destaca que todos los aislamientos analizados de *Candida* (*albicans*, *glabrata* y *parapsilosis*) fueron sensibles a fluconazol (cuadro 3). Solo un aislamiento de *C. tropicalis*, de los siete obtenidos por cultivo, presentó resistencia a azoles (fluconazol y voriconazol), pero fue sensible a equinocandinas (caspofungina, micafungina) y polienos (anfotericina B). Se aisló una cepa de *C. krusei* que presentó sensibilidad a todos los antifúngicos, con excepción de fluconazol. Se ha reportado que esta especie tiene resistencia intrínseca. Por su parte, *C. neoformans* fue sensible a fluconazol y a la anfotericina B (cuadro 3).

En la evaluación de todas las cepas, se obtuvo que: la concentración inhibitoria mínima para fluconazol fue menor o igual a 1 µg/ml ($p25 \leq 1$; $p75 \geq 4$); para voriconazol, fue menor o igual a 0,12 µg/ml; para caspofungina, fue menor o igual a 0,25 µg/ml; para micafungina, fue menor o igual a 0,06 µg/ml; y para anfotericina B, fue menor o igual a 0,25 µg/ml ($p25 \leq 0,25$; $p75 = 0,50$). Para la cepa *C. tropicalis* resistente a azoles, no se pudo determinar la concentración inhibitoria mínima para micafungina y anfotericina B. La mayor eficacia la obtuvo el grupo de las equinocandinas (caspofungina y micafungina), pero sin diferencias observadas con respecto a los otros grupos farmacológicos: polienos (anfotericina B) y azoles (fluconazol y voriconazol) (cuadro 3).

Discusión

Los microorganismos de la vía aérea son un grave problema para los pacientes hospitalizados en la unidad de cuidados intensivos y, particularmente, para aquellos que requieren asistencia respiratoria mecánica. Esto se debe a la colonización y la formación de biopelículas sobre los tubos endotraqueales, que funcionan como reservorio de los microorganismos. La neumonía asociada con el respirador es una de las principales infecciones asociadas con la atención en salud en dichas unidades. La Organización Mundial de la Salud indicó que la incidencia de esta infección en países en desarrollo es de 14,7 por 1.000 días de uso de un respirador (2,25).

En este estudio, el análisis de la micobiota de las vías respiratorias de pacientes en estado crítico, que requirieron intubación y asistencia

respiratoria mecánica, mostró poca diversidad fúngica, a diferencia de la encontrada en los cultivos bacterianos de las mismas muestras (24). Como se indica en la figura 1, el porcentaje de levaduras obtenido sobre el total de los aislamientos (26 %), fue menor que el de bacterias (56 %), excluyendo las que se consideran parte de la microbiota habitual.

En general, los resultados sugieren que la micobiota de este grupo de pacientes está compuesta, en su mayoría, por levaduras, principalmente, *C. albicans*. Al relacionar las comunidades bacterianas y fúngicas en los mismos pacientes (cuadro 2), se encontraron resultados similares a lo reportado en publicaciones previas, donde la colonización de bacterias como *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *S. aureus* es facilitada por la presencia de *Candida* spp. (26,27). Algunos estudios reportan una mayor probabilidad de neumonía asociada con el respirador, de origen bacteriano, por coexistencia con hongos, ya que estas comunidades microbianas favorecen los procesos metabólicos y la comunicación intercelular (28).

Respecto a los aislamientos de hongos únicos de los tubos endotraqueales obtenidos de pacientes en la unidad de cuidados intensivos, se encontró una gran frecuencia de colonización por levaduras. En primer lugar, estuvo *C. albicans*, seguida de otras *C.* no-albicans y *Cryptococcus* spp., lo cual coincide con otros estudios de micobiota, en los que se reporta el género *Candida* como uno de los colonizadores comunes de las vías respiratorias (20). Las especies de *Candida* que se han aislado con mayor frecuencia de los tubos endotraqueales son: *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis* (29). En este trabajo, se observó con mayor frecuencia *C. albicans* y *C. glabrata*, incluso en coinfección.

Los hongos reconocidos como principales oportunistas incluyen especies de *Candida*, *Aspergillus* y *Fusarium*, relacionadas con altas tasas de mortalidad en infecciones asociadas con la atención en salud. Los dispositivos médicos son frecuentemente colonizados por hongos (22), principalmente por *Candida* spp. Esta especie se aísla frecuentemente de pacientes críticamente enfermos con sospecha de neumonía asociada con el respirador, inflamación persistente e inmunosupresión (30). Esto coincide con lo reportado en el presente estudio.

Se ha sugerido que *Candida* spp. puede ser un agente causal de neumonía asociada con el respirador (3,29). Sin embargo, no ha sido posible determinar si la presencia de esta levadura se debe solo a su colonización de las vías respiratorias. En diversos estudios se ha logrado aislar diferentes especies de *Candida* spp. en biopelículas de tubos endotraqueales con resistencia a fluconazol (24). Parte de la capacidad patógena de las especies de *Candida* se ha atribuido a su capacidad de formar biopelículas. Estas levaduras pueden generar infecciones persistentes y recurrentes relacionadas con el uso de dispositivos médicos. La asociación entre *Candida* spp. y el incremento de la mortalidad en pacientes con neumonía asociada con el respirador, genera estancias hospitalarias prolongadas y, por lo tanto, un aumento de los costos de atención en salud (31).

Se ha descrito que los pacientes críticamente enfermos colonizados por *Candida* spp. tienen más días de asistencia respiratoria mecánica y mayor mortalidad frente a los que no han sido colonizados por dicho microorganismo (32). Este es un criterio importante que podría tener en cuenta el personal médico, aunque es discutible atribuir la mortalidad de dichos pacientes a la colonización por *Candida* spp. Existen muchos factores

que confunden y desorientan el diagnóstico y el seguimiento, según la condición específica de cada paciente.

En este estudio, se encontraron dos especies del género *Cryptococcus*, *C. neoformans* y *C. laurentii*. El hongo levaduriforme *Cryptococcus* spp. se encuentra distribuido a nivel mundial y se considera cosmopolita (33). Este hongo está relacionado con la enfermedad fúngica invasiva conocida como criptococosis, específicamente la especie *C. neoformans (*variedades *neoformans* y *gatti),* aunque otras especies como *C. laurentii* y *C. albidus* también se han reportado como inductoras de enfermedad en humanos, principalmente en aquellos inmunosuprimidos (33,34).

Para *C. neoformans* se han descrito factores de riesgo asociados con su presencia, como: infección por HIV, tratamiento con esteroides, trasplante de órgano sólido, neoplasias hematológicas, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, sarcoidosis, tratamiento con anticuerpos monoclonales –etanercept, infliximab, alemtuzumab–, diabetes mellitus, falla renal y enfermedad hepática crónica (34). Estos antecedentes podrían ser relevantes en pacientes como los incluidos en el presente estudio, ya que tienen compromiso inmunitario derivado de los tratamientos a los que pudieron haber estado sometidos.

Las infecciones asociadas con *C. laurentii* son características de los pacientes críticamente enfermos, con hospitalizaciones prolongadas, uso de dispositivos médicos invasivos, nutrición parenteral, exposición a esteroides e ingreso en la unidad de cuidados intensivos con necesidad crónica de esteroides (21,35). En Colombia, hay un reporte de infección por este hongo que podría servir de alerta en el manejo de este tipo de pacientes con factores de riesgo asociados (21).

El género *Aspergillus* se ha reportado como agente causal de infecciones respiratorias, neumonías y alergias (36). Sin embargo, en el presente estudio, solo se encontró un hongo filamentoso: *A. fumigatus.* Cabe resaltar que los tubos endotraqueales analizados no necesariamente provenían de pacientes con enfermedad respiratoria. Por lo tanto, es posible que este microorganismo haga parte de la micobiota de los pacientes sanos, lo cual es congruente con lo publicado por otros autores (19,21). Investigadores franceses caracterizaron la micobiota de los pulmones y hallaron *Aspergillus* spp. en personas sanas (37). En estudios recientes con pacientes con COVID-19 y asistencia respiratoria prolongada, se reportó aspergilosis ocasional (21,38).

Durante la pandemia por SARS-CoV2, se presentó un incremento en los reportes de aspergilosis pulmonar relacionada con COVID-19. Los factores de riesgo para el desarrollo de la aspergilosis pulmonar incluyen: daño pulmonar grave relacionado con COVID-19, uso de esteroides en síndrome de disnea aguda y administración indiscriminada de antimicrobianos de amplio espectro en la unidad de cuidados intensivos (38-44).

En la literatura científica actual, se reporta de manera constante una mayor mortalidad de los pacientes con aspergilosis pulmonar asociada con COVID-19, en comparación con aquellos sin aspergilosis (45). Aunque los datos del presente análisis se obtuvieron en fechas previas a la pandemia del 2020, es importante mencionar que ya se encontraba *A. fumigatus* en muestras de pacientes intubados en la unidad de cuidados intensivos. Los pacientes hospitalizados en dicha unidad luego de la infección por COVID-19, por lo general, eran de edad avanzada, con una amplia carga

de morbilidad y con mayor riesgo de infecciones bacterianas y fúngicas dada sus características inmunológicas. En estos pacientes, las infecciones fúngicas se relacionaron con mayor mortalidad (46).

El conocimiento de la micobiota de las vías respiratorias es importante para prevenir potenciales infecciones o coinfecciones en los pacientes intubados. Aproximadamente, el 15 % de los pacientes con tubo endotraqueal reciben antibióticos para las neumonías asociadas con el respirador o las traqueobronquitis que son diagnosticadas clínicamente (47). En otros casos, la terapia antibiótica se inicia al momento de la intubación, lo que favorece el crecimiento de los hongos que hacen parte de la micobiota del paciente. En este estudio, las levaduras aisladas fueron sensibles, al menos, a un fármaco y el 100 % de las cepas de *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata* y *C. krusei*) fueron sensibles a fluconazol.

Los datos producto del presente análisis son un punto de partida para estudios adicionales que busquen explorar las interacciones entre huésped, micobioma y microbioma, incluyendo las comorbilidades, los tratamientos específicos, los antimicrobianos y las complicaciones de los cambios (disbiosis) en las comunidades de la microbiota respiratoria que facilitan la infección. Esto podría respaldar la toma de decisiones clínicas respecto al uso de antimicrobianos antes de la intubación del paciente, y al seguimiento y la prevención de coinfecciones fúngicas y bacterianas relacionadas con el desarrollo de neumonía asociada con el respirador.

Este trabajo indica que existe colonización por levaduras y mohos en los tubos endotraqueales de los pacientes en la unidad de cuidados intensivos, con mayor prevalencia de las levaduras. En algunos casos, se observó colonización por más de una especie en el mismo tubo. Estos resultados sugieren que los mohos y las levaduras deben tenerse en cuenta como posibles agentes etiológicos de la neumonía asociada con el respirador; o que estas, en coinfección con bacterias patógenas, sean facilitadoras en el desarrollo de este tipo de neumonía. Por lo tanto, es necesario promover prácticas médicas para la prevención de la neumonía asociada con el respirador en las unidades de cuidados intensivos, como el retiro temprano del respirador, la higiene oral, la cabecera inclinada a 30-45 º, y el tratamiento preventivo en cultivos positivos para *Candida* spp., entre otros.

Es importante resaltar que los datos aquí mencionados corresponden solo a las cepas obtenidas en cultivo, cuya sensibilidad es limitada para microorganismos exigentes o de difícil crecimiento. Por lo tanto, se requieren estudios adicionales que incluyan la identificación de la micobiota por secuenciación del espaciador interno transcrito (*Internal transcribed spacer,* ITS) u otros marcadores de interés. Igualmente, se puede incluir otro tipo de muestras, como el hisopado orofaríngeo y el aspirado endotraqueal, para hacer un análisis más profundo de la micobiota de los pacientes intubados.

Es relevante realizar estudios adicionales orientados a determinar la necesidad de iniciar un tratamiento empírico en caso de que estos hongos fuesen los causantes de fungemia invasiva. De igual forma, es importante buscar correlación entre los microorganismos colonizadores y su probabilidad de generar enfermedades, como candidiasis invasiva. Esta breve descripción de la micobiota aislada de pacientes colombianos, puede contribuir al seguimiento de las infecciones (emergentes) asociadas con la asistencia respiratoria mecánica en las unidades de cuidados intensivos.

Agradecimientos

Los autores agradecen a los doctores Carlos Álvarez y José Antonio Rojas, por su ayuda en la obtención de las muestras de los tubos endotraqueales de la Clínica Colombia. Agradecemos a Álvaro Méndez Soto por su ayuda en los análisis de los resultados y la preparación del manuscrito. Las personas nombradas en esta sección aceptaron ser mencionadas.

Referencias

1. Instituto Nacional de Salud. Infecciones asociadas a dispositivos en unidades de cuidado intensivo, Colombia. 2020. Disponible en: https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/INFECCIONES %20ASOCIADAS %20A %20DISPOSITIVOS_2020.pdf
2. Asensio Martín MJ, Hernández Bernal M, Teruel SY, Minvielle A. Infecciones en el paciente crítico. Medicine - Programa de formación médica continuada acreditado. 2018;12:3085-96. https://doi.org/10.1016/j.med.2018.03.014
3. Percival SL, Williams DW, Randle J, Cooper T, editors. Biofilms in infection prevention and control. San Diego, CA: Elsevier; 2014. p. 199-208. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397043-5.00012-8
4. Danin PE, Girou E, Legrand P, Louis B, Fodil R, Christov C, *et al.* Description and microbiology of endotracheal tube biofilm in mechanically ventilated subjects. Respir Care. 2015;60:21-9. https://doi.org/10.4187/respcare.02722
5. Augustyn B. Ventilator-associated pneumonia: Risk factors and prevention. Crit Care Nurse. 2007;27:32-9. https://doi.org/10.4037/ccn2007.27.4.32
6. Depuydt P, Myny D, Blot S. Nosocomial pneumonia: Aetiology, diagnosis, and treatment. Curr Opin Pulm Med. 2006;3:192-7. https://doi.org/10.1097/01.mcp.0000219268.35063.b0
7. Heo S, Haase EM, Lesse AJ, Gill SR, Scannapieco FA. Genetic relationships between respiratory pathogens isolated from dental plaque and bronchoalveolar lavage fluid from patients in the intensive care unit undergoing mechanical ventilation. Clin Infect Dis. 2008;47:1562-70. https://doi.org/10.1086/593193
8. Sottile FD, Marrie TJ, Prough DS, Hobgood CD, Gower DJ, Webb LX, *et al.* Nosocomial pulmonary infection: Possible etiologic significance of bacterial adhesion to endotracheal tubes. Crit Care Med. 1986;14:265-70.
9. Schnabel RM, Linssen CF, Guion N, van Mook WN, Bergmans DC. *Candida* pneumonia in intensive care unit? Open Forum Infect Dis. 2014;1:1-6. https://doi.org/10.1093/ofid/ofu026
10. El-Ebiary M, Torres A, Fábregas N, de la Bellacasa JP, González J, Ramírez J, *et al.* Significance of the isolation of *Candida* species from respiratory samples in critically ill, non-neutropenic patients: an immediate postmortem histologic study. Am J Respir Crit Care Med. 1997;156:583-90. https://doi.org/10.1164/ajrccm.156.2.9612023
11. Su K-C, Chou K-T, Hsiao Y-H, Tseng C-M, Su VY-F, Lee Y-C, *et al.* Measuring (1,3)-β-D-glucan in tracheal aspirate, bronchoalveolar lavage fluid, and serum for detection of suspected *Candida pneumonia* in immunocompromised and critically ill patients: A prospective observational study. BMC Infect Dis. 2017;17:1-9. https://doi.org/10.1186/s12879-017-2364-2
12. Dermawan JKT, Ghosh S, Keating MK, Gopalakrishna KV, Mukhopadhyay S. *Candida pneumonia* with severe clinical course, recovery with antifungal therapy and unusual pathologic findings: A case report. Medicine (Baltimore). 2018;97:1-5. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000009650
13. Haas CF, Eakin RM, Konkle MA, Blank R. Endotracheal tubes: Old and new. Respir Care. 2014;59:933-55. https://doi.org/10.4187/respcare.02868
14. Sun F, Qu F, Ling Y, Mao P, Xia P, Chen H, *et al.* Biofilm-associated infections: Antibiotic resistance and novel therapeutic strategies. Future Microbiol. 2013;8:877-86. https://doi.org/10.2217/fmb.13.58
15. Gil-Perotin S, Ramírez P, Marti V, Sahuquillo JM, González E, Calleja I, *et al.* Implications of endotracheal tube biofilm in ventilator-associated pneumonia response: A state of concept. Crit Care. 2012;16:1-9. https://doi.org/10.1186/cc11357

16. El-Sayed A, Aleya L, Kamel M. Microbiota's role in health and diseases. Environ Sci Pollut Res. 2021;28:36967-83. https://doi.org/10.1007/s11356-021-14593-z

17. Del Campo-Moreno R, Alarcón-Cavero T, D-Auria G, Delgado-Palacio S, Ferrer-Martínez M. Microbiota en la salud humana: técnicas de caracterización y transferencia. Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed). 2018;36:241-5. https://doi.org/10.1016/j.eimc.2017.02.007

18. Restrepo-Rivera LM, Cardona-Castro N. Micobioma: diversidad fúngica en el cuerpo humano. CES Med. 2021;35:113-25. https://doi.org/10.21615/cesmedicina.5686

19. Bandara HMHN, Panduwawala CP, Samaranayake LP. Biodiversity of the human oral mycobiome in health and disease. Oral Dis. 2019;25:363-71. https://doi.org/10.1111/odi.12899

20. Belvoncikova P, Splichalova P, Videnska P, Gardlik R. The human mycobiome: Colonization, composition and the role in health and disease. J Fungi (Basel). 2022;8:1-26. https://doi.org/10.3390/jof8101046

21. Ruiz-Rodríguez A, Lusarreta-Parga P, de Steenhuijsen Piters WAA, Koppensteiner L, Balcazar-Lopez CE, Campbell R, *et al.* Bacterial and fungal communities in tracheal aspirates of intubated COVID-19 patients: A pilot study. Sci Rep. 2022;12:1-10. https://doi.org/10.1038/s41598-022-13482-w

22. Vandecandelaere I, Matthijs N, van Nieuwerburgh F, Deforce D, Vosters P, De Bus L, *et al.* Assessment of microbial diversity in biofilms recovered from endotracheal tubes using culture dependent and independent approaches. PLoS ONE. 2012;7:1-9. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038401

23. Martin-Loeches I, Dickson R, Torres A, Hanberger H, Lipman J, Antonelli M, *et al.* The importance of airway and lung microbiome in the critically ill. Crit Care. 2020. https://doi.org/10.1186/s13054-020-03219-4

24. Cifuentes EA, Sierra MA, Yepes AF, Baldión AM, Rojas JA, Álvarez-Moreno CA, *et al.* Endotracheal tube microbiome in hospitalized patients defined largely by hospital environment. Respir Res. 2022;23:168. https://doi.org/10.1186/s12931-022-02086-7

25. Karakuzu Z, Iscimen R, Akalin H, Girgin NK, Kahveci F, Sinirtas M. Prognostic risk factors in ventilator-associated pneumonia. Med Sci Monit. 2018;24:1321-8. https://doi.org/10.12659/MSM.905919

26. Pérez-Rodríguez G, Dias S, Pérez-Pérez M, Fdez-Riverola F, Azevedo NF, Lourenço A. Agent-based model of diffusion of N-acyl homoserine lactones in a multicellular environment of *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. Biofouling. 2018;34:335-45. https://doi.org/10.1080/08927014.2018.1440392

27. Meto A, Colombari B, Sala A, Pericolini E, Meto A, Peppoloni S, *et al.* Antimicrobial and antibiofilm efficacy of a copper/calcium hydroxide-based endodontic paste against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. Dent Mater J. 2019;38:591-603. https://doi.org/10.4012/dmj.2018-252

28. Sedlmayer F, Hell D, Müller M, Ausländer D, Fussenegger M. Designer cells programming quorum-sensing interference with microbes. Nat Commun. 2018;9:1-9. https://doi.org/10.1038/s41467-018-04223-7

29. Baghdadi E, Khodavaisy S, Rezaie S, Abolghasem S, Kiasat N, Salehi Z, *et al.* Antifungal susceptibility patterns of candida species recovered from endotracheal tube in an intensive care unit. Adv Med. 2016:9242031. https://doi.org/10.1155/2016/9242031

30. Albert M, Willamson D, Muscedere J, Lauzier F, Rostein C, Kanji S, *et al.* Candida in the respiratory tract secretions of critically ill patients and the impact of antifungal treatment: A randomized placebo-controlled pilot trial (CANTREAT study). Crit Care. 2014;18:352. https://doi.org/10.1186/cc13542

31. Delisle M-S, Williamson DR, Albert M, Perreault MM, Jiang X, Day AG, *et al.* Impact of *Candida* species on clinical outcomes in patients with suspected ventilator-associated pneumonia. Can Respir J. 2011;18:131-6. https://doi.org/10.1155/2011/827692

32. Huang D, Qi M, Hu Y, Yu M, Liang Z. The impact of *Candida* spp. airway colonization on clinical outcomes in patients with ventilator-associated pneumonia: A systematic review and meta-analysis. Am J Infect Control. 2020;48:695-701. https://doi.org/10.1016/j.ajic.2019.11.002

33. Góralska K, Blaszkowska J, Dzikowiec M. Neuroinfections caused by fungi. Infection. 2018;46:443-59. https://doi.org/10.1007/s15010-018-1152-2

34. Sánchez EG, Acosta D, Álvarez J, Sánchez G, García-Casallas J. Criptococosis diseminada por terapia biológica, se debe gestionar el riesgo. Biomedica. 2022;42:218-23. https://doi.org/10.7705/biomedica.6239

35. Burbano S, Gomez N, Álvarez P, González A, Turmino C, Asquineyer Y. Compromiso pulmonar por *Cryptoccus laurentii* en paciente inmunocomprometido. Rev Am Med Respir. 2020;2:185-8.

36. Vandewoude KH, Blot SI, Depuydt P, Benoit D, Temmerman W, Colardyn F, *et al.* Clinical relevance of *Aspergillus* isolation from respiratory tract samples in critically ill patients. Crit Care 2006;10:1-10. https://doi.org/10.1186/cc4823

37. El-Jurdi N, Ghannoum MA. The Mycobiome: Impact on health and disease states. Microbiol Spectr. 2017;5:1-10. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0045-2016

38. Lansbury L, Lim B, Baskaran V, Lim WS. Co-infections in people with COVID-19: A systematic review and meta-analysis. J Infect. 2020;81:266-75. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.05.046

39. Cox MJ, Loman N, Bogaert D, O'Grady J. Co-infections: potentially lethal and unexplored in COVID-19. Lancet Microbe. 2020;1:1. https://doi.org/10.1016/S2666-5247(20)30009-4

40. Zhu X, Ge Y, Wu T, Zhao K, Chen Y, Wu B, *et al.* Co-infection with respiratory pathogens among COVID-2019 cases. Virus Res. 2020;285:1-10. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198005

41. Zhang G, Hu C, Luo L, Fang F, Chen Y, Li J, *et al.* Clinical features and short-term outcomes of 221 patients with COVID-19 in Wuhan, China. J Clin Virol. 2020;127:1-7 https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104364

42. Koehler P, Cornely OA, Böttiger BW, Dusse F, Eichenauer DA, Fuchs F, *et al.* COVID-19 associated pulmonary aspergillosis. Mycoses. 2020;63:528-34. https://doi.org/10.1111/myc.13096

43. Alanio A, Dellière S, Fodil S, Bretagne S, Mégarbane B. Prevalence of putative invasive pulmonary aspergillosis in critically ill patients with COVID-19. Lancet Respir Med. 2020;8:48-9. https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30237-X

44. Rutsaert L, Steinfort N, van Hunsel T, Bomans P, Naesens R, Mertes H, *et al.* COVID-19-associated invasive pulmonary aspergillosis. Ann Intensive Care. 2020;10:1-4. https://doi.org/10.1186/s13613-020-00686-4

45. Janssen NAF, Nyga R, Vanderbeke L, Jacobs C, Ergün M, Buil JB, *et al.* Multinational Observational Cohort Study of COVID-19-Associated Pulmonary Aspergillosis. Emerg Infect Dis. 2021;27:2892-8. https://doi.org/10.3201/eid2711.211174

46. Pemán J, Ruiz-Gaitán A, García-Vidal C, Salavert M, Ramírez P, Puchades F, *et al.* Fungal co-infection in COVID-19 patients: Should we be concerned? Rev Iberoam Micol. 2020;37:41-6. https://doi.org/10.1016/j.riam.2020.07.001

47. Kelly BJ, Imai I, Bittinger K, Laughlin A, Fuchs BD, Bushman FD, *et al.* Composition and dynamics of the respiratory tract microbiome in intubated patients. Microbiome. 2016;4:1-13. https://doi.org/10.1186/s40168-016-0151-8

Biomédica 2023;43(Supl.1):194-205
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.6861

Artículo original

Tipificación bioquímica y evaluación de la patogenicidad de aislamientos vulvovaginales del complejo *Candida albicans*

Soraya Morales-López[1,2], Keiner Ustate[1], Zulay Pedrozo[1], Yulibeth Torres[1]

[1] Grupo CINBIOS, Programa de Microbiología, Universidad Popular del Cesar, Valledupar, Colombia
[2] Laboratorios Nancy Flórez García S.A.S., Valledupar, Colombia

Introducción. *Candida albicans*, *C. dubliniensis* y *C. africana* forman el complejo *Candida albicans*.
Objetivo. Identificar las características fenotípicas y patogénicas de aislamientos del complejo *C. albicans* conservados en una colección.
Materiales y métodos. Se evaluaron 300 aislamientos identificados presuntivamente como del complejo *C. albicans*, utilizando CHROMagar™ *Candida*. Se determinó la producción del tubo germinal mediante tres métodos, se evaluó la producción de clamidosporas, se caracterizaron las colonias en agares artesanales (*Rosmarinus officinalis* y *Nicotiana tabacum*) y se utilizó MALDI-TOF como prueba de referencia para la identificación. Para detectar factores de patogenicidad, se evaluó la actividad hemolítica de los aislamientos independientes y en cocultivo con *Staphylococcus aureus*, la producción de enzima coagulasa y la formación de biopelículas.
Resultados. El 43,7 % de los aislamientos produjo tubo germinal en caldo de medio infusión de cerebro-corazón y el 47 % generó clamidosporas. En los medios artesanales, en el 6 % de los aislamientos se obtuvieron colonias de color café en agar romero y, en el 5 %, en agar tabaco. Ninguna de las cepas hemolizó el agar sangre comercial (ni en presencia o ausencia de *S. aureus*), mientras que el 50 % hemolizó el agar papa dextrosa suplementado con sangre. Todos los aislamientos produjeron enzima coagulasa y la producción de biopelículas fue variable. Para la producción de tubo germinal, el método de suero humano mostró igual positividad que el de caldo de leche. Todos los aislamientos fueron identificados como *C. albicans* por MALDITOF.
Conclusiones. Se requieren herramientas de proteómica y pruebas moleculares, o la combinación de métodos, para poder discriminar entre especies.

Palabras clave: *Candida albicans*; candidiasis; biopelículas.

Biochemical typing and evaluation of pathogenicity in vulvovaginal isolates of *Candida albicans* complex

Introduction. *Candida albicans*, *C. dubliniensis*, and *C. africana* form the *Candida albicans* complex.
Objective. To identify the phenotypic and pathogenic characteristics of isolates of the *C. albicans* complex preserved in a collection.
Materials and methods. Three hundred presumptive strains of the *C. albicans* complex were evaluated using CHROMagar™ *Candida*. Germ tube production was determined by three methods, chlamydospores formation was assessed and colonies were characterized in artisanal agars (*Rosmarinus officinalis* and *Nicotiana tabacum*). MALDI-TOF was used as the gold standard identification test. To detect pathogenicity factors, we evaluated the hemolytic activity of each isolate and cocultured with *Staphylococcus aureus*, coagulase enzyme production, and biofilm formation.
Results. Out of the 300 isolates, 43.7% produced germ tube in the heart-brain infusion broth and 47% of the isolates produced chlamydospores. In the artisan media, 6% of the isolates produced brown colonies on rosemary agar and 5% did so on tobacco agar. None of the strains hemolyzed the blood agar alone or cocultured with *S. aureus*. However, 50% of the isolates hemolyzed the potato dextrose agar supplemented with blood. All strains were coagulase producers, and biofilm production was variable. For germ tube production, the human serum method showed the same positivity as the milk broth method. All isolates were identified as *C. albicans* by MALDI-TOF.
Conclusions. The use of proteomics, molecular tests or a combination of methods is required for species identification.

Key words: *Candida albicans*; candidiasis; biofilms.

Recibido: 26/01/2023
Aceptado: 11/05/2023
Publicado: 13/06/2023

Citación:
Morales-López S, Ustate K, Pedrozo Z, Torres Y. Tipificación bioquímica y evaluación de la patogenicidad de aislamientos vulvovaginales del complejo *Candida albicans*. Biomédica. 2023;43(Supl.1):194-205. https://doi.org/10.7705/biomedica.6861

Correspondencia:
Soraya Morales-López, Laboratorios Nancy Flórez García S.A.S., Calle 16a N° 1638 Barrio Santana, Valledupar, Colombia
Teléfonos: (311) 738 2295 y (315) 837 4642
sorayaeugeniam@hotmail.com

Contribución de los autores:
Soraya Morales-López: concepción y escritura del manuscrito
Keiner Ustate, Zulay Pedrozo y Yulibeth Torres: escritura del manuscrito
Todos los autores participaron en el trabajo de laboratorio y en la revisión del manuscrito.

Financiación:
Para la realización de esta investigación, los autores contaron con el apoyo financiero de la Convocatoria 891 de 2020 de MINCIENCIAS y de la Convocatoria Interna de Investigación 2019 de la Universidad Popular del Cesar.

Conflicto de intereses:
Los autores de esta investigación declaran no tener conflicto de intereses.

Candida albicans es un complejo de especies crípticas o estrechamente relacionadas que incluye a *C. albicans sensu stricto*, *C. dubliniensis* y *C. africana*. En la actualidad, *C. albicans sensu stricto* es reconocida como el agente causal más común en las infecciones micóticas (1,2).

Candida dubliniensis y *C. africana* se consideraron inicialmente como especies "menores" o variedades biológicas de *C. albicans*, y se reportaron como "cándidas atípicas" por compartir características fenotípicas. Hoy, *C. dubliniensis* se reconoce como una especie y *C. africana* se considera una variedad de *C. albicans* (3).

Entre las características estudiadas mediante pruebas fisiológicas para diferenciar las especies del complejo, se encuentran el color de las colonias en los medios cromógenos, el crecimiento a 45 °C, la producción de clamidosporas, la morfología de las colonias en agar Staib o agar tabaco y la inhibición del crecimiento en medio con concentraciones altas de sal, etc. No obstante, ninguna prueba es completamente específica (4,5).

Candida dubliniensis fue descrita por primera vez en 1995 (6) y se reconoce como una levadura capaz de producir clamidosporas y tubos germinativos, al igual que *C. albicans*. *C. dubliniensis* es un agente patógeno significativamente menos virulento y versátil, que se ha recuperado en ubicaciones geográficas en diversas zonas geográficas (7). En Colombia, este microorganismo fue identificado por primera vez mediante métodos fenotípicos en 2008 (8).

Candida africana es la especie emergente más reciente de este complejo, posee tubo germinal, no asimila N-acetilglucosamina y no produce clamidosporas. Se aisló por primera vez a partir de muestras de pacientes de África y Alemania (9) y, desde el 2001, se considera una variedad de *C. albicans* (*C. albicans* var. *africana*) (3,10). Se ha identificado en países como Chile, Nigeria, Irán y Argentina (1,3-4,11,12). En Colombia, la identificación molecular de *C. africana* a partir de cepas caracterizadas previamente como *C. albicans* atípicas, arrojó resultados sugestivos de *C. albicans* (5). En la actualidad, la identificación definitiva de *C. africana* requiere pruebas adicionales, como técnicas moleculares para detectar el gen *hwp1* (13,14).

Por otra parte, y en relación con los factores determinantes de la patogénesis (producción de hemolisinas, biopelículas y enzimas), con los recientes estudios se demuestra el creciente interés en aislamientos de *C. albicans* y *C. dubliniensis* (15-17). Se sabe que todos estos factores patogénicos juegan un rol importante en el proceso infeccioso, la colonización y la permanencia del hongo en la superficie corporal, además de la formación de poros y el efecto lítico en las células eucarióticas; no obstante, aún es mucho lo que se desconoce.

El objetivo de este trabajo fue identificar las características fenotípicas y patogénicas de aislamientos vulvovaginales del complejo *Candida albicans,* mediante su cultivo en diferentes medios enriquecidos, la evaluación de la actividad de las hemolisinas y la formación de biopelículas.

Materiales y métodos

Se estudiaron 300 aislamientos de levaduras, recolectados durante los años 2018 y 2019, y conservados en una colección de cultivos. Las cepas se aislaron de frotis vulvovaginales de igual número de pacientes adultas, con diagnóstico presuntivo de candidiasis vulvovaginal, quienes asistieron a dos laboratorios clínicos de Valledupar.

Para la recuperación de las cepas, las muestras se sembraron en agar Sabouraud y se incubaron a 37 °C durante 48 horas. Los tubos en los que no se observó crecimiento, se resembraron en caldo infusión de cerebro-corazón (*Brain Heart Infusion*, BHI) con enriquecimiento Fildes.

Identificación morfológica y fenotípica

CHROMagar™ Candida. Las cepas aisladas se sembraron en CHROMagar™ *Candida* y se incubaron a 35 °C por 48 horas. Se seleccionaron las colonias de color verde por considerarse presuntivas del complejo *C. albicans.*

Como controles, se emplearon las cepas de *C. albicans* de la *American Type Culture Collection* (ATCC), con números de catálogo ATCC 10231 y ATCC 90028; *C. africana* MYA-2669 y *C. dubliniensis* – ATCC 3949.

Formación de tubo germinal. La formación del tubo germinal se evaluó con caldo de leche, caldo infusión de cerebro-corazón y suero humano. Para todos los casos, se preparó un inóculo (10^5 a 10^6 células por ml) con una colonia aislada y joven –menos de 48 horas– y se homogenizó en tubos que contenían 5 ml de caldo de leche o caldo infusión de cerebro-corazón o 0,5 ml de suero humano, y se incubaron a 37 °C. Después de dos horas, se hicieron los montajes entre lámina y laminilla, y se observaron microscópicamente con ayuda de un objetivo que amplifica 400 veces, en busca de prolongaciones filamentosas (18).

Formación de clamidoconidias. Para la producción de clamidoconidias, se usó el mismo tubo de la prueba para tubo germinal, cuya incubación a 37 ºC se extendió hasta por cinco días. Se realizó la lectura por microscopía óptica en busca de estructuras redondas con pared celular gruesa (4).

Crecimiento en agar romero (Rosmarinus officcinalis) y agar tabaco (Nicotiana tabacum). Para la diferenciación presuntiva de *C. dubliniensis*, cada cepa se sembró por agotamiento en agar romero (*Rosmarinus officinalis*) y agar tabaco (*Nicotiana tabacum*), y se incubó por 4 a 5 días a 37 °C.

En el agar romero, se inspeccionó la apariencia de la colonia y se determinó la presencia o ausencia de clamidoconidias (19). Se consideraron aislamientos presuntivos de *C. dubliniensis* aquellos con colonias rugosas, bordes de hifas periféricas y abundantes clamidosporas; mientras que se presumieron como aislamientos de *C. albicans* aquellos con colonias lisas y sin clamidosporas.

En el agar tabaco, se analizaron el color y el aspecto de la colonia, y la formación de clamidoconidias. Se consideraron aislamientos presuntivos de *C. dubliniensis* aquellos con colonias rugosas de color café y con abundantes clamidoconidias (20,21). Se presumió que los aislamientos con colonias lisas blancas o crema y sin clamidoconidias, correspondían a *C. albicans.*

Evaluación de la patogenicidad

Actividad hemolítica. La actividad hemolítica se evaluó en agar sangre de carnero (Ad-bio- ANNAR™) y agar papa dextrosa (Scharlau™) suplementado con 5 % de sangre fresca de carnero y 3 % de glucosa. Por cada aislamiento se marcó una estría sobre el agar y las placas se incubaron a 37°C, por 48 horas, en atmósfera microaerofílica (22). Las hemólisis beta (total) y la alfa (parcial) se consideraron resultados positivos. Se emplearon aislamientos de

S. aureus (ATCC 25923) y *C. albicans* (ATCC 10231) como controles positivos en agar sangre de carnero y agar PDA con sangre, respectivamente.

Efecto cohemolítico o factor CAMP como indicador de hemólisis de tipo beta en cocultivo con Staphylococcus aureus. Se evaluó la producción de factor CAMP como indicador de hemólisis de tipo beta en cocultivo con *S. aureus.* Se hizo una siembra perpendicular con una estría de *S. aureus* ATCC 25923, a una distancia de 10 mm desde el borde de la colonia de la levadura. Las placas se incubaron a 37 °C por 48 horas en atmósfera microaerofílica, en búsqueda de una deformación en punta de flecha en la intersección de las hemólisis (15,17,23). Como controles positivos, se utilizaron las cepas de referencia *S. aureus* (ATCC 25923) y *S. agalactiae* (ATCC 12386).

Formación de biopelículas. Para la formación de biopelículas, se prepararon soluciones en tubos de poliestireno cónico, con tapa de rosca, con 5 ml de caldo Sabouraud dextrosa al 8 % inoculado con una colonia de cada aislamiento (10^5 a 10^6 células por ml). Los tubos se incubaron a 35 °C en el equipo *Shaking Incubator* (Being™ THZ-300) con agitación constante a 75 rpm por 72 horas. Se aspiró el contenido del caldo y se hicieron dos lavados con agua destilada. Para evidenciar la formación de la biopelícula, se agregaron 3 ml de safranina al 1, 5 y 10 % por 10 minutos y se decantó por inversión. Los resultados se interpretaron como positivo (fuerte, moderado, débil) o negativo (ausente), por inspección visual de una capa de biopelícula adherente en la parte inferior y en la pared de los tubos (15,17). Se emplearon *C. albicans* (ATCC 10231) como control positivo y solución salina fisiológica como control negativo.

Producción de coagulasa. A partir de un subcultivo en agar Sabouraud (incubado a 37 °C durante 48 horas), se inoculó una colonia de los microorganismos en un tubo con 3 ml de plasma de conejo con EDTA (10^5 a 10^6 células por ml). Este se incubó por 4 horas a 37 °C. Los tubos se inclinaron cada media hora de forma suave. La prueba de coagulasa se consideró positiva cuando se observó la formación de un coágulo (24). Se usó *S. aureus (*ATCC 25923) como control positivo.

Todas las pruebas se practicaron por triplicado en tres días diferentes.

Prueba de referencia

Todas las cepas fueron identificadas por espectometría de masas MALDI-TOF (espectometría de masas de tipo desorción-ionización láser, asistida por matriz, acoplada a un detector iónico de tiempo de vuelo) en el equipo Vitek MS™ (bioMérieux), de acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante. La identificación se consideró confiable con un puntaje superior al 98 % (25).

Resultados

Identificación morfológica y fenotípica

En el CHROMagar™ *Candida* se observaron colonias en diferentes tonalidades de color verde (figura 1a), sin que fuera posible hacer una clara discriminación que permitiera su cuantificación.

Todos los 300 aislamientos formaron tubo germinal en medio de suero humano y caldo de leche; mientras que 131 (43,7 %) lo hicieron por el método con caldo infusión de cerebro-corazón (figura 1b y cuadro 1). Se obtuvo producción de clamidoconidias en 141 aislamientos (47 %), luego de cinco días de incubación a 37 °C (figura 1c y cuadro 1).

En relación con las características de crecimiento en agares artesanales, en el agar romero, se encontró que todas las colonias fueron lisas y sin presencia de hifas periféricas. En el caso del agar tabaco, se encontró que 15 aislamientos (5 %) produjeron colonias de color café; mientras que 285 aislamientos produjeron colonias de color cremablanco. Ningún aislamiento produjo clamidosporas en estos medios (figura 1d y cuadro 1).

Mecanismos de patogenicidad

La prueba de hemólisis se practicó en agar sangre comercial (Ad-bio™), y agar papa dextrosa (Scharlau™) suplementado con glucosa y sangre de carnero.

Antes de la selección de los medios, se hicieron pruebas con cepas hemolíticas de *S. aureus* (ATCC 25923) y *C. albicans* (ATCC 10231) en agar papa dextrosa suplementado con glucosa y sangre humana, con sangre fresca de carnero y con sangre comercial de carnero, sin que se obtuviera crecimiento del microorganismo bacteriano en ninguno de estos medios.

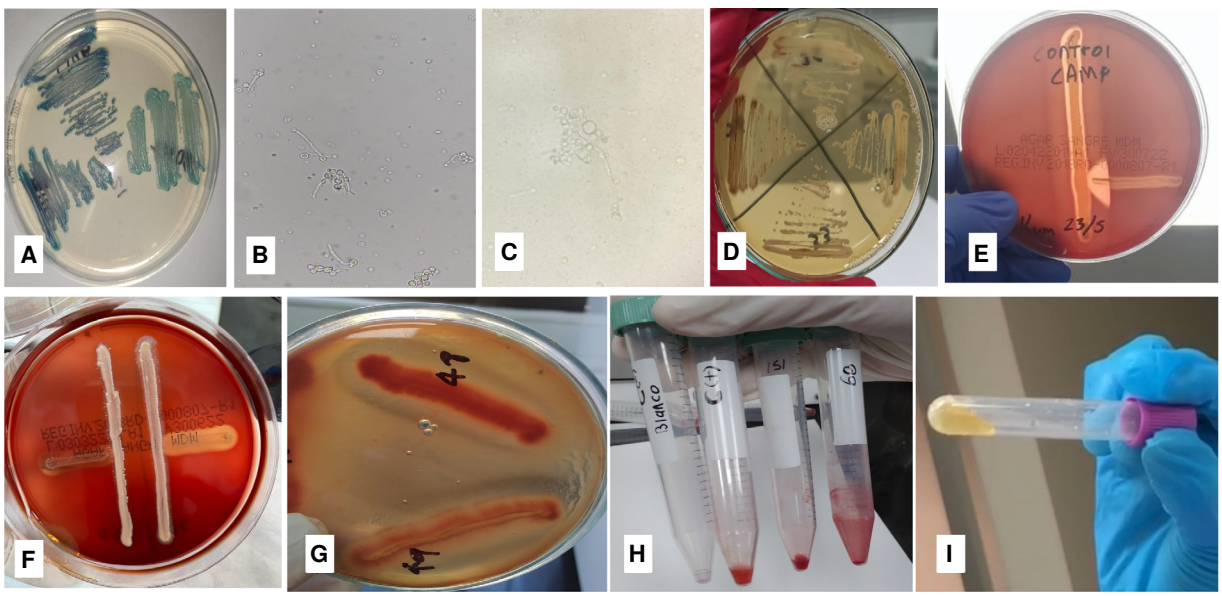


Figura 1. a. Tonalidades de verde en CHROMagar™ *Candida*. **b.** Imagen de tubos germinales, 400X. **c.** Producción de clamidoconidias, 400X. **d.** Colonia café (izquierda) en agar romero. **e.** Control positivo de la prueba de Christie, Atkins y Munch-Peterson (CAMP) en medio agar con sangre comercial. **f.** Prueba CAMP negativa en dos aislamientos de *Candida* (líneas verticales). **g.** Hemólisis generada por dos aislamientos de *Candida* en agar papa dextrosa y sangre, con suplemento de glucosa. **h.** Controles (negativo y positivo) y resultados positivos de formación de biopelículas (débil/fuerte), con 10% de safranina, en dos aislamientos. **i.** Prueba positiva para coagulasa.

Cuadro 1. Características fenotípicas y determinantes de la patogenicidad evaluadas en los aislamientos del complejo *Candida albicans*. Los valores están expresados en porcentaje.

Tubo germinal			CLAM		Agar romero		Agar tabaco			Hemólisis y CAMP en agar sangre	Hemólisis y CAMP en agar papa dextrosa	Producción de biopelículas			Coag.	Identificación por MALDI-TOF
					Aspecto de la colonia	CLAM	Color y aspecto de la colonia		CLAM							
Suero	Caldo leche	Caldo infusión de cerebro-corazón	Pos	Neg	Rugosa	Pos	Café/ rugoso	Blanco/ liso	Pos	Pos	Pos	Débil	Moderado	Fuerte	Pos	*Candida albicans*
100	100	43,7	47	53	0	0	5	95	0	0	50	24,8	28,7	28,1	100	100

CLAM: clamidoconidias; CAMP: prueba de Christie, Atkins y Munch-Peterson para detectar *Streptococcus agalactiae*; AS: agar sangre comercial; PDA: agar papa dextrosa: agar papa dextrosa con suplemento 3 % de glucosa al 3 % y sangre de carnero al 5 %; Coag: prueba de coagulasa; infusión de cerebro-corazón: medio de infusión de cerebro-corazón; Pos: positivo; Neg: negativo; MALDI-TOF: espectometría de masas tipo desorción/ionización láser, asistida por matriz, acoplada a un detector iónico de tiempo de vuelo

En agar sangre (Ad-bio™), las colonias de *S. aureus* crecieron y produjeron hemólisis completa, característica de esta cepa (figura 1e). Sin embargo, para este medio, no se encontraron cepas productoras de hemolisinas y con ningún aislamiento se generó hemólisis o punta de flecha en cocultivo con los aislamientos de *S. aureus* (figura 1f y cuadro 1).

En todas las diferentes versiones del agar papa dextrosa con sangre y glucosa, hubo crecimiento y hemólisis del microorganismo *C. albicans* (ATCC 10231). Además, el 50 % de los aislamientos generó hemólisis completa y produjo el factor CAMP (punta de flecha) con el aislamiento de *S. aureus* (figura 1g).

En relación con la producción de biopelículas, los resultados se apreciaron mejor con 10 % de safranina. De los 300 asilamientos, 246 (82 %) fueron positivos para la formación de biopelículas: 85 aislamientos (28 %) lo hicieron de forma fuerte; 86 (29 %), de forma moderada y 74 (25 %) produjeron una biopelícula débil (figura 1h) (cuadro 1). Todos los aislamientos (300) coagularon el plasma durante las dos primeras horas de incubación (figura 1i y cuadro 1).

Espectometría de masas MALDI-TOF. Todos los aislamientos se identificaron como *C. albicans* mediante la técnica de MALDI-TOF, utilizando el equipo Vitek MS.

Discusión

Las técnicas de secuenciación de ADN han generado avances en el conocimiento de los microorganismos, lo que ha ocasionado cambios sustanciales en la taxonomía de los hongos. Así, las que antes eran consideradas simples morfoespecies han sido sustituidas por complejos de especies crípticas que difieren en virulencia y en su reacción frente a los antifúngicos, de ahí la importancia de su correcta identificación (26).

En esta investigación, se encontraron aislamientos con distintas tonalidades de color verde en CHROMagar™ *Candida*. Estos resultados coinciden con los descritos por Vieille *et al.* en 2022, quien empleó este medio para levaduras del complejo *C. albicans* y encontró que sus aislamientos mostraban tonalidades verdes con leves diferencias (4).

Igualmente, Ballesté *et al.* (2005), Alfonso *et al.* (2010), Odds *et al.* (2000), Madhavan *et al.* (2011) y Vecchione *et al.* (2017), ya habían descrito antes las levaduras de color verde dentro del complejo *C. albicans* (27-31).

En 1998, Sullivan *et al.* describieron las diferencias entre especies utilizando agar CHROMagar™ *Candida*: *C. albicans* produjo colonias de color azul verdoso claro, mientras que *C. dubliniensis* produjo colonias de color verde oscuro después de 48 horas de crecimiento a 37 °C (32). Estos hallazgos también los describieron Romeo y Criseo, quienes encontraron que *C. africana* producía colonias con un tono levemente verde (13).

En el presente trabajo, la tonalidad de la colonia no estuvo relacionada con la identificación a nivel de especie. Los hallazgos reportados por otros autores podrían estar relacionados con la preparación del lote del medio, el tiempo de conservación de los aislamientos, etc. (31). Cabe mencionar que tampoco fue posible la diferenciación por tonalidad de las cepas *C. albicans*, *C. africana* y *C. dubliniensis*, empleadas como control.

Por otro lado, la prueba del tubo germinal, conocida también como la de filamentación en suero o filamentación precoz, se consideraba la más sencilla, rápida y económica para la identificación preliminar de los aislamientos del complejo *C. albicans* (18). En el presente trabajo, los resultados de esta prueba variaron según la técnica empleada: los mayores índices de positividad se obtuvieron con suero humano y con caldo de leche. Estos hallazgos son similares a los descritos en 2008 por Pineda *et al.*, quienes obtuvieron una positividad del 93,8 % (21). No obstante, otros estudios, como los de Yazdanpanah y Khaithir (2014), muestran una positividad menor, con variaciones entre el 51 y el 63 % (33).

Los aislamientos de *C. albicans* no productores de clamidoconidias pueden considerarse infrecuentes y reconocerse como atípicos. En Colombia, Rodríguez-Leguizamón *et al.* trabajaron con 11 cepas identificadas como *C. albicans* incapaces de producir clamidosporas y cuyas espectrometrías MALDI-TOF las caracterizaron como *C. albicans/C. africana, C. albicans o C. africana*. No obstante, todos los aislamientos fueron tipificados molecularmente como *C. albicans* cuando se amplificó el gen *hwp1* (5).

En relación con los medios que se emplean para la formación de clamidoconidias, suelen ser variados e incluyen el caldo con leche diluida (34-36). Aunque la temperatura de incubación para el desarrollo de clamidoconidias suele ser entre 28 y 30 °C, algunos autores han realizado incubaciones hasta los 41 ºC (37). Así, el bajo porcentaje de resultados positivos para la formación de clamidoconidias en esta investigación, podría estar relacionado aislamientos.

A propósito del uso del agar tabaco como medio de cultivo para la discriminación rápida entre *C. dubliniensis* y *C. albicans*, Pineda *et al.* (2008) encontraron que el 100 % de los aislamientos de *C. dubiniensis* produjeron colonias cafés y rugosas, mientras que el 98,5 % de las colonias de *C. albicans* fueron blancas y lisas (21). A pesar de que la literatura científica indica que las colonias de color marrón amarillento con bordes festoneados son típicas de *C. dubliniensis* (20), nuestros resultados arrojaron 15 aislamientos de color café que fueron identificados como *C. albicans* por MALDI-TOF. Es importante recordar que ninguno de esos aislamientos había producido clamidoconidias, por lo que, ante la ausencia de estas estructuras, la similitud con *C. dubliniensis* se limitaba al color de la colonia.

Silveira *et al.* (2011) también obtuvieron una coloración diferente a la esperada con el agar tabaco: los autores describieron las colonias de *C. dubliniensis* como de *C. albicans*, ya que estas presentaron morfotipo y micromorfología típicos de esta última especie (38).

Asimismo, el agar romero fue descrito por De Loreto *et al.* (2008) para diferenciar entre *C. dubliniensis* y *C. albicans* (19) y, aunque es escasa la información bibliográfica que documenta su empleo, en esta investigación se encontró que ninguno de los aislamientos produjo colonias rugosas o con clamidoconidias. Curiosamente, 18 aislamientos (6 %) produjeron colonias de color café, pero de contorno liso y sin clamidoconidias, por lo cual se descartó la presencia de aislamientos típicos de *C. dubliniensis.*

En cuanto a la expresión de mecanismos de patogenicidad, de los 300 aislamientos probados, ninguno fue capaz de producir hemólisis o factor CAMP en el agar sangre preparado y distribuido de forma comercial. Estos resultados son opuestos a los descritos por Pakshir *et al.*, quienes

encontraron que todos sus aislamientos (110) produjeron hemólisis completa y casi la mitad de los aislamientos fueron positivos para el factor CAMP con cepas de referencia de *S. aureus* (43,6 %) y *S. agalactiae* (49 %) como controles positivos (15).

Por otra parte, en agar papa dextrosa con suplemento de glucosa y sangre de carnero, la mitad de los aislamientos produjo hemólisis completa. Los patrones de hemólisis en las levaduras de este complejo ya se habían descrito anteriormente, con amplia variabilidad en los resultados: Sardi *et al.* (Brasil), Luo *et al.* (China) y, recientemente, Nouraei *et al.* (Irán), encontraron que todos sus aislamientos produjeron hemólisis completa (39-41). Wan *et al.* (China) informaron que todas sus cepas produjeron hemólisis (sin especificar el tipo de hemólisis), mientras que El Baz *et al.* (Egipto) y Noori, *et al.* (Irán), reportaron que la hemólisis fue completa solo en el 79 y el 28 % de los aislamientos estudiados, respectivamente (42-44). Estas variaciones en el patrón de hemólisis podrían estar asociadas con los genotipos circulantes en cada región geográfica.

Todos estos autores emplearon agar Sabouraud dextrosa con 5-7 % de sangre de carnero fresca y 3 % de glucosa. En otro estudio, Maheronnaghsh *et al.* emplearon sangre humana y obtuvieron hemólisis en más del 70 % de los aislamientos (45).

La ausencia de hemólisis fue descrita en 1994 por Manns *et al*. al emplear placas de agar Sabouraud o tripticasa de soya con sangre, pero sin enriquecimiento con 3 % de glucosa, o cuando los cultivos se incubaron a temperaturas diferentes a 37 °C (46). No obstante, estas limitaciones se evitaron en esta investigación. Cabe anotar que el papel exacto de las hemolisinas en la infección por hongos no se ha dilucidado por completo (40).

Por otra parte, los resultados en la formación de biopelículas del presente estudio (82 %) fueron similares a los descritos por Pakshir *et al.* (15), quienes encontraron biopelículas en el 62,7 % de los aislamientos; y la producción de biopelículas según su intensidad (débil, moderada fuerte), fue similar a la descrita por Mohammadi *et al.* en 2021 (47).

Las biopelículas han sido descritas como un factor importante de patogenicidad y resistencia en las levaduras (48-49*)*. De hecho, algunos autores consideran que el crecimiento de hifas y la formación de biopelículas son los principales factores que optimizan la progresión de la patogenicidad en *Candida* spp. (16,41,43). Así, y a pesar de que la formación de biopelículas se asocia más comúnmente con *C. albicans*, este mecanismo también ha sido descrito en *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y la levadura emergente multirresistente *C. auris* (50-53).

A propósito de la producción de enzima coagulasa como factor de patogénesis, los resultados de esta investigación fueron similares a los descritos por Rodrigues *et al.* (24), quienes no solo describieron la presencia de esta enzima en los aislamientos de *C. albicans* (88,5 %), sino también, en los de otras especies del género *Candida* (con excepción de *C. krusei*), que incluían aislamientos cepas de *C. tropicalis* (82,6 %) y *C. parapsilosis* (34,5 %), entre otras. De modo contrario, Seifi *et al.*, en 2015, no encontraron cepas productoras de coagulasa entre más de 100 aislamientos de diferentes especies de *Candida* (incluyendo 51 de *C. albicans),* aun con incubaciones de hasta 24 horas (54).

La producción de coagulasa se ha propuesto como una capa de protección frente a los macrófagos y se ha descrito en *C. parapsilosis, C. glabrata, C. guilliermondi*, entre otras especies del género (24,55).

Finalmente, en esta investigación todos los aislamientos fueron identificados como *C. albicans* mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, lo que sugiere que la circulación y la frecuencia de aislamientos de las especies emergentes *C. dubliniensis* y *C. africana*, a partir de colecciones de cultivos o muestras vaginales, son infrecuentes.

Estos resultados coinciden con los obtenidos en 2012 en Nigeria, donde encontraron que solo dos de los 117 aislamientos en una colección de cultivos correspondían a *C. africana* y no encontraron aislamientos de *C. dubliniensis* (12); o con los descritos por Theil *et al.,* en 2016 en Argentina, quienes determinaron la prevalencia de *Candida dubliniensis* (1,39 %) y *C. africana* (0.35 %) en una colección de 287 cepas (1). Asimismo, en 2017, Hazirolan *et al.* reexaminaron 376 aislamientos identificados como *C. albicans* y encontraron tres de *C. africana* y tres de *C. dubliniensis*, con una prevalencia de 0,8 % (56). Durante ese mismo año, Pakshir *et al.* realizaron un estudio para discriminar *C. africana* a partir de 110 cepas identificadas previamente como *C. albicans*, sin encontrar aislamientos de *C. africana* (15).

Como se mencionó previamente, en el país, Rodríguez-Leguizamón *et al.* (2015) describieron una colección de aislamientos de *C. albicans* con variaciones atípicas; no obstante, la identificación molecular reveló correspondencia con *C. albicans* y los espectros de masas obtenidos por MALDI-TOF (utilizando el equipo MALDI Biotyper – Bruker Daltonics), no fueron concluyentes (5).

En conclusión, la presencia de *C. dubliniensis* y *C. africana* es escasa o nula en colecciones de cultivos o aislamientos previamente identificados como *C. albicans*, y la presencia de mecanismos de patogenicidad en dichos aislamientos es variable.

Debido a que ninguna prueba manual es completamente específica, las pruebas complementarias o comerciales son útiles para discriminar *C. albicans* y *C. dubliniensis.* En el caso de *C. africana,* y por ser una variedad de *C. albicans*, las pruebas moleculares son la herramienta necesaria para su identificación.

Referencias

1. Theill L, Dudiuk C, Morano S, Gamarra S, Nardin ME, Méndez E, *et al.* Prevalence and antifungal susceptibility of *Candida albicans* and its related species *Candida dubliniensis* and *Candida africana* isolated from vulvovaginal samples in a hospital of Argentina. Rev Argent Microbiol. 2016;48:43-9. https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.10.003
2. Pappas PG, Lionakis MS, Arendrup MC, Ostrosky-Zeichner L, Kullberg BJ. Invasive candidiasis. Nat Rev Dis Primers. 2018;4:1-20. https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.26
3. Mucci MJ, Cuestas ML, Landanburu MF, Mujica MT. Prevalence of *Candida albicans, Candida dubliniensis* and *Candida africana* in pregnant women suffering from vulvovaginal candidiasis in Argentina. Rev Iberoam Micol. 2017;34:72-6. https://doi.org/10.1016/j.riam.2016.09.001
4. Vieille P. Identificación de cepas del complejo *Candida albicans* aisladas de muestras clínicas en la región de Valparaíso, Chile. Boletín Micológico. 2022;37:2-8. https://doi.org/10.22370/bolmicol.2022.37.1.3217

5. Rodríguez-Leguizamón G, Fiori A, López LF, Gómez BL, Parra-Giraldo CM, Gómez-López A, *et al.* Characterising atypical *Candida albicans* clinical isolates from six third-level hospitals in Bogotá, Colombia. BMC Microbiol. 2015;15:1-10. https://doi.org/10.1186/s12866-015-0535-0
6. Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC. *Candida dubliniensis* sp. nov.: Phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. Microbiology. 1995;141:150721. https://doi.org/10.1099/13500872-141-7-1507
7. Jackson AP, Gamble JA, Yeomans T, Moran GP, Saunders D, Harris D, *et al.* Comparative genomics of the fungal pathogens *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. Genome Res. 2009;19:2231-44. https://doi.org/10.1101/gr.097501.109
8. Álvarez MI, Suárez BL, Caicedo LD. Isolation of *Candida dubliniensis* for the first time in Cali, Colombia, and its identification with phenotyping methods. Mycopathologia. 2009;167:19-24. https://doi.org/10.1007/s11046-008-9145-9
9. Tietz HJ, Hopp M, Schmalreck A, Sterry W, Czaika V. *Candida africana* sp. nov., a new human pathogen or a variant of *Candida albicans*? Mycoses. 2001;44:437-45. https://doi.org/10.1046/j.1439-0507.2001.00707.x
10. Hu Y, Yu A, Chen X, Wang G, Feng X. Molecular characterization of *Candida africana* in genital specimens in Shanghai, China. Biomed Res Int. 2015;185387. https://doi.org/10.1155/2015/185387
11. Yazdanparast SA, Khodavaisy S, Fakhim H, Shokohi T, Haghani I, Nabili M, *et al.* Molecular characterization of highly susceptible *Candida africana* from vulvovaginal candidiasis. Mycopathologia. 2015;180:317-23. https://doi.org/10.1007/s11046-015-9924-z
12. Nnadi NE, Ayanbimpe GM, Scordino F, Okolo M, Enweani IB, Criseo G, *et al.* Isolation and molecular characterization of *Candida africana* from Jos, Nigeria. Med Mycol. 2012;50:765-7. https://doi.org/10.3109/13693786.2012.662598
13. Romeo O, Criseo G. *Candida africana* and its closest relatives. Mycoses. 2011;54:475-86. https://doi.org/ 10.1111/j.1439-0507.2010.01939.x
14. Romeo O, Criseo G. First molecular method for discriminating between *Candida africana, Candida albicans,* and *Candida dubliniensis* by using hwp1 gene. Diagn Microbiol Infect Dis. 2008;62:230-3. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.05.014
15. Pakshir K, Bordbar M, Zomorodian K, Nouraei H, Khodadadi H. Evaluation of CAMP-like effect, biofilm formation, and discrimination of *Candida africana* from vaginal *Candida albicans* species. J Path. 2017;7126258. https://doi.org/10.1155/2017/7126258
16. Mba IE, Nweze EI. Mechanism of *Candida* pathogenesis: revisiting the vital drivers. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2020;39:1797-819. https://doi.org/10.1007/s10096-020-03912-w
17. Pakshir K, Sheykhi S, Zomorodian K, Nouraei H, Zare Shahrabadi Z. Evaluation of biofilm formation in the homozygous and heterozygous strains of vaginal *Candida albicans* isolates. Curr Med Mycol. 2019;5:37-40. https://doi.org/10.18502/cmm.5.2.1160
18. Duarte A, Márquez A, Araújo C, Pérez C. Modalidades de la prueba del tubo germinal. Rev Soc Ven Microbiol. 2009;29:66-8.
19. De Loreto ES, Pozzatti P, Alves Scheid L, Santurio D, Morais Santurio J, Alves SH. Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on rosemary extract agar and oregano extract agar. J Clin Lab Anal. 2008;22:172-7. https://doi.org/10.1002/jcla.20237
20. Khan ZU, Ahmad S, Mokaddas E, Chandy R. Tobacco agar, a new medium for differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. J Clin Microbiol. 2004;42:4796-8. https://doi.org/10.1128/JCM.42.10.4796-4798.2004
21. Pineda G, Scollo K, Santiso G, Lehmann E, Arechavala A. Isolation of *Candida dubliniensis* in different clinical samples. Analysis of phenotypical methods to differentiate it from *Candida albicans*. Rev Argent Microbiol. 2008;40:211-7
22. Riceto EB de M, Menezes R de P, Penatti MPA, Pedroso R dos S. Enzymatic and hemolytic activity in different *Candida* species. Rev Iberoam Micol. 2015;32:79-82. https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.11.003
23. Döğen A, Gümral R, Ilkit M. Haemolytic and co-haemolytic (CAMP-like) activity in dermatophytes. Mycoses. 2015;58:40-7. https://doi.org/10.1111/myc.12269

24. Rodrigues AG, Pina-Vaz C, Costa-de-Oliveira S, Tavares C. Expression of plasma coagulase among pathogenic *Candida* species. J Clin Microbiol. 2003;41:5792-3 https://doi.org/10.1128/JCM.41.12.5792-5793.2003

25. Teke L, Barış A, Bayraktar B. Comparative evaluation of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for non-albicans *Candida* and uncommon yeast isolates. J Microbiol Methods. 2021;185:106232. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106232

26. Guarro J. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2012;30:33-9. https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.09.006

27. Ballesté R, Arteta Z, Fernández N, Cristina M, Mousqués N, Xavier B, *et al.* Evaluación del medio cromógeno CHROMagar™ *Candida* para la identificación de levaduras de interés médico. Rev Med Urug (Montev). 2005;21:186-93.

28. Alfonso C, López M, Arechavala A, del Carmen Perrone M, Guelfand L, Bianchi M. Identificación presuntiva de *Candida* spp. y de otras levaduras de importancia clínica: utilidad de brilliance *Candida* agar. Rev Iberoam Micol. 2010;27:90-3. https://doi.org/10.1016/j.riam.2010.01.008

29. Odds FC, Davidson A. "Room temperature" use of CHROMagar *Candida*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2000;38:147-50. https://doi.org/10.1016/s0732-8893(00)00197-8

30. Madhavan P, Jamal F, Chong PP, Ng KP. Identification of local clinical *Candida* isolates using CHROMagar™ *Candida* as a primary identification method for various *Candida* species. Trop Biomed. 2011;28:269-74.

31. Vecchione A, Florio W, Celandroni F, Barnini S, Lupetti A, Ghelardi E. Comparative evaluation of six chromogenic media for presumptive yeast identification. J Clin Pathol. 2017;70:1074-8. https://doi.org/10.1136/jclinpath-2017-204396

32. Sullivan D, Coleman D. *Candida dubliniensis:* characteristics and identification. J Clin Microbiol. 1998;36:329-34. https://doi.org/10.1128/JCM.36.2.329-334.1998

33. Yazdanpanah A, Khaithir TMN. Issues in identifying germ tube positive yeasts by conventional methods. J Clin Lab Anal. 2014;28:1-9. https://doi.org/10.1002/jcla.21635

34. Linares S, Solís F. Identificación de levaduras. En: Pemán J, Martín-Mazuelo E, Rubio MC. Guía práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica. Segunda edición. Madrid: Bilbao; 2007. p.1-20.

35. Feo M, De Pacheco A. *Candida albicans*: la leche en la producción de clamidosporas. Am Microbiol. 1976;18:23-4.

36. Casal M, Linares MJ. Comparations of six media for production of chlamidospore by *Candida albicans*. Mycopathologia. 1981;76:125-8.

37. Reyes KJ, Araiza J, Bonifaz A. Formación de clamidoconidios de *Candida albicans* y *C. dubliniensis* en diferentes medios líquidos y condiciones de incubación. Scientia Fungorum. 2007;25:27-31.

38. Silveira-Gomes F, Sarmento DN, Espírito-Santo EPTD, Souza NDO, Pinto TM, Marques-da-Silva SH. Differentiation between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* using hypertonic Sabouraud broth and tobacco agar. Rev Soc Bras Med Trop. 2011;44:457-60. https://doi.org/10.1590/s0037-86822011000400011

39. Sardi JC, Duque C, Höfling JF, Gonçalves RB. Genetic and phenotypic evaluation of *Candida albicans* strains isolated from subgingival biofilm of diabetic patients with chronic periodontitis. Sabouraudia. 2012;50:467-75. https://doi.org/10.3109/13693786.2011.633233

40. Luo G, Samaranayake LP, Yau JY. *Candida* species exhibit differential *in vitro* hemolytic activities. J Clin Microbiol. 2001;39:2971-4. https://doi.org/10.1128/JCM.39.8.2971-2974.2001

41. Nouraei H, Pakshir K, ZareShahrabadi Z, Zomorodian K. High detection of virulence factors by *Candida* species isolated from bloodstream of patients with candidemia. Microb Pathog. 2020;149:104574 https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104574

42. Wan L, Luo G, Lu H, Xuan D, Cao H, Zhang J. Changes in the hemolytic activity of *Candida* species by common electrolytes. BMC Microbiol. 2015;15:1-7. https://doi.org/10.1186/s12866-015-0504-7

43. El-Baz AM, Mosbah RA, Goda RM, Mansour B, Sultana T, Dahms TE, ElGaniny AM. Back to nature: Combating *Candida albicans* biofilm, phospholipase and hemolysin using plant essential oils. Antibiotics (Basel). 2021;10:81-98. https://doi.org/10.3390/antibiotics10010081

44. Noori M, Dakhili M, Sepahvand A, Davari N. Evaluation of esterase and hemolysin activities of different *Candida* species isolated from vulvovaginitis cases in Lorestan Province, Iran. Curr Med Mycol. 2017;3:1-5. https://doi.org/10.29252/cmm.3.4.1

45. Maheronnaghsh M, Fatahinia M, Dehghan P, Mahmoudabadi AZ, Kheirkhah M. Comparison of virulence factors of different *candida* species isolated from the oral cavity of cancer patients and normal individuals. Jundishapur J Microbiol. 2019;12: e91556. https://doi.org/10.5812/jjm.91556

46. Manns JM, Mosser DM, Buckley HR. Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. Infect Immun. 1994;62:5154-6 https://doi.org/10.1128/iai.62.11.51545156.1994

47. Mohammadi F, Hemmat N, Bajalan Z, Javadi A. Analysis of biofilm-related genes and antifungal susceptibility pattern of vaginal *Candida albicans* and Non-*Candida albicans* species. Biomed Res Int. 2021:5598907. https://doi.org/10.1155/2021/5598907

48. Kokare CR, Chakraborty S, Khopade AN, Mahadik KR. Biofilm: Importance and applications. Indian J Biotechnol. 2009;8:159-68.

49. Ganguly S, Mitchell AP. Mucosal biofilms of *Candida albicans*. Curr Opin Microbiol. 2011;14:380-5 https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.06.001

50. Sherry L, Ramage G, Kean R, Borman A, Johnson EM, Richardson MD, *et al.* Biofilm-forming capability of highly virulent, multidrug-resistant *Candida auris*. Emerg Infect Dis. 2017;23:328-31 https://doi.org/10.3201/eid2302.161320

51. Ramage G, Vande Walle K, Wickes BL, López-Ribot JL. Standardized method for *in vitro* antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45:2475-9. https://doi.org/10.1128/AAC.45.9.2475-2479.2001

52. Rodríguez-Cerdeira C, Gregorio MC, Molares-Vila A, López-Barcenas A, Fabbrocini G, Bardhi B, *et al.* Biofilms and vulvovaginal candidiasis. Colloids Surf B Biointerfaces. 2019;174:110-25. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.11.011

53. Noumi E, Snoussi M, Noumi I, Saghrouni F, Aouni M, Valentín E. Phenotypic characterization and adhesive properties of vaginal *Candida* spp. strains provided by the CHU Farhat Hached (Sousse, Tunisia). Rev Iberoam Micol. 2012;32:170-9. https://doi.org/10.1016/j.riam.2014.06.006

54. Seifi Z, Mahmoudabadi AZ, Zarrin M. Extracellular enzymes and susceptibility to fluconazole in *Candida* strains isolated from patients with vaginitis and healthy individuals. Jundishapur J Microbiol. 2015;8:e20162. https://doi.org/10.5812/jjm.20162

55. Yigit N, Aktas E, Dagistan S, Ayyildiz A. Investigating biofilm production, coagulase and hemolytic activity in *Candida* species isolated from denture stomatitis patients. Eurasian J Med. 2011;43:27-32. https://doi.org/10.5152/eajm.2011.06

56. Hazirolan G, Altun HU, Gumral R, Gursoy NC, Otlu B, Sancak B. Prevalence of *Candida africana* and *Candida dubliniensis*, in vulvovaginal candidiasis: first Turkish *Candida africana* isolates from vulvovaginal candidiasis. J Mycol Med.2017;27:376-81. https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2017.04.106

Biomédica 2023;43(Supl.1):206-15
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.6872

Original article

Meningeal cryptococcosis and SARS-CoV-2 infection in people living with HIV/AIDS

Fernando Antonio Messina[1], Andrés Benchetrit[2], Andrea Bocassi[3], María de las Mercedes Romero[1], Sofía Bauer[4], Emmanuel Marín[1], Facundo Bertera[5], Guillermo Onis[6], Matías Enzenhofer[4], Milagro Sánchez[4], Lilia Mammana[7], Dana Mijalovsky[4], Gabriela Santiso[1]

[1] Unidad Micología, Hospital de Enfermedades Infecciosas Francisco Javier Muñiz, Buenos Aires, Argentina
[2] Sala 21, Hospital de Enfermedades Infecciosas F. J. Muñiz Hospital, Buenos Aires, Argentina
[3] Laboratorio Central Hospital de Infecciosas, Francisco Javier Muñiz Hospital, Buenos Aires, Argentina
[4] División SIDA, Hospital de infecciosas Francisco Javier Muñiz Hospital, Buenos Aires, Argentina
[5] División Farmacia, Hospital de infecciosas Francisco Javier Muñiz Hospital, Buenos Aires, Argentina
[6] Sala 20, Hospital de Infecciosas Francisco Javier Muñiz Hospital, Buenos Aires, Argentina
[7] Unidad Virología, Hospital de Infecciosas F. J. Muñiz Hospital, Buenos Aires, Argentina

Introduction. Fungal infections in patients with COVID-19 was one of the most debated topics during the pandemic.
Objectives. To analyze the clinical characteristics and evolution of people living with HIV/AIDS and coinfection with cryptococcus and COVID-19 (group A) or without it (group B).
Materials and methods. This is an analytical and retrospective study. We reviewed medical records of patients with meningeal cryptococcosis between April 2020 and May 2021.
Results. We studied 65 people living with HIV/AIDS and with cryptococcosis infection diagnosed from April 2020 to May 2021. Fifteen patients with HIV/AIDS suffered from cryptococcosis and COVID-19, and out of these, 14 presented meningitis (group A), while 28 suffered from meningeal cryptococcosis, but did not have COVID-19 (group B).
Conclusions. No statistically significant differences were observed between the two groups (A and B) considering: intracranial hypertension, presence of *Cryptococcus* antigens in cerebrospinal fluid, sensorium deterioration or mortality.
The detection of *Cryptococcus* antigens in serum by lateral flow assay was highly effective to rapidly diagnose cryptococcosis in patients with HIV/AIDS who also developed COVID-19. Patients of both groups consulted for cryptoccocosis sometime after, in comparison with the pre-pandemic cases related to this infection.

Keywords: COVID-19; SARS-Cov-2; *Cryptococcus*; meningitis, cryptococcal; coinfection; HIV infections.

Criptococosis meníngea e infección por SARS-CoV-2 en personas con VIH/SIDA

Introducción. Las infecciones fúngicas en pacientes con COVID-19 fue uno de los temas más debatidos durante la pandemia.
Objetivo. Analizar las características clínicas y la evolución de personas con VIH/SIDA que presentaron la asociación de criptococosis meníngea y COVID-19 (grupo A), y compararlas con aquellas personas con VIH/SIDA que padecieron criptococosis meníngea, pero sin infección de COVID-19 (grupo B).
Materiales y métodos. Se realizó un estudio analítico y retrospectivo en el que se revisaron las historias clínicas de pacientes que padecieron criptococosis meníngea entre abril de 2020 y mayo de 2021.
Resultados. Se estudiaron 65 pacientes con HIV/SIDA y con criptococosis, diagnosticados entre abril de 2020 y mayo de 2021 (63 habían desarrollado sida y 2 eran negativos para VIH). De estos, 15 de los pacientes con sida padecían criptococosis y COVID-19, y 14 presentaban meningitis (grupo A), mientras que 28 pacientes padecieron criptococosis meníngea, pero no tuvieron COVID-19 (grupo B).
Conclusiones. No se observaron diferencias estadísticamente significativas, entre los dos grupos, respecto a la hipertensión intracraneal, la presencia de antígenos de criptoccoco en líquido cefalorraquídeo, el deterioro del sensorio o la mortalidad.
La detección de antígenos de *Cryptococcus* en suero por ensayo de flujo lateral fue efectiva para diagnosticar rápidamente criptococosis en personas con VIH/sida y con infección de COVID-19. Se observó que los pacientes de ambos grupos consultaron tarde por criptococosis en comparación con los casos prepandémicos de esta infección.

Palabras clave: COVID-19; SARS Cov-2; *Cryptococcus*; meningitis criptocócica; coinfección; infecciones por VIH.

Received: 03/02/2023
Accepted: 17/05/2023
Published: 17/05/2023

Citation:
Messina FA, Benchetrit A, Bocassi A, Romero MM, Bauer S, Marín E, *et al.* Meningeal cryptococcosis and SARS-CoV-2 infection in people living with HIV/AIDS. Biomédica. 2023;43(Supl.1):206-15. https://doi.org/10.7705/biomedica.6872

Corresponding author:
Fernando A. Messina, Unidad Micología, Hospital de Enfermedades Infecciosas Francisco Javier Muñiz, Buenos Aires, Argentina.
Tel: +549 11 3145 9010
fmessina35@gmail.com

Author contributions:
Fernando Antonio Messina, Andrés Benchetri, Andrea Bocassi, Sofía Bauer, Matías Enzenhofer, Guillermo Onis, Milagro Sánchez, Dana Mijalovsky: clinical data collection, analysis and interpretation.
María de las Mercedes Romero y Gabriela Santiso: mycological data collection, analysis and interpretation.
Facundo Bertera: methodological framework review.
Emmanuel Marín: statistical analysis.
Lilia Mammana: virological data collection, analysis and interpretation.
Fernando Antonio Messina y Gabriela Santiso: manuscript writing.
All authors contributed to reviewing the manuscript.

Funding:
This research received no external funding.

Conflicts of interest:
The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and the writing of the paper.

In December 2019, a new coronavirus, unknown until then and named SARS-CoV-2 was identified for the first time in Wuhan, China. Later, this virus caused an epidemic of an atypical pneumonia called Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) (1,2). Due to its expansion speed and severity, on March 11, 2020, the World Health Organization (WHO) declared the pandemic (3).

The start of the pandemic raised the question about the evolution of SARS-CoV-2 infection in people living with HIV/AIDS, mainly those cases without antiretroviral treatment and low count of CD4+ lymphocytes. In this regard, these patients were initially considered at risk of suffering from severe clinical forms (4,5). With the course of the pandemic, different results on this subject were largely contradictory (6).

The association between fungal infections and COVID-19 has been the subject of multiple publications, especially for cases of aspergillosis, candidiasis, and mucormycosis (7-9). However, although the association between COVID-19 and cryptococcosis was reported in HIV-negative patients treated with immunomodulators (10) and in patients with autoimmune diseases (11), the number of cryptococcosis infections in people living with HIV/AIDS was low and, in general, they were excluded of the most recent reviews (12).

On the other hand, meningeal cryptococcosis in patients with HIV/AIDS is still one of the most frequent and serious opportunistic diseases in South America (13,14) as well as in the rest of the world (15).

The aim of this study was to compare the clinical characteristics and evolution of people living with HIV/AIDS and meningeal cryptococcosis in the presence (group A) or absence (group B) of COVID-19 infection.

Materials and methods

This is an analytical and retrospective study. We reviewed the medical records of 65 patients with HIV/AIDS and cryptococcosis infection diagnosed between April 2020 and May 2021 in the Mycology Unit of our hospital.

Inclusion criteria:

- People living with HIV/AIDS with meningeal cryptococcosis.

Exclusion criteria:

- HIV-negative patients with cryptococcosis.
- People living with HIV/AIDS with extra-meningeal cryptococcosis.

We recorded data on age, sex, signs and symptoms, comorbidities, antiretroviral treatment, a physicochemical study of cerebrospinal fluid, opening pressure, antigenic score, lymphocyte populations count, and risk factors for HIV infection.

The HIV-positive patients who met the inclusion criteria were divided into two groups. Group A included the patients who suffered from COVID-19, and group B, the patients who did not (figure 1).

Mycological evaluation

Blood culture by lysis centrifugation was performed with samples from every patient with HIV/AIDS. The samples were cultured in Sabouraud-honey agar medium at 28°C and brain-heart infusion agar at 37°C for three weeks. Cultures were checked twice a week (16,17). In addition, *Cryptococcus*

antigen detection in serum was performed by lateral flow assay (IMMY, Norman Kew Surrey, OK, USA) in patients with a CD4+ lymphocyte count down to 200 cells/µl (18-20).

For mycological examination, we took respiratory samples –sputum or bronchoalveolar lavage– from patients with respiratory symptoms or compatible images with pulmonary cryptococcosis. Likewise, we took a cerebrospinal fluid sample from patients with initial suspicion of central nervous system involvement.

All patients with a positive result for *Cryptococcus* antigen detection, cryptococcemia or pulmonary cryptococcosis underwent lumbar puncture to rule out or confirm meningeal involvement through mycological examination of cerebrospinal fluid.

All cerebrospinal fluid samples were microscopically tested with Indian ink and cultured on Sabouraud-honey agar, sunflower seed agar, and brain-heart infusion agar. Cultures were incubated at 28°C and 37°C for 15 days and were observed daily, seeking for colonies compatible with *Cryptococcus* spp.

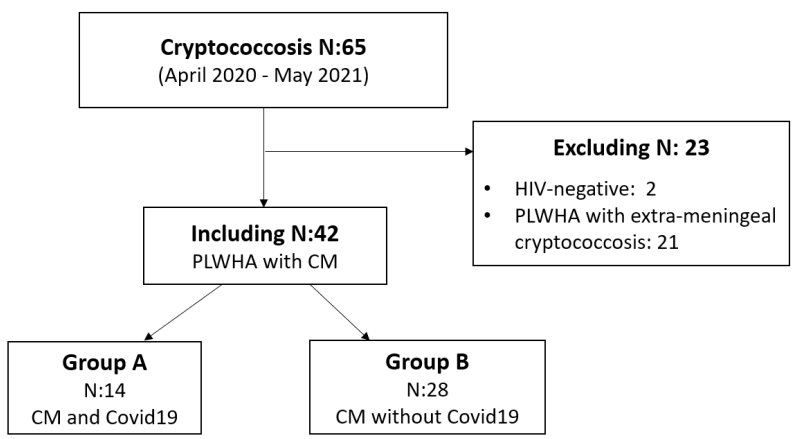
Mycological control of patients with meningitis was performed with cerebrospinal fluid cultures at 2-3 weeks after the diagnosis and was repeated until a negative result was obtained.

Identification tests

The phenotyping of the isolates was carried out by studying their growth capacity at 37°C, the presence of capsule, urease activity and phenol-oxidase production in sunflower seeds agar. Differentiation between *Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii* was performed by their growth in canavanine-glycine-bromothymol blue and Salkin's medium (cycloheximideglycine-phenol red) respectively (16). Typification was confirmed by mass spectrometry (Vitek® MS). Strains were also genotypically studied by the amplification of the *URA5* gene by PCR and subsequent restriction fragment length polymorphisms with the enzymes Sau96I and HhaI.

Semi-quantitative detection of Cryptococcus capsular polysaccharide antigen

Blood samples were taken from all patients at the time of diagnosis. Serum was separated and kept at -20°C until the time of determination.



PLWHA: people living with HIV/AIDS; CM: meningeal cryptococcosis

Figure 1. Flow chart with all the cryptococcosis patients (April 2020 – May 2021)

The semiquantitative determination of *Cryptococcus* capsular polysaccharide antigen in both serum and cerebrospinal fluid was carried out using the latex agglutination technique (Crypto Latex ®, IMMY, Norman Kew Surrey, OK, USA) according to the manufacturer's instructions. Undiluted serum and 1:10; 1:100; 1:1000; 1:5,000 and 1:10,000 dilutions were used to determine the titer.

Coinfection of Cryptococcosis meningitis and COVID-19

COVID-19 coinfection was confirmed in patients who presented a positive qRT-PCR for SARS-CoV-2 from a nasopharyngeal swab within 30 days of meningeal cryptococcosis having been diagnosed. We also included patients who persisted with development of *Cryptococcus,* from cerebrospinal fluid, in culture and COVID-19 diagnosed by qRT-PCR (positive for SARS-CoV2).

Laboratory parameters

Erythrocyte sedimentation rate was evaluated on the device VES Matic Cube 300 (Diesse); D-dimer was determined by an enzyme-linked fluorescence assay using a VIDAS autoanalyzer; C-reactive protein, ferritin, and lactic dehydrogenase enzyme were analyzed on the Cobas C311 analytical platform by immunoturbidimetry and UV kinetic method for lactic dehydrogenase enzyme.

The leukocyte count was performed in the Sysmex XN-1000 hematology counter (optical/fluorescence impedance method). This can be used as an immune response severity index. The number of neutrophils, lymphocytes and the ratio between the two of them are markers of systemic inflammation.

Severity criteria in meningeal cryptococcosis

In both groups we evaluated as severity criteria the following: intracranial hypertension, *Cryptococcus* antigen in cerebrospinal fluid greater than or equal to 1/5000, impaired sensorium and CD4+ lymphocyte count lower than 100 cells/mm^3.

Statistical analysis

Continuous variables were expressed as mean or median. Depending on the data distribution, we applied Student's ttest or the Mann-Whitney-Wilcoxon to evaluate the statistical differences between groups A and B. Categorical variables were expressed as percentages and Fisher's exact test was calculated. Differences were considered statistically significant when the pvalue was inferior to 0.05. We used Statistix® 8.0 software for analysis.

Ethical considerations

We conducted this study according to the protocol and good clinical practice standards established by the research ethics committee of the Hospital Francisco Javier Muñiz.

Results

A total of 15 patients with HIV/AIDS suffered from cryptococcosis and COVID-19. Fourteen had meningitis, and only one had positive antigenemia, found by lateral flow assay, with no other findings. Regarding gender, nine patients were men and six were women. The median age was 26.5 (range: 23-60).

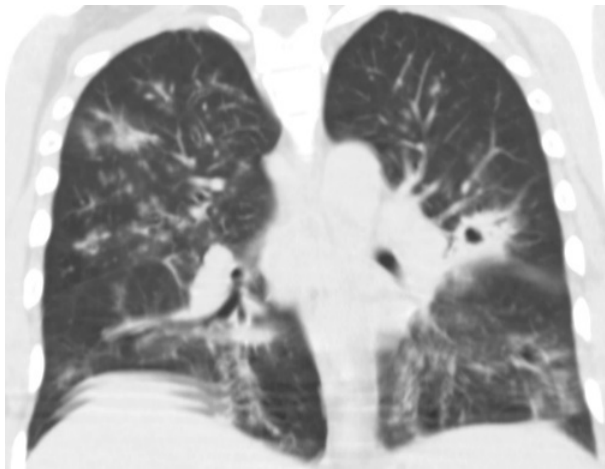


Figure 2. Chest computed tomography, without contrast enhancement, with ground glass lesions (compatible with COVID-19) and a cavitating nodule (compatible with pulmonary cryptococcosis).

None of the patients showed good adherence to antiretroviral therapy. Two of them were aware of their immunocompromised state at the time of hospitalization, and the remaining 12 were aware of their disease but were not under antiretroviral therapy.

Four patients presented pulmonary compromise compatible with COVID19 (figure 2). Out of these, three required mechanical ventilation and died. The brain tomography for the 14 patients with HIV/AIDS and meningitis showed no signs of lesions in the parenchyma. Also, none of them presented comorbidities related to severe COVID-19 (obesity, hypertension, heart failure, or diabetes). However, 13 of them had less than 100 CD4+ lymphocytes/µl.

Four patients had positive blood cultures for *Cryptococcus neoformans.* However, the pulmonary commitment by this microorganism was not confirmed in any patient, although we observed findings congruent with cryptococcosis in computed tomographies from three of them.

The three patients who died had positive cultures for *C. neoformans,* from cerebrospinal fluid samples*,* at the time of death. Nevertheless, it was impossible to establish whether they died from COVID-19 and/or cryptococcosis.

All isolates corresponded to the variety of *C. neoformans* VNI, according to phenotypic and genotypic identification.

Increased lactate dehydrogenase, dimer D and lymphopenia were the most frequent laboratory parameters in patients with COVID-19 and cryptococcosis (table 1). In patients without COVID-19, the lymphocyte count was not registered. Clinical and microbiological parameters related to severe meningeal cryptococcosis were similar in both groups. More patients with dyspnea were observed in the group with COVID-19 and cryptococcosis (group A) (table 2), probably because the lung is the main organ involved in patients with COVID-19, but this finding did not impact in the mortality rate of both groups.

The main signs and symptoms of patients with meningeal cryptococcosis and COVID-19 in both groups are shown in table 2.

Table 1. Laboratory parameters considered for severe COVID-19 and prevalence found in group A

Group A	n=14
Neutropenia	1/14
Lymphopenia	12/14
NLR≥5.9	7/14
LDH>280 U/L	11/14
LDH>600 U/L	2/14
Ferritin>400 ng/ml	5/8
D-dimer>500 ng/ml	8/9
C-reactive protein>5 mg/L	4/5
ERS>25 mm/h	10/12

NLR: Neutrophil to lymphocyte ratio; LDH: Lactic dehydrogenase; ERS: Erythrocyte sedimentation rate

Table 2. Clinical and microbiological characteristics of the patients with meningeal cryptococcosis (group A, patients with COVID-19, and group B, patients without COVID-19)

	Group A n=14	Group B n=28	P value
Fever	13	24	0.2775
Headache	12	24	0.6471
Vomiting	11	17	0.1595
Dyspnea	7	2	0.0009*
Sensory impairment	5	8	0.54
Cough	3	2	0.1507
Elevated intracranial pressure	10	18	0.4629
CSF CrAg - LA ≥1/5000	8	17	0.9763
CD4+ < 100 cells/mm3	13	25	0.3912
Deceased	3	6	0.9129

CSF: cerebrospinal fluid; CrAg: cryptococcal capsular polysaccharide antigen; LA: latex agglutination test

* p<0.05

Discussion

SARS-CoV-2 infection can cause asymptomatic clinical pictures as well as highly variable presentations. From myalgia, arthralgia, and anosmia to severe bilateral pneumonia (21). As it occurs in cryptococcosis, fever and headache were the most frequently observed symptoms in patients with HIV/AIDS with COVID-19 (9). For this reason, in the pandemic context, many patients attributed this symptomatology to COVID-19, but could have overlooked a possible fungal infection.

For some years, *Cryptococcus antigen* detection, by lateral flow assay, has been routinely performed in patients with a CD4+ lymphocyte count less than or equal to 200 cells/µl, before starting antiretroviral treatment to prevent immune reconstitution syndrome (20). In the same way, it has been used in patients with a low CD4+ lymphocyte count when admitted with suspected opportunistic infection (13,15,18). This test provides a rapid diagnosis and the possibility to detect meningitis that otherwise, due to its scarce symptomatology focused on the central nervous system, would have a later detection. Figure 3 shows that most patients had a diagnosis of *Cryptococcus* meningitis close to the time when the nasopharyngeal admission swab was performed. Only few cases of COVID-19 infection occurred during hospitalization (figure 3). One patient was diagnosed with meningeal cryptococcosis after three weeks, because he was referred from a less complex center that did not have the *Cryptococcus* antigen detection test available.

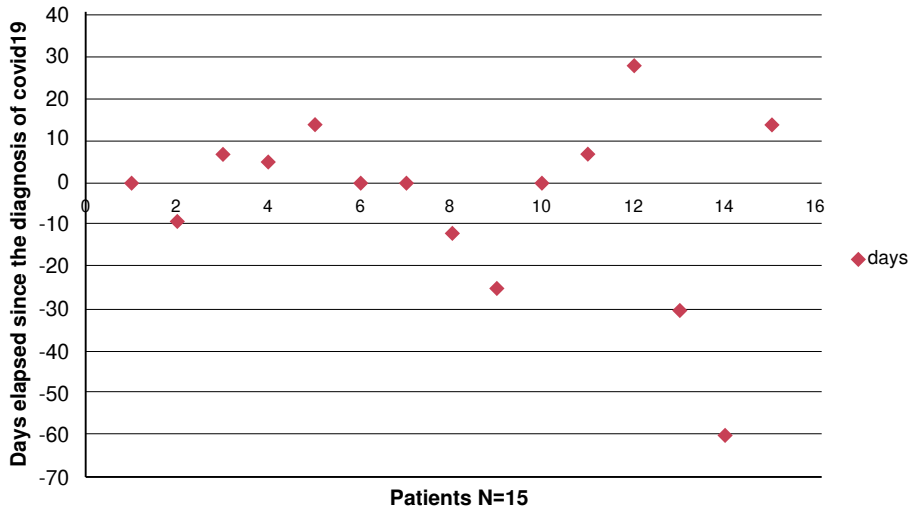


Figure 3. Relationship between the diagnostic time of cryptococcosis and COVID-19

Other cases undergoing meningeal symptoms and positive culture from cerebrospinal fluid, presented coinfection due to a nosocomial outbreak of COVID-19.

We detected an increase in the percentage of heavily treatmentexperienced patients (28/42 - 66 %) and presence of *Cryptococcus* antigens in cerebrospinal fluid greater or equal to 1/5000 (25/42 - 59.5 %), in both groups, compared with pre-pandemic data (heavily treatmentexperienced patients: 22/62 - 35.5 %; presence of *Cryptococcus* antigens ≥ 5000: 23/127 18.1 %) (22). This could be due to late consultation. However, considering the pre-pandemic meningeal cryptococcosis mortality (20.31 %) and the one observed during the pandemic (21.4 %), no significant differences were found (22).

Numerous authors support that the hyperinflammatory immune response induced by the SARS-CoV-2 virus plays a central role in the pathogenesis of the disease. In this work, we analyze the prognostic value of certain laboratory biomarkers in hospitalized patients with COVID-19. The recommendations suggest evaluating inflammatory markers such as: leukocyte differential count, erythrocyte sedimentation rate, D-dimer, ferritin, C-reactive protein, interleukin6, lactate dehydrogenase, procalcitonin, troponins and natriuretic peptides (23).

Most severe cases of COVID-19 presented a low absolute count of lymphocytes (lymphopenia <1000/mm^3), increased leukocytes, a high absolute count of neutrophils, and increased neutrophil-to-lymphocyte ratio. It is important to mention that in this retrospective study interleukin6, procalcitonin, and cardiac biomarkers (troponins and natriuretic peptides) were not analyzed.

On the other hand, lymphopenia in patients with COVID-19 was associated with poor prognosis in different publications (24).

Throughout the pandemic, cut-off values for neutrophil-to-lymphocyte ratio between 3.0 and 6.0 have been reported. However, Sayah *et al.* have proposed neutrophil-to-lymphocyte ratio values greater than o equal to 5.9 to assess severity; and greater than or equal to 7.4 for mortality (25).

We observed lymphopenia in most patients but did not seem decisive in the outcome, probably because the number of patients studied was too small to reach conclusions. Furthermore, we clarify that we could not obtain the lymphocyte counts in patients with meningeal cryptococcosis but without COVID19 infection, a deficiency of this publication.

A recent meta-analysis of patients with COVID-19 shows a similar evolution of people living with HIV/AIDS with antiretroviral treatment compared with those living with HIV/AIDS but without antiretroviral therapy (9). In this study, despite their degree of immunocompromise, the evolution of patients living with HIV/AIDS was not worse than that of HIV-negative patients. However, the evidence regarding the relationship between people with HIV/AIDS and the increased risk of contracting or presenting severe forms of COVID-19 is still controversial. A recent study reported that those cases of COVID-19 with unfavorable evolution were related to comorbidities related to HIV.

A recent review on COVID-19 and cryptococcosis suggests that corticosteroid treatments may be a risk factor for developing this fungal disease. Unlike our cases, most patients in the mentioned review were negative-HIV patients with cardiovascular and metabolic comorbidities, suffering from pulmonary cryptococcosis (26).

The study of large prospective cohorts is necessary to differentiate the cryptococcosis impacts in HIVpositive and HIV-negative patients and thus develop some definitive recommendations.

Considering that predominant symptoms of cryptococcosis and COVID19 may overlap, the detection of *Cryptococcus* antigen by lateral flow assay from serum was relevant for a rapid diagnose in our patients.

The pandemic postponed consultation of most patients living with HIV/AIDS. Despite this, mortality in this period was similar to the one observed pre-pandemic.

No differences were observed between the mortality rate of patients with meningeal cryptococcosis and COVID-19 (group A) or without coinfection with COVID-19 (group B).

References

1. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, *et al*. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. N Engl J Med. 2020;382:727-33. https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017
2. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, *et al*. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. Lancet. 2020;395:497-506. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5
3. Cucinotta D, Vanelli M. WHO declares COVID-19 a pandemic. Acta Biomed. 2020;91:157-60. https://doi.org/10.23750 /abm.v91i1.9397
4. Zhang H, Wu T. CD4+T, CD8+T counts and severe COVID-19: A meta-analysis. J Infect. 2020;81:e82-e4. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.06.036
5. Ho HE, Peluso MJ, Margus C, Matias Lopes JP, He C, Gaisa MM, *et al*. Clinical outcomes and immunologic characteristics of coronavirus disease 2019 in people with human immunodeficiency virus. J Infect Dis. 2021;223:4038. https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa380
6. Lee KW, Yap SF, Ngeow YF, Lye MS. COVID-19 in people living with HIV: A systematic review and meta-analysis. Int J Environ Res Public Health. 2021;18:3554. https://doi.org/10.3390/ijerph18073554

7. Pal R, Singh B, Bhadada SK, Banerjee M, Bhogal RS, Hage N, *et al.* COVID-19-associated mucormycosis: An updated systematic review of literature. Mycoses. 2021;64:1452-9. https://doi.org/10.1111/myc.13338
8. Kariyawasam RM, Dingle TC, Kula BE, Vandermeer B, Sligl WI, Schwartz IS. Defining COVID-19-associated pulmonary aspergillosis: Systematic review and meta-analysis. Clin Microbiol Infect. 2022;28:920-7. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2022.01.027
9. Messina F, Marin E, Valerga M, Depardo R, Chediak V, Romero M *et al.* Updates on AIDS and infectology. Actualizaciones en Sida e Infectología. 2021;29:6-16. https://doi.org/10.52226/revista.v29i105.49
10. Khatib MY, Ahmed AA, Shaat SB, Mohamed AS, Nashwan AJ. Cryptococcemia in a patient with COVID-19: A case report. Clin Case Rep. 2020;9:853-5. https://doi.org/10.1002/ccr3.3668
11. Woldie IL, Brown IG, Nwadiaro NF, Patel A, Jarrar M, Quint E, *et al.* Autoimmune hemolytic anemia in a 24-year-old patient with COVID-19 complicated by secondary cryptococcemia and acute necrotizing encephalitis: A case report and review of literature. J Med Cases. 2020;11:362-5. https://doi.org/10.14740/jmc3575
12. Frías-De-León MG, Pinto-Almazán R, Hernández-Castro R, GarcíaSalazar E, Meza-Meneses P, Rodríguez-Cerdeira C, *et al.* Epidemiology of systemic mycoses in the COVID-19 pandemic. J Fungi (Basel). 2021;7:556. https://doi.org/10.3390/jof7070556
13. Arechavala A, Negroni R, Messina F, Romero M, Marín E, Depardo R, *et al.* Cryptococcosis in an infectious diseases hospital of Buenos Aires, Argentina. Revision of 2041 cases: Diagnosis, clinical features and therapeutics. Rev Iberoam Micol. 2018;35:1-10. https://doi.org/10.1016/j.riam.2017.04.003
14. Firacative C, Meyer W, Castañeda E. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gatti* species complexes in Latin America: A map of molecular types, genotypic diversity, and antifungal susceptibility as reported by the Latin American Cryptococcal Study Group. J Fungi (Basel). 2021;7:282. https://doi.org/10.3390/jof7040282
15. Rajasingham R, Govender NP, Jordan A, Loyse A, Shroufi A, Denning DW, *et al.* The global burden of HIV-associated cryptococcal infection in adults in 2020: a modelling analysis. Lancet Infect Dis. 2022;22:1748-55. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00499-6
16. Guelfand L, Cataldi S, Arechavala A, Perrone M. Manual práctico de micología médica. Acta Bioquim Clin Latinoam. 2015; Supl. 1.
17. Arechavala AI, Robles AM, Negroni R, Bianchi MH, Taborda A. Value of direct and indirect diagnostic methods in systemic mycoses associated with AIDS. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1993;35:163-9. https://doi.org/10.1590/s0036-46651993000200008
18. Huang HR, Fan LC, Rajbanshi B, Xu JF. Evaluation of a new cryptococcal antigen lateral flow immunoassay in serum, cerebrospinal fluid and urine for the diagnosis of cryptococcosis: A meta-analysis and systematic review. PLoS One. 2015;10:e0127117. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127117
19. IMMY. Immy CrAg lateral flow assay REF CR2003. Fecha de consulta: 05 de agosto del 2020. Disponible en: www.immy.com
20. Centers for Disease Control and Prevention. Cryptococcal screening a new strategy for saving lives among people with HIV/AIDS 11-10-2021. Fecha de consulta: 12 de octubre del 2020: Disponible en: https://www.cdc.gov/fungal/pdf/crypto-screen-strategy-508c.pdf
21. Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. Nat Rev Microbiol. 2021;19:141-54. https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7. Erratum in: Nat Rev Microbiol. 2022 May;20:315.
22. Messina FA, Maiolo E, Negroni R, Arechavala A, Santiso G, Bianchi M. Alternativas terapéuticas de la criptococosis meníngea. ASEI. 2015;23:2532.
23. Liu J, Li H, Luo M, Liu J, Wu L, Lin X, *et al.* Lymphopenia predicted illness severity and recovery in patients with COVID-19: A single-center, retrospective study. PLoS One. 2020;15:e0241659. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241659
24. Toori KU, Qureshi MA, Chaudhry A. Lymphopenia: A useful predictor of COVID-19 disease severity and mortality. Pak J Med Sci. 2021;37:1984-8. https://doi.org/10.12669/pjms.37.7.4085

25. Sayah W, Berkane I, Guermache I, Sabri M, Lakhal FZ, Yasmine Rahali S, *et al.* Interleukin-6, procalcitonin and neutrophil-to-lymphocyte ratio: Potential immune-inflammatory parameters to identify severe and fatal forms of COVID-19. Cytokine. 2021;141:155428. https://doi.org/10.1016/j.cyto.2021.155428

26. Regalla D, VanNatta M, Alam M, Malek AE. COVID-19-associated *Cryptococcus* infection (CACI): a review of literature and clinical pearls Infection. 2022;50:1-6. https://doi.org/10.1007/s15010-022-01805-y

Biomédica 2023;43(Supl.1):216-28
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.6898

Original article

Phenotypic and genotypic characterization of Colombian clinical isolates of *Sporothrix* spp.

Laura C. Álvarez-Acevedo[1,2], María C. Zuleta-González[1], Óscar M. Gómez-Guzmán[2,3], Álvaro L. Rúa-Giraldo[1,4], Orville Hernández-Ruiz[3,4], Juan G. McEwen-Ochoa[1,3], Martha E. Urán-Jiménez[1], Myrtha Arango-Arteaga[1†], Rosely M. Zancopé-Oliveira[5], Manoel Marques Evangelista de Oliveira[5], María del P. Jiménez-Alzate[1]

[1] Grupo de Micología Médica, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia
[2] Posgrado de Biología, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia
[3] Grupo de Biología Celular y Molecular, Corporación para Investigaciones Biológicas, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia
[4] Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia
[5] Laboratorio de Micología, Instituto Nacional de Infectología Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Introduction. For over a century, *Sporothrix schenckii* was considered the sole species responsible for sporotrichosis. In 2007, scientific community confirmed the disease could be caused by various *Sporothrix* species. These species differed in their virulence factors and their antifungal sensitivity.
Objective. This study aims to characterize 42 Colombian clinical isolates of *Sporothrix* spp. phenotypically and genotypically.
Material and methods. Forty-two clinical isolates were characterized using phenotypic methods. It involved various culture media to determine their growth range at different temperatures and to assess the type and distribution of pigment and colony texture. Microscopic morphology was evaluated through microcultures, as well as the conidia diameter, type of sporulation, and morphology. Additionally, the assimilation of carbohydrates was selected as a physiological trait for species identification. Genotyping of 40 isolates was performed through partial amplification of the calmodulin gene, followed by sequence analysis.
Results. Molecular studies enabled the identification of 32 isolates of *S. schenckii* and 8 isolates of *S. globosa*. The combination of phenotypic and genotypic methods eased these species characterizations and the recognition keys development based on parameters such as growth diameter at 25 and 30 ºC, colony texture (membranous or velvety) on potato dextrose agar, and microscopic morphology with predominance of pigmented triangular, elongated oval globose, or subglobose conidia.
Conclusions. Confirmation of the phenotypic characteristics and molecular analysis is crucial for identifying *Sporothrix* species and determining adequate treatment. This study represents the first phenotypical and genotypical characterization of clinical isolates of *Sporothrix* spp. reported in Colombia.

Key words: *Sporothrix*; sporotrichosis; phenotype; genotype.

Caracterización fenotípica y genotípica de aislamientos clínicos colombianos de *Sporothrix* spp.

Introducción. Por más de un siglo se creyó que *Sporothrix schenckii* era la única especie responsable de la esporotricosis. Sin embargo, en el 2007, se consideró que podría ser causada por diferentes especies de *Sporothrix*, que difieren en sus factores de virulencia y su sensibilidad a los antifúngicos.
Objetivo. Caracterizar fenotípica y genotípicamente 42 aislamientos clínicos colombianos de *Sporothrix* spp.
Materiales y métodos. Se caracterizaron 42 aislamientos clínicos mediante métodos fenotípicos. Se usaron varios medios de cultivo para determinar el rango de crecimiento a diferentes temperaturas, el tipo y la distribución del pigmento, y la textura de las colonias. Se evaluó la morfología microscópica por microcultivos mediante la determinación del diámetro, el tipo de esporulación y la morfología de las conidias. La asimilación de carbohidratos se usó como una característica fisiológica para identificar las especies. La genotipificación de los 40 aislamientos se llevó a cabo mediante la amplificación parcial del gen que codifica para la calmodulina y se confirmó por secuenciación.
Resultados. Mediante estudios moleculares, se identificaron 32 aislamientos de *S. schenckii* y ocho de *S. globosa*. La combinación de métodos fenotípicos y genotípicos permitió

Received: 24/03/2023
Accepted: 14/06/2023
Published: 14/06/2023

Citation:
Álvarez-Acevedo LC, Zuleta-González MC, Gómez-Guzmán OM, Rúa-Giraldo AL, Hernández-Ruiz O, McEwen-Ochoa JG, *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of Colombian clinical isolates of *Sporothrix* spp. Biomédica. 2023;43(Supl.1):216-28. https://doi.org/10.7705/biomedica.6898

Corresponding author:
María del Pilar Jiménez-Alzate, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Carrera 51 D N°62-29, laboratorio 218, Medellín, Colombia
Teléfono: (604) 219 605 y (313) 647 4333; fax: (604) 219 6051
delpilar.jimenez@udea.edu.co

Author contributions:
Laura C. Álvarez-Acevedo: performance of the experiments, collection and analysis of the results, deposit of the sequences in the Genbank and writing of the manuscript.
María C. Zuleta-González: performance of experiments, culturing, maintenance and preservation of clinical isolates of *Sporothrix* spp.
Óscar M. Gómez-Guzmán: design and performance of the experiments of molecular biology, analysis of results and deposit of the sequences in the GenBank.
Álvaro L. Rúa-Giraldo: design of the experiments of phenotypic and taxonomic evaluation of the clinical isolates of *Sporothrix* spp.
Orville Hernández-Ruiz: molecular biology experiments and analysis of results.
Juan G. McEwen-Ochoa, Martha E. Urán-Jiménez, Myrtha Arango-Arteaga (q.e.p.d.) and María del P. Jiménez- Alzate: design and performance of the experiments. Analysis of the results and reviewing of the manuscript.
Myrtha Arango-Arteaga (q.e.p.d.) and María del P. Jiménez- Alzate: obtaining resources for research.
Rosely M. Zancopé-Oliveira y Manoel Marques Evangelista de Oliveira: molecular biology experiments and analysis of results.

Funding:
This study received support from the *Comité para el Desarrollo de la Investigación* (CODI) of the *Universidad de Antioquia*, project code 2014-922.

Conflicts of interest:
None declared.

caracterizar las especies y construir claves para su reconocimiento, con base en parámetros como el diámetro de crecimiento a 25 y 30 ºC, la textura de las colonias (membranosa, aterciopelada) en agar papa dextrosa y la morfología microscópica con predominio de conidias (triangulares pigmentadas, ovales globosas elongadas, subglobosas).
Conclusiones. La caracterización fenotípica y los análisis moleculares son necesarios para identificar las especies de *Sporothrix* y, de esta forma, elegir el tratamiento indicado. Esta es la primera caracterización fenotípica y genotípica reportada de aislamientos clínicos colombianos de *Sporothrix* spp.

Palabras clave: *Sporothrix* spp.; esporotricosis; fenotipo; genotipo.

Sporotrichosis is a subcutaneous granulomatous mycosis with a subacute or chronic evolution course that afflicts humans and mammals worldwide and produces different clinical manifestations. The disorder is produced by dimorphic fungi included in the clinical clade of *Sporothrix* spp. (1).

In Latin America, sporotrichosis is the most prevalent subcutaneous mycosis. It regularly exhibits changes in its epidemiological patterns. Classically, sporotrichosis is acquired by traumatic inoculation of the fungus through contaminated materials, such as plants, thorns, or soil, penetrating the host's subcutaneous tissues. Nonetheless, zoonotic transmission by domestic cats has been observed, thus changing the accepted transmission paradigm of this disease (2).

For over a century, *Sporothrix schenckii* was considered the only species responsible for all cases of sporotrichosis (3,4). However, in 2007, Marimon *et al.* (5) proposed to split *S. schenckii* into several molecular siblings by phylogenetic analysis of the calmodulin gene (exons 3-5). *Sporothrix* is a diverse *genus* with wide genetic and ecological diversity, reflected in the many different associations between organisms and their hosts or niches (6).

Currently, *Sporothrix* comprises 53 species divided into clinical and environmental clades. The clinical clade includes four species causing human and animal infections: *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. globosa*, and *S. luriei*. Most *Sporothrix* species belong to the environmental clade: *S. pallida* complex*, S. stenoceras* complex*, S. candida* complex*, S. inflata* complex*,* and *S. gossypina* complex*;* and feature lower pathogenic potential toward mammals. Environmental *Sporothrix* species are usually associated with decaying wood, plant debris, soil, insects, etc. However, some species of this clade have been reported as the causative agent of sporothricosis cases: *S. pallida complex* (*S. chilensis*, *S. humicola*, *S. mexicana*, *S. pallida*), and *S. stenoceras* complex (6,7).

Identification and differentiation of clinical clades species is important due to the variability of their virulence and geographic distribution. Additionally, their sensitivity to antifungals reveals different levels of resistance. These variations are also noticed in the frequency of the species causing the mycosis.

Sporotrichosis is the most common subcutaneous mycosis in Colombia, with a prevalence rate of 0.1 to 0.5% in one report (8) or eight cases per 100,000 patients in another (9). In Colombia, the epidemiology and microbiology information about the causative agents of sporotrichosis is unknown since the related studies were conducted in big cities, such as Medellin and Cali, and were focused merely on the disease epidemiology and clinical manifestations (10,11). In the Medical Mycology Laboratory at the *Facultad de Medicina* of the *Universidad de Antioquia* (*Medellín*), where we collected the present data, *S. schenckii* was considered the only causative agent of sporotrichosis, but the characteristics of the isolates were

not explored. This prompted us to undertake a detailed phenotypical and genotypical characterization of those clinical isolates.

Materials and methods

Isolates

We characterized 42 isolates previously identified as *Sporothrix* spp. These isolates were preserved according to the following protocol.

Subcultures

The isolates were sub-cultured on Mycosel agar and incubated at room temperature for one month. Once we confirmed the isolates' growth, some colonies were transferred to tubes containing distilled water for short-term storage at room temperature, and others, mineral oil and skim milk medium for -20°C storage, for further studies.

Phenotypic characterization

*Macroscopic morphology***.** The growth range, pigmentation, and colony texture were assessed in 42 isolates. An inoculum of 5 x 10^5 conidia/ml in 10 µl was plated on potato dextrose agar and corn meal agar (CMA) per triplicate. The plates were incubated at 25, 30 and 37 °C. The growth diameter was measured in millimeters, longitudinally and transversely, using a ruler every 7, 14, 21, 28, and 40 days. During the same period, we evaluated qualitatively pigments, morphology, and texture of the grown colonies. All isolates were cultured in dark incubators.

Microscopic morphology. We evaluated the conidia produced by the mycelial form using microcultures. After ten days of incubation at 25 °C, we estimated morphology, diameter, and conidiation type in potato dextrose agar and corn meal agar. Ten photographs were taken for each isolate, with a 100-fold magnification, using a Leica DM 500™ camera adapted to a Leica ICC 50W™ microscope. We employed the SE Micrometrics Premium 4 ACCU-SCOPE software to measure the area and the perimeter of 100 conidia (100 hyaline and 100 dematiaceous or pigmented) per isolate. This information was compiled in an Excel™ database for further statistical analysis.

Transition from mycelial to yeast form. Two enriched culture media induced the yeast morphology in each isolate: Brain-heart infusion (BHI, BBLTM; ref. 211065. Franklin Lakes, NJ, USA) supplemented with 2% glucose (Sigma, ref. G5400-250G) (BHI-I); and supplemented with 0.1% L-cysteine (Sigma, ref. C-7755. St. Louis, MO, USA), 5% sheep blood, and 2% glucosa (BHI-II). These media were incubated at 37°C with 5% CO_2.

The complete transition from mycelium to yeast form was determined by conducting multiple cultures every eight days, until creamy colonies obtention. Confirmation was achieved through microscopic observation of blue lactophenol-stained cotton corresponding to the colonies, revealing oval structures analogous to blastoconidia and hyphae absence.

Carbohydrate assimilation. Carbohydrate assimilation was evaluated in all isolates in the yeast form using API AUX 20 (Biomerieux®, Marcy-l'Etoile-France) after confirmation of the complete transition from mycelium to yeast form, as mentioned. The protocol was modified by adding 200 µl of yeast suspension and reading at 8-10 days after seeding the wells. Turbid wells

were considered positive compared to the negative control, lacking a source of carbohydrates. We evaluated the following carbohydrates: glucose, glycine, α-ketoglutarate, arabinose, xylose, adonitol, xylitol, galactose, inositol, sorbitol, methyl D-glucosidase, N-acetylglucosamine, cellobiose, lactose, maltose, sucrose, trehalose, melezitose and raffinose.

Genotypic characterization

DNA was extracted and purified from the yeast phase of all 40 isolates after three days of growth using the protocol recommended by Norgen Biotek Corporation for fungi/yeast genomic DNA (Thorold, ON, Canada). For the remaining two isolates, DNA was extracted from the mycelial phase using the phenol-chloroform and isoamyl alcohol method. The DNA was quantified using the NanoDrop™ One/OneC Microvolume UV-Vis spectrophotometer. A expected protein ratio (260/280) within the range of 1.8-2.0 was needed to ensure the absence of protein contamination.

Partial amplification of the calmodulin gene (*CALM1*) was performed from genomic DNA using conventional PCR with primers described by O´Donnell *et al*. (12): CL1 (5'-GAR TWC AAG GAG GCC TTC TC-3 ') and CL2A (5' -TTT TTG CAT CAT GAG TTG GAC-3 '). These primers generate an 800 pb amplicon corresponding to exons 3 and 5 of this gene.

Phylogenetic analysis

The products were sent to Macrogen Inc. (Geumcheon-gu, Seoul, South Korea) for sequencing using the ABI 3730XL DNA sequencing technology with the quality criterion of QV20. The obtained sequences were edited using the Geneious, version 11.0.2, software. Partial calmodulin gene sequences from *Sporothrix* spp. isolates, reported in the GenBank, were also included to improve phylogenetic tree support. The IqTree, version 1.4.4, software was used to determine the evolutionary model and the relationships between the isolates. A maximum likelihood-based phylogenetic tree was built using the Kimura two-parameter models and JukesCantor with a 1,000 bootstrap.

Results

Phenotypic characterization

Growth ranges. The isolates' growth was measured every seven days for a 40 day-period. The isolates showed similar growth ranges in the evaluated culture media (potato dextrose agar and corn meal agar). However, their growth differed at the tested temperatures, with colonies growing more at 25 ºC than at 30 ºC (figure 1A and 1B). Growth was not observed in none of the 28 isolates at 37 ºC, regardless of the culture media used (data not shown). Among the 14 isolates that exhibited growth at 37 ºC, the range was between 0.3 and 2.5 mm in potato dextrose agar, and between 0.2 and 1.9 mm in corn meal agar.

Colony textures of Sporothrix spp. clinical isolates

Macroscopic characteristics among the isolates were better defined in potato dextrose agar at 25 ºC, while in the corn meal agar, all had a similar texture, not allowing differentiation among the isolates. Therefore, observations of the colony texture and pigment were made only in potato dextrose agar.

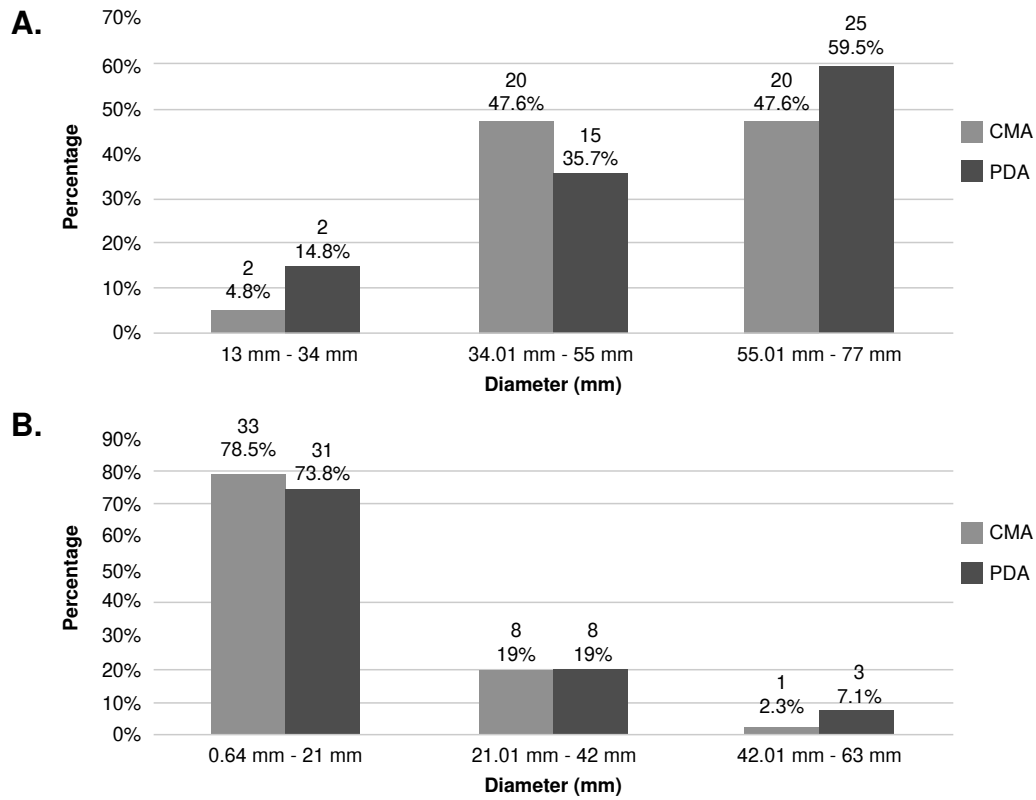


Figure 1. Growth range of growth of *Sporothrix* spp. clinical isolates in their mycelial phase. **A.** Comparison of growth diameter in potato dextrose agar (PDA) and corn meal gar (CMA) at 25 ºC and after 40 days of observation. The number of isolates (n) are located at the top level of the numbers in percentages for each bar. **B.** Comparison of PDA and CMA growth diameter at 30ºC at 40 days of observation. The number of isolates (n) are located at the top of each bar.

The texture of *Sporothrix* spp. clinical isolates exhibited a heterogeneous range of colonies. We found the membranous aspect prevailed among 50% of the isolates (n=21), but this trait was also present in 42,85% of others (n=37), sharing other textures such as velvety, central hairy, and cerebriform-like. A single texture, different from the membranous, was less frequent: central-hairy texture colonies corresponded to 2.38% (n=1) and with velvety texture to 2.38% (n=1). The cerebriform aspect shared textures with those previously described in 11.9% (n=5), but it was not observed as a separate texture. Figure 2-I illustrates previously described textures, and table 1 shows the frequencies of the observed different textures.

Pigments produced by Sporothrix spp. clinical isolates at the mycelial phase

The isolates in their mycelial phase presented various pigment types after 40 days of growth in potato dextrose agar at 25 °C, even within the same isolate. The pigments observed included light types (beige, light brown) and dark types (dark brown, black). The pigments were associated with the size of the colonies: Smaller-sized isolates (22-35 mm) tended to develop dark pigments; medium-size (35.1-58 mm) and biggersize colonies (58.1-76mm) did not show a tendency toward any pigment tone and exhibited pigments ranging from light to dark tonalities.

Distribution of pigment in the mycelial colonies was registered as follows: Homogeneous 33% (n=14), spotted heterogenous 33% (n=14), sectorized

heterogenous 26% (n=11), centralized heterogenous 5% (n=2), and dotted heterogenous 3% (n=1). We also studied pigments tonality and distribution in the mycelial colonies. Light pigments exhibited homogenous distribution in 19% (n=8), while dark had a homogenous distribution in 14.2% (n=6) of the isolates. Spotted heterogenous distribution was observed in 11.9% (n=5) of the isolates, and sectorized heterogenous distribution in 2.3% (n=1) of the total.

In some isolates (n=22) we observed a mixture of light and dark pigments and, among this group, sectorized heterogenous distribution in 23.8% (n=10) and spotted heterogenous distribution in 21.42% (n=9) of the isolates. Lower frequencies were obtained for centralized heterogenous and dotted heterogenous distributions, occurring in 4.76% (n=2) and 2.38% (n=1) of the isolates, respectively. Examples of colony texture are shown in figure 2-II.

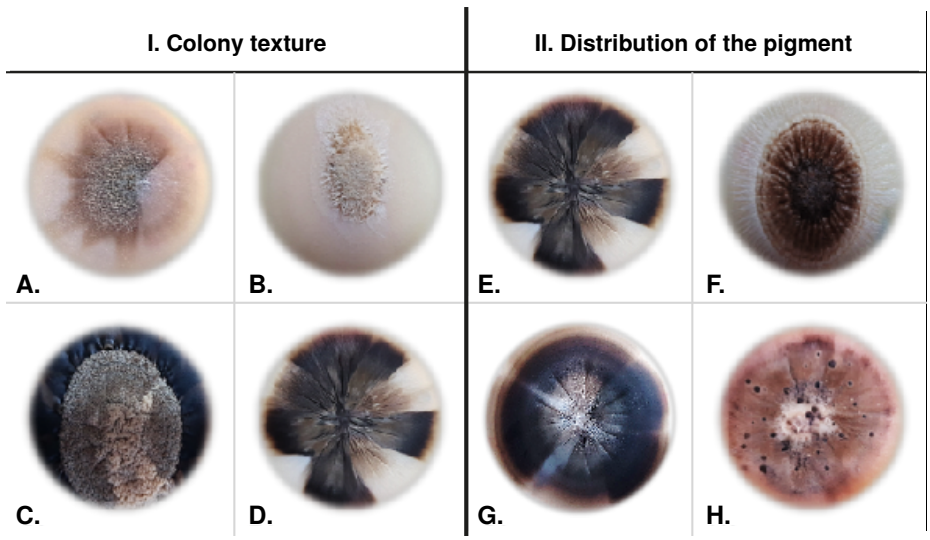


Figure 2. Phenotypic characteristics of *Sporothrix* spp. clinical isolates colonies. I. Texture of the *Sporothrix* spp. clinical isolates colonies after 40 days of observation: Velvety (A), central hairy (B), membranous (C), and cerebriform (D). II. Pigment distribution of the *Sporothrix* spp. clinical isolates colonies after 40 days of observation: Spotted heterogeneous (A), centralized heterogeneous (B), sectorized heterogeneous (C), and dotted heterogeneous (D).

Table 1. Texture of *Sporothrix* spp. isolates colonies in their mycelial phase after 40 days of culture in potato dextrose agar at 25 °C (N=42)

Texture	%	n
Membranous	50	21
Membranous and central hairy	19.05	8
Membranous and velvety	9.52	4
Membranous and cerebriform	2.38	1
Membranous, velvety and cerebriform	2.38	1
Membranous, central hairy and velvety	2.38	1
Membranous, central hairy, cerebriform and velvety	2.38	1
Central hairy	4.76	2
Velvety	2.38	1
Central hairy and velvety	2.38	1

Sporothrix spp. conidia and their microscopic morphology in clinical isolates

The observed hyaline conidia had an average area of 4.1 μm^2 and perimeter of 8.7 μm. The elongated oval shape predominated in this type of hyaline conidia and was present in all isolates (100%). The elongated-oval form was common and identified in 70% of the isolates. The globose and subglobose forms were present in 65% of these conidia (figure 3). Most of the hyaline conidia were organized in a flower shape around a vesicle, a form characteristically described for *Sporothrix* spp. The conidia were produced in a sympodial on denticulate conidiogenous cells.

It was not possible to obtain sporulation in one isolate, so the morphology, as described below, was evaluated only in 41. The dematiaceous or pigmented conidia had an average area of 5.6 μm^2 and a perimeter of 9.6 μm. In these dematiaceous conidia, the globose and subglobose forms predominated in 27 (65%) isolates out of the evaluated 41. Acropleurogenic sporulation was observed in this conidia form. The presence of oval-dematiaceous conidia organized in a flower-like arrangement was identified in 60% (n=25) of the isolates. In 30% (n=13) of the isolates, we found triangular conidia, primarily organized side by side on the hyphae as sessile acropleurogenic conidia (figure 4).

Sporothrix spp. clinical isolates: Patterns of carbohydrate assimilation

The evaluation of carbohydrates assimilation, determined by the API 20 test in the 42 isolates, showed that all isolates were capable of assimilating glucose, glycine, xylose, sorbitol, N-acetylglucosamine, maltose, sucrose and trehalose. However, important differences were found in the assimilation of the carbohydrates raffinose (40%), α-ketoglutarate (38%), and inositol (35%).

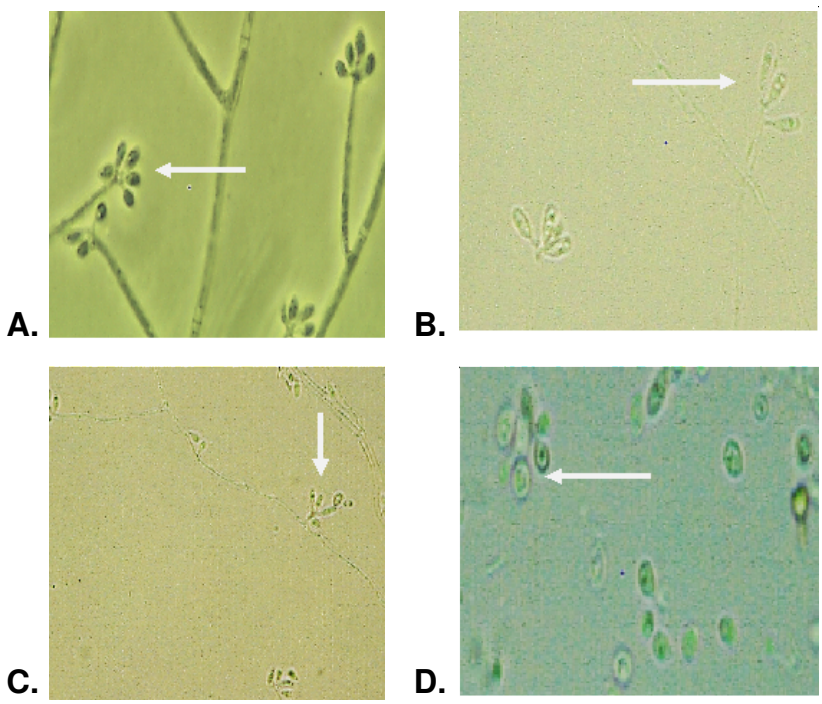


Figure 3. Morphology of hyaline conidia produced by *Sporothrix* spp. clinical isolates and observed at 100-fold magnification: Oval conidia arranged in flower form (A), oval elongated conidia (B) at 40-fold magnification (C), and globose conidia (D).

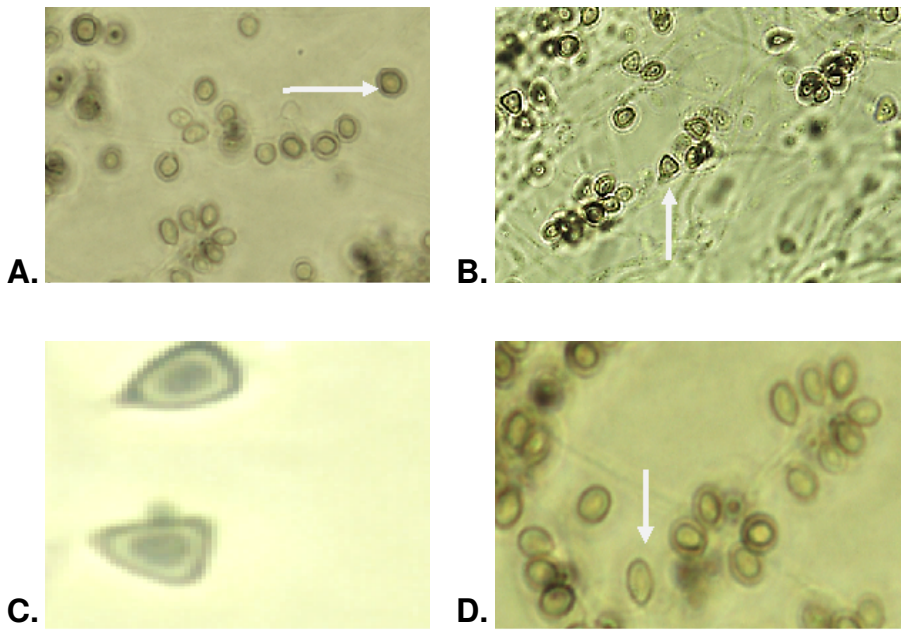


Figure 4. Morphology of dematiaceous conidia produced by *Sporothrix* spp. clinical isolates and observed at 100-fold magnification: Globose and subglobose conidia (A), triangular conidia (B, C), and oval conidia (D).

Sporothrix spp. clinical isolates: Transition from mycelium to yeast form

The transition from the mycelium to the yeast form was achieved by culturing each isolate four times in fresh culture media, with intervals of seven days. The yeast forms were obtained using two different culture media: BHI-I supplemented with 2% glucose, resulting in the yeast phase for 37 out of 42 isolates (88%), and BHI-II supplemented with 0.1% L-cysteine, 5% blood, and 2% glucose, which allowed all isolates (100%) to change to transit to the yeast form.

Phylogenetic analysis of Sporothrix spp. clinical isolates

Isolate genotyping was performed by partial amplification of the calmodulin gene. The alignment included 40 clinical isolates from the *Grupo de Micología Médica, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia* and 162 sequences from the Genbank database, representing pathogenic *Sporothrix* species such as *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. globosa*, *S. mexicana*, and *S. chilensis,* as well as environmental species like *S. brunneviolacea*, *S. pallida S. variecibatus*, and *S. lignivorus,* (used as an outgroup).

Out of the sequenced 42 isolates, 32 were identified as *S. schenckii*, and eight isolates were identified as *S. globose* (figure 5). Two isolates were identified as *Sarocladium kiliense* by BLAST analysis. However, these sequences were excluded from the alignments as they were determined to be laboratory contaminants. All sequences were analyzed by BLAST and showed identification ranging from 99 to 100%. The sequences were deposited in the Genbank.

Phenotypic differentiation by species

The molecular identification of the clinical isolates and the differences observed in their phenotypic characteristics, including growth at different

temperatures, colony texture and pigment, and conidia microscopic morphology, allowed for the grouping shown in table 2.

Discussion

The main finding of the present study was the successful species-level characterization of 40 *Sporothrix* spp. clinical isolates obtained from patients with sporotrichosis in the department of Antioquia, Colombia. Partial sequencing of the calmodulin gene revealed 32 isolates identified as *S. schenckii,* while the remaining eight corresponded to *S. globosa.*

The *S. schenckii* isolates demonstrated a heterogeneous group based on all evaluated phenotypic parameters. We observed that mycelial colonies of *S. schenckii* isolates grown at 25 °C were larger regardless of the culture media used, while at 30 °C, their growth tended to decrease. At 37 °C, the colony size was even smaller in both culture media.

In contrast, *S. globosa* isolates exhibited small mycelial colonies when grown at 25 °C. At 30 °C, in both culture media, the colonies were much smaller than the *S. schenckii* isolates in our study. *Sporothrix globosa* isolates were unable to grow in the nutritional media at 37 °C, consistent with previous phenotypic studies (5) reporting their incapacity to grow at this temperature with the employed culture media. Consequently, the transition from mycelial to yeast form at 37 °C was achieved in 100% of the isolates cultured with supplemented BHI-II medium and in 88% of the cases in non-supplemented BHI-I medium.

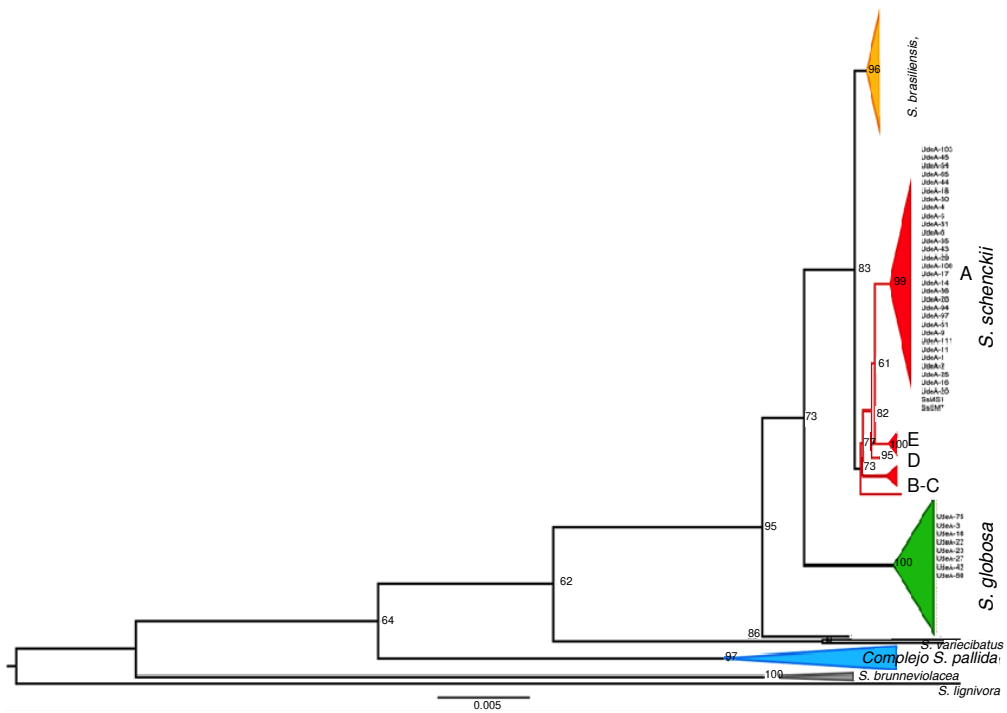


Figure 5. Phylogenetic relationships of the *Sporothrix* spp. clinical isolates. Phylogenetic tree was built from the partial sequences of the calmodulin gene, using the maximum likelihood method. The bootstrap or replicas was 1,000. Branches show the percentages.

Table 2. Characterization of *Sporothrix* spp. clinical isolates: Molecular identification and phenotypic findings

Specie	Growth 25°C		Growth 30°C		Growth 37°C	Colonies PDA 25°C	Microscopic morphology
	PDA (mm)	CMA (mm)	PDA (mm)	CMA (mm)	PDA-CMA (mm)		
S. schenkii	57.4±8.3	59.63±8.3	18.32±12.3	15.3±2.3	Yes	Membranous	Triangular, oval elongated
S. globosa	44.7±11.5	41.3±14.5	9.1±10	7.5±7.9	No	Velvety	Globoses

These findings suggest that supplemented BHI-II medium, also used for the transition of *Histoplasma capsulatum* (13), could be recommended for studying the yeast form of other dimorphic fungi. In our study, BHI-II medium allowed the yeast form to grow in all tested *Sporothrix* spp. Clinical isolates. In contrast, in 2010, de Oliveira *et al.* (14) reported *S. globosa* growth in potato dextrose agar at 37 ºC, suggesting significant phenotypic variability likely associated with genetic variability. This variability could indicate varying expression of *S. globosa* phenotypic characteristics according to the geographical origin (5,6).

Overall, our study provides valuable insights into the characterization of *Sporothrix* spp. species at 25 ºC, as their growth characteristics had not been previously evaluated at this temperature in other phenotypic studies conducted with this fungus (5).

Our data differ from results obtained in other studies incubating the *S. schenckii* complex species at 30 °C in potato dextrose agar and corn meal agar (5). In our study, we observed smaller colony sizes at this temperature than those reported by Rodrigues *et al.* in 2013 (15) and Camacho *et al.* in 2015 (16). They described colony size ranges above 50 mm for *S. schenckii* and greater than 30 mm for *S. globosa* colonies. In 2007, Marimon *et al.* (5) reported colony sizes ranging from 33 to 36 mm for *S. schenckii* and from 18 to 40 mm for *S. globosa*, also higher than the sizes observed in our study.

In 2002, another study by Mesa-Arango *et al*. (17) analyzed the growth of Colombian isolates from different geographical origins at temperatures of 35 ºC and 37 ºC. Although these temperatures were different from those evaluated in our study, the findings were similar. The Colombian isolates exhibited lower thermotolerance with a higher percentage of inhibition at these temperatures compared to isolates from other countries (Mexico and Guatemala), which showed statistically significant differences among them. Based on these observations, we can conclude that the growth of Colombian *Sporothrix* spp. isolates is affected at temperatures above 30 ºC.

In this study, we evaluated qualitatively the production and distribution of pigments in all isolates. In half of the *S. globosa* isolates (n=4), we detected mixed pigments (light and dark) with heterogeneous distributions, including spotting, centralized, distributed by sectors, and stippled patterns. Conversely, in the remaining *S. globosa* isolates, the distribution was homogeneous, with dark pigments predominance (n=3) compared to the light pigments (n=1).

Among the isolates identified as *S. schenckii,* we observed pigment diversity, including light, mixed, and dark pigments with the mentioned distributions, except for the stippling pattern, found exclusively in *S. globosa* isolates. Previous studies evaluating the phenotypic characteristics of *Sporothrix* spp. have not described the pigment type produced by these fungi. Chemical methods should be implemented to enhance these findings and to identify and quantify produced pigments by *Sporothrix* species.

Regarding pigment assessment, our analysis revealed significant diversity in the colony texture among the evaluated clinical isolates with a predominant membranous aspect. In the isolates identified as *S. globosa*, the dominant texture was velvety-like when grown on potato dextrose agar at 25 ºC. Seven of these isolates exhibited this characteristic, along with the cerebriform and central-hairy aspects. Additionally, one of the two isolates that presented a mixture of all four textures, belonged to this species. The isolates identified

as *S. schenckii* had a predominant membranous, followed by combinations of central, velvety, and cerebriform hairy textures. Similarly, in *S. globosa* one isolate presented all four textures.

This study does not allow us to specify a characteristic aspect for each species, but similarly to other works, it shows that colonies of the *Sporothrix* species tend to have a predominant membranous texture (18). The variation in macroscopic characteristics of the isolates raises suspicion about the possible existence of another species distinct from *S. schenckii*. In the case of the clinical isolates analyzed in this study, our concerns were confirmed with the finding and identification of *S. globosa*. We conducted phenotypic evaluations in potato dextrose agar medium because in corn meal agar all isolates exhibited similar pigment and texture. Cerebriform or centrally hairy colony appearance is not reported because its expression is probably affected by isolates' multiple *in vitro* culture passages over the years, causing variability from its original form.

The microscopic morphological findings of this study align with those reported by Marimon *et al*. in 2007 (5) and Camacho *et al*. in 2015 (16). Conidial morphology descriptions in *S. schenckii* isolates revealed triangular-shaped conidia, also known as sessile conidia. All isolates presenting this morphology belong to this species. On the other hand, none of the *S. globosa* isolates formed this type of conidia. They had predominance of globose (round) and sub-globose conidia.

Another significant difference observed in our study is the presence of elongated-to-oval conidia in 28 isolates of *S. schenckii* allocated in IIa clade according to the molecular biology, contrasting with Marimon *et al.* findings: Only two isolates belonging to IIb clade produced that type of conidia (5). Regarding the conidia diameter, we found differences between the two species. In *S. schenckii*, the average area and perimeter of dematiaceous and hyaline conidia were higher compared to *S. globosa* conidia from isolates. These findings align with those presented by Marimon *et al.* in 2007 concerning the area, although they did not report the perimeter (5). This study has enriched the knowledge of the microscopic aspects of prevalent species within the *Sporothrix* spp. clinical clade, allowing their characterization and differentiation.

Regarding carbohydrate assimilation, the carbohydrates commonly used to differentiate between *Sporothrix* species are raffinose, sucrose, and adonitol or ribitol (5). Previous studies reported that *S. globosa* does not assimilate raffinose (5), a finding also observed in our study for *S. globosa* and several *S. schenckii* isolates. Therefore, the assimilation of this carbohydrate does not allow for discrimination between the species. We observed differences in the assimilation of αketoglutarate and inositol, but this does not enable the distinction between the two species. The evaluation of carbohydrate assimilation using the Auxonograma API AUX 20 for species of *Sporothrix* spp. has not been reported before. The reason for evaluating the assimilation of these carbohydrates by clinical isolates of *Sporothrix* spp. by this method, was the inability to obtain adonitol by any means.

The *S. schenckii* complex has been divided into species by clades as follows: Clade I, *S. brasiliensis*; clade II, *S. schenckii*; clade III, *S. globose*; clade IV, *S. mexicana*; and clade V, *S. albicans/pallida* (5). All of our isolates identified as *S. schenckii* were grouped in clade IIa, a subgroup limited to isolates from South American endemic areas, consistent with reports by

Mesa-Arango *et al.* in 2002 (17), Marimon *et al.* in 2007 (5), Zhang *et al.* in 2015 (18), Madrid *et al.* in 2009 (19), and Rodrigues *et al.* in 2013 (15). These reports described the prevalence of *S. globosa* in Colombian isolates, demonstrating the widespread distribution of this species.

The phylogenetic analysis of this study, based on the partial amplification of the calmodulin gene, resulted in a topology tree like those built by the mentioned authors. This similarity demonstrates the importance of utilizing the *CALM1* gene for speciation within the clinical clade of sporotrichosis (15,20,21). The calmodulin gene has been widely used due to its synonymous substitutions in protein-coding regions, indicating a high degree of conservation and preservation of its original function. However, it contains parsimonious informative sites throughout its sequence, allowing for differentiation between species. This characteristic has led to a large number of available sequences of this gene in public databases and facilitated the development of rapid conventional PCR diagnostic tests using specific primers to identify the causative species of this mycosis (22,23).

The primary objective of this investigation was to phenotypically and genotypically characterize clinical isolates, previously identified as *S. schenckii* and *S. globosa,* to differentiate between the two species.

The results of this study indicate that the Colombian clinical isolates identified as *S. schenckii* exhibit a high degree of phenotypic heterogeneity. However, we could not establish a definitive pattern to differentiate between isolates corresponding to *S. schenckii* and *S. globosa*. Furthermore, Colombian isolates do not possess a higher genetic variability than isolates of *S. schenckii* from other regions of the world. Based on the findings of this research, we concluded that phenotypic characteristics assist in defining the genus and identifying major differences among *Sporothrix* species, but they do not provide a precise species identification. Confirmation of exact species would require the use of molecular biology techniques.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the research groups involved in the various stages of this study for their valuable feedback and suggestions to enhance the content.

References

1. Lopes-Bezerra LM, Schubach A, Costa RO. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. An Acad Bras Cienc. 2006;78:293-308.
2. Mora-Montes HM, Dantas A da S, Trujillo-Esquivel E, de Souza Baptista AR, Lopes-Bezerra LM. Current progress in the biology of members of the S*porothrix schenckii* complex following the genomic era. FEMS Yeast Res. 2015;15:fov065. https://doi.org/10.1093/femsyr/fov065
3. Marimon R, Gené J, Cano J, Trilles L, Dos Santos Lazéra M, Guarro J. Molecular phylogeny of S*porothrix schenckii.* J Clin Microbiol. 2006;44:3251-6. https://doi.org/10.1128/JCM.00081-06
4. Hektoen L, Perkins CF. Refractary subcutaneous abscesses causes by *Sporothrix schenckii*. A new pathogenic fungus. J Exp Med. 1900;5:77-89. https://doi.org/10.1084/jem.5.1.77
5. Marimon R, Cano J, Gené J, Sutton DA, Kawasaki M, Guarro J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. J Clin Microbiol. 2007;45:3198-206. https://doi.org/10.1128/JCM.00808-07
6. Rodrigues AM, Della-Terra PP, Gremiao ID, Pereira SA, Orofino-Costa R, de Camargo ZP. The threat of emerging and re-emerging pathogenic *Sporothrix* species. Mycopathologia. 2020;185:813-42. https://doi.org/10.1007/s11046-020-00425-0

7. de Carvalho JA, Monteiro RC, Hagen F, de Camargo ZP, Rodrigues AM. Trends in molecular diagnostics and genotyping tools applied for emerging *Sporothrix* species. J. Fungi (Basel). 2022;8:809. https://doi.org/10.3390/jof8080809
8. Queiroz-Telles F, Nucci M, Colombo AL, Tobón A, Restrepo A. Mycoses of implantation in Latin America: An overview of epidemiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment. Med Mycol. 2011;49:225-36. https://doi.org/10.3109/13693786.2010.539631
9. Rubio G, Sanchez G, Porras L, Alvarado Z. Sporotrichosis: prevalence, clinical and epidemiological features in a reference center in Colombia. Rev Iberoam Micol. 2010;27:75-9. https:doi.org/10.1016/j.riam.2010.01.001
10. Velásquez J, Restrepo A, Calle G. Experiencia de 12 años con la esporotricosis: Polimorfismo clínico con la entidad. Ant Med. 1976;26:153-69.
11. Castro LA. Esporotricosis cutánea: experiencia de un hospital de tercer nivel en Cali. IATREIA. 2013;26:155-9.
12. O´Donnell KN, Nirenberg HI, Aoki T, Cigelnik E. A multigene phylogeny of the G*ibberella fujikuroi* species complex: Detection of additional phylogenetically distinct species. Mycoscience. 2000;41:61-78. https://doi.org/10.1007/BF02464387
13. Gómez LF, Arango M, McEwen JG, Gómez OM, Zuluaga A, Peláez CA, *et al.* Molecular epidemiology of Colombian *Histoplasma capsulatum* isolates obtained from human and chicken manure samples. Heliyon. 2019;5:e02084. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02084
14. de Oliveira MM, de Almeida-Paes R, de Medeiros-Muniz M, de Lima-Barros MB, Galhardo MC, Zancope-Oliveira RM. Sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa* in Rio De Janeiro, Brazil: Case report. Mycopathologia. 2010;169:359-63. https://doi.org/10.1007/s11046-010-9276-7
15. Rodrigues AM, de Hoog S, de Camargo ZP. Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex. Med Mycol. 2013;51:405-12. https://doi.org/10.3109/13693786.2012.719648
16. Camacho E, León-Navarro I, Rodríguez-Brito S, Mendoza M, Niño-Vega GA. Molecular epidemiology of human sporotrichosis in Venezuela reveals high frequency of *Sporothrix globosa*. BMC Infect Dis. 2015;15:94. https://doi.org/10.1186/s12879-015-0839-6
17. Mesa-Arango AC, Reyes-Montes MR, Pérez-Mejía A, NavarroBarranco H, Souza V, Zúñiga G, *et al.* Phenotyping and genotyping of *Sporothrix schenckii* isolates according to geographic origin and clinical form of Sporotrichosis. J Clin Microbiol. 2002;40:3004-11. https://doi.org/10.1128/JCM.40.8.3004-3011.2002
18. Bonifaz A. Micología médica básica. Cuarta edición. México D.F. Mc Graw Hill; 2012. p. 214-30.
19. Zhang Y, Hagen F, Stielow B, Rodrigues AM, Samerpitak K, Zhou X, *et al.* Phylogeography and evolutionary patterns in *Sporothrix* spanning more than 14 000 human and animal case reports. Persoonia. 2015;35:1-20. https//doi.org/10.3767/003158515X687416
20. Madrid H, Cano J, Gené J, Bonifaz A, Toriello C, Guarro J. *Sporothrix globosa*, a pathogenic fungus with widespread geographical distribution. Rev Iberoam Micol. 2009;26:218-22. https://doi.org/10.1016/j.riam.2009.02.005
21. Marimon R, Gené J, Cano J, Guarro J. *Sporothrix luriei*: A rare fungus from clinical origin. Med Mycol. 2008;46:621-5. https://doi.org/10.1080/13693780801992837
22. Rodrigues AM, Cruz-Choappa R, Fernandes GF, de Hoog GS, de Camargo ZP. *Sporothrix chilensis* sp. nov. (Ascomycota: Ophiostomatales), a soil-borne agent of human sporotrichosis with mild-pathogenic potential to mammals. Fungal Biol. 2016;120:246-64. https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.05.006
23. Rodrigues AM, de Hoog GS, de Camargo ZP. Molecular diagnosis of pathogenic *Sporothrix s*pecies. PLoS Negl Trop Dis 2015;9:e0004190. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004190

Biomédica 2023;43(Supl.1):229-44
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.6850

Artículo original

Validación de la metodología para cuantificar el fluconazol y sus impurezas orgánicas en materia prima por cromatografía líquida de alta resolución

James Alexander Castillo[1], Natalia Afanasjeva[2]

[1] Programa de Química, Universidad del Valle, Cali, Colombia
[2] Departamento de Química, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad del Valle, Cali, Colombia

Introducción. La eficiencia de una metodología para analizar una sustancia farmacológica puede verse afectada por las condiciones reales del laboratorio de cada país, incluyendo el clima. Por esta razón, se requiere validar el método con las pautas recomendadas para ello y optimizar el proceso, para asegurar el éxito y la confianza en los resultados.
Objetivo. Validar una metodología para la cuantificación simultánea del fluconazol (materia prima) y sus impurezas orgánicas mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos en condiciones de clima tropical y con todos los requisitos normativos.
Materiales y métodos. Se hicieron pruebas previas a la validación del método: idoneidad del sistema, estudio de filtros, límite de cuantificación, ausencia del error sistemático, estudios de degradación forzada y estabilidad de las soluciones. Además, se validaron: la especificidad, la linealidad, la exactitud, la precisión y la robustez.
Resultados. La pureza espectral del método se logró al obtener la separación de los productos de degradación de los picos de los analitos. La estabilidad de las soluciones no se vio afectada, en la frecuencia evaluada de 24 horas, a temperatura ambiente y de refrigeración. Se obtuvo una linealidad con coeficientes de correlación mayores o iguales a 0,999 para la valoración y mayores o iguales a 0,997 para las impurezas. La recuperación estuvo en el rango de 98 a 102,0 % de fluconazol, con una exactitud entre el 80 y el 120 % para las impurezas. El factor de repetibilidad y reproducibilidad no superó la desviación estándar relativa del 2,0 % para la valoración y, la del 5,0 %, para las impurezas, lo cual mostró una solidez adecuada del método. Además, se obtuvo un tiempo corto de ejecución del análisis, lo que permitió la rápida determinación de la calidad de la materia prima.
Conclusión. Se demostró que el método de cuantificación de fluconazol, validado por cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos, es lo suficientemente selectivo, preciso, exacto, lineal y robusto; además, es capaz de generar resultados analíticos veraces en condiciones de uso reales, incluyendo el clima tropical de Colombia.

Palabras clave: estudios de evaluación como asunto; cromatografía líquida; estudio de validación; fluconazol; contaminación de medicamentos; química analítica.

Method validation for the quantification of fluconazole and its organic impurities in raw material using high-performance liquid chromatography

Introduction. The real laboratory conditions of each country, including climate, can affect the method's efficiency in analyzing a pharmacological substance. Thus, it is necessary to validate the process according to the corresponding guidelines and optimize it to ensure success and confidence in the results.
Objective. The objective was to validate a methodology for fluconazole and its organic impurities quantification in raw material using high-performance liquid chromatography, with a diode array detector, under tropical climate conditions, and complying with all regulatory requirements.
Materials and methods. We performed pre-validation tests of the method consisting of system adequacy, filters study, quantification limit, absence of systematic error, forced degradation studies, and solutions stability. In addition, we validated the specificity, linearity, accuracy, precision, and robustness of the system.
Results. Separation of the degradation products from the analyte peaks allowed the achievement of the method's spectral purity. The solution's stability was not affected during the evaluated time (24 hours) at room temperature and under refrigeration. Linearity resulted in correlation coefficients greater than or equal to 0.999 for the evaluation and greater than or equal to 0.997 for impurities. We obtained a fluconazole recovery varying from 98 to 102% with an accuracy between 80 to 120% for impurities detection. The repeatability and reproducibility factor did not exceed a relative standard deviation of 2.0% for the evaluation and of 5.0% for the impurities, demonstrating the adequate robustness of

Recibido: 13/01/2023
Aceptado: 21/07/2023
Publicado: 24/07/2023

Citación:
Castillo JA, Afanasjeva N. Validación de la metodología para cuantificar el fluconazol y sus impurezas orgánicas en materia prima por cromatografía líquida de alta resolución. Biomédica. 2023;43(Supl.1):229-44.
https://doi.org/10.7705/biomedica.6850

Correspondencia:
James Alexander Castillo, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Departamento de Química, Universidad del Valle, Calle 13 N°100-00, edificio 320, oficina 2065, Ciudad Universitaria Meléndez, Cali, Colombia
Teléfono: (+572) 321 2173
james.castillo@correounivalle.edu.co

Contribución de los autores:
James Alexander Castillo: trabajo experimental, interpretación y análisis de resultados
Natalia Afanasjeva: participación en todas las etapas de la validación
Ambos autores participaron en la metodología y la escritura del manuscrito.

Financiación:
El proyecto no tuvo fuente de financiación. La validación se hizo con el apoyo técnico (uso de equipos, reactivos y muestras) de una empresa privada.

Conflicto de intereses:
Los autores declaramos que, durante la ejecución del trabajo y la publicación de este artículo, no hubo conflicto de intereses.

the method. In addition, a short analysis execution time allowed the quick determination of the raw material quality.
Conclusion. We demonstrated that the fluconazole quantification method validated by high-performance liquid chromatography is sufficiently selective, precise, exact, linear, and robust to generate accurate analytical results under real conditions, including the tropical climate of Colombia.

Keywords: Evaluation studies as topic; chromatography, liquid; validation study; fluconazole; drug contamination; chemistry, analytic.

Los medicamentos son sustancias elementales para mejorar la calidad de vida de las personas, por lo que su consumo, dosificación, administración y proceso de fabricación deben ser rigurosamente controlados. Este último requiere de la vigilancia y la supervisión constante, y de un proceso de calidad óptimo desde la adquisición de las materias primas hasta el embalaje del producto final, que cumpla con las pautas establecidas para garantizar la confiabilidad y la seguridad del fármaco para su consumo. La eficiencia de los resultados del método analítico puede afectarse por las condiciones reales de análisis de cada laboratorio farmacológico en un país o una zona climática determinada. En consecuencia, es necesario validar la metodología con las condiciones reales de análisis, para optimizar el proceso y obtener resultados confiables.

En este trabajo se desarrolló el método de análisis de la materia prima fluconazol, conocido químicamente como (2-(2,4-difluorofenil)-1,3-bis(1,2,4-triazol-1-il)propan-2-ol) (1). Es un ingrediente farmacéutico activo, un antifúngico clasificado en el grupo de los azoles, más específicamente, como un triazol (2). Se administra para tratar infecciones producidas por hongos (3,4) Es ampliamente usado para tratar casos de infecciones como la candidiasis de las mucosas e infecciones sistémicas, incluidas la candidiasis, la coccidioidomicosis y la criptococosis (5,6). Actúa inhibiendo la desmetilación del citocromo P-450 fúngico (C-14-α-desmetilasa), lo que resulta en la acumulación de 14-α-metil-esteroles fúngicos, la pérdida de los esteroles fúngicos normales y la actividad fungistática. Estos efectos interfieren con la adhesión celular y la biosíntesis del ergosterol, lo cual altera la membrana y el crecimiento de la pared en las células fúngicas (1).

Una de las técnicas actuales más eficientes para obtener resultados óptimos y confiables, es el análisis por cromatografía líquida de alta resolución (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), con absorción UV-visible, mediante el uso de espectrómetros de arreglos de diodos (DAD) (7-10). Es una herramienta fundamental para evaluar diversos fármacos y sus validaciones (11,12). Por esto, se desarrolló y validó una metodología para la valoración del ingrediente farmacéutico activo del fluconazol (materia prima) y la cuantificación simultánea de sus impurezas orgánicas por HPLC-DAD en fase inversa.

En esta evaluación, se tuvieron en cuenta las condiciones del clima tropical de Colombia, de acuerdo con las pautas establecidas en la monografía de la farmacopea de los Estados Unidos (13), y el ajuste de los parámetros, según lo permitido por la Conferencia Internacional de Armonización (14). Esto, con el fin de optimizar el proceso de análisis, y la reducción del tiempo y los costos del proceso, ya que, al fijar unos parámetros específicos, se puede garantizar la eficiencia del análisis y el cumplimiento de sus regulaciones.

En este trabajo, se analizaron muestras del ingrediente farmacéutico activo fluconazol y los resultados de la validación del método se utilizaron para estimar la calidad, la confiabilidad y la reproducibilidad del análisis, como un aspecto fundamental de las buenas prácticas de laboratorio (15).

Cuadro 1. Estándares, reactivos y muestra utilizados en la validación del fluconazol

Nombre	Grado	Fabricante	Lote	Potencia (%)
Fluconazol Supelco®	Secundario	Sigma-Aldrich	LRAC0255	99,96
Fluconazol - compuesto relacionado A	Primario	USP	R05480	100,00
Fluconazol - compuesto relacionado B	Primario	USP	R05370	97,00
Fluconazol - compuesto relacionado C	Primario	USP	R061Y0	99,90
Acetonitrilo Chromasolv™	HPLC	Honeywell	EC316-CO	99,98
Agua	HPLC	Laboratorio	N/A	N/A
Peróxido de hidrógeno Perdrogen™ 30 % (w/w)	RA	Honeywell	J2000	30,10
Ácido clorhídrico 37 % ExpertQ®	RA	Scharlau	21344209	37,98
Hidróxido de sodio, pellets Emprove® Essential	RA	Merck®	B1669382	99,20
Fluconazol	MP	Virupaksha Organics Limited, India	AFLNC0221027(M)	100,30

HPLC: *High Performancee Liquid Chromatography*; USP: *United States Pharmacopeia*, máximo grado de pureza; N/A: no aplica; RA: reactivo analítico; MP: materia prima

Materiales y métodos

Equipos, estándares y reactivos

Se usó un equipo de cromatografía líquida Vanquish™ Core HPLC (Thermo Scientific), equipado con una bomba cuaternaria C, un automuestreador Split Sampler CT, un detector con arreglo de diodos y un compartimiento de columna C Vanquish™ equipado con un *software* para la recopilación y el procesamiento de los datos cromatográficos, denominado Thermo Scientific Dionex Chromeleon™ 7 Chromatography Data System, versión 7,3. Se utilizó una columna cromatográfica empaquetada de tipo C18 Phenomenex Prodigy™ de 3 µm ODS-3, con un diámetro de partícula de 3 µm, un tamaño de poro de 100 Å, un diámetro interno de 4,6 mm y una longitud de 150 mm. Para la reproducibilidad, se empleó un equipo de cromatografía líquida QSM-R Waters™ Acquity Arc con una bomba cuaternaria, un automuestrador Sample Manager y un detector con arreglo de fotodiodos 2998 con el *software* Empower® 3 Pro Chromatography Data System, versión 7,4. El tratamiento estadístico de los datos y la interpretación de los resultados se llevaron a cabo mediante el *software* MVA™ (NOVIA Gmb), versión 2,1.

La fase móvil se filtró con un equipo de filtración al vacío, usando una presión de 0,035 MPa y una membrana hidrofílica de polifluoruro de vinilideno (PVDF) (QLS™) con un tamaño de poro de 0,45 µm. Además, se usaron los siguientes equipos: un baño ultrasónico Cole-Parmer 8894R-DTA, una balanza analítica Sartorius Secura® 225D-1S, unas micropipetas Brand Transferpette® S D-100 (10 µl-1000 µl) y D-1000 (100 µl-1000 µl), una estufa universal Memmert UNB 500, un baño de agua Memmert WNB 14, una cabina con intensidad lumínica entre 2000 lx y 3750 lx (según el Luxómetro Testo 540) y una nevera vertical Refrimag con temperatura de 2 a 8 °C. Se emplearon filtros para jeringa con membrana hidrofílica PVDF de 0,45 µm (QLS™) y material volumétrico en vidrio clase A de 10,0 ml, 20,0 ml, 25,0 ml y 50,0 ml, marca Duran™. Los estándares, los reactivos y las muestras utilizadas en esta validación, se muestran en el cuadro 1.

Pautas base para la validación de la metodología analítica

La validación de la metodología se propuso según las pautas establecidas por la Conferencia Internacional de Armonización (14), la guía para la industria de validación de métodos bioanalíticos de la *Food and Drug Administration* de Estados Unidos (16) y el capítulo sobre “Validación de procedimientos compendiales”, teniendo en cuenta los parámetros de desempeño de la categoría I para la valoración, y los de la categoría II

para las impurezas (17). Para la valoración y la identificación de impurezas orgánicas del fluconazol (materia prima) por HPLC-DAD, se tomó como base la metodología analítica descrita en la farmacopea de Estados Unidos (13).

Condiciones cromatográficas del método

La técnica cromatográfica se validó mediante un sistema en fase inversa y una mezcla isocrática del reactivo acetonitrilo y de agua, de grado HPLC, en una proporción de 20:80 (v/v); con una temperatura de columna de 40 °C, una longitud de onda de 260 nm, un volumen de inyección de 20 µl con flujo de 0,5 ml/minuto y un detector con arreglo de diodos.

Preparación de la solución blanco, el estándar de impurezas, el estándar de fluconazol y la solución muestra para la valoración y la detección de impurezas

Se usó la fase móvil como diluyente y blanco. Se empleó un filtro para jeringa con membrana hidrofílica de PVDF con poro de 0,45 µm y se transfirió a un vial incoloro para HPLC. Para la detección de impurezas, se prepararon soluciones madre de 0,5 mg/ml de cada estándar de referencia (cuadro 1) de fluconazol, fluconazol compuesto relacionado A, fluconazol compuesto relacionado B y fluconazol compuesto relacionado C. Estos se disolvieron en acetonitrilo y se llevaron al volumen deseado con la fase móvil filtrada. A partir de estas soluciones madre, se procedió a preparar la solución estándar mixta de impurezas con una concentración final de 10 µg/ml. Para la valoración, se preparó el estándar, a partir del fluconazol de referencia, a una concentración final de 0,5 mg/ml. Las muestras se prepararon con el fluconazol materia prima a una concentración final de 0,5 mg/ml para la valoración y una de 3,0 mg/ml para las impurezas. Todas las soluciones se llevaron a un volumen final de 50 ml con la fase móvil.

Pruebas de prevalidación (idoneidad del sistema, prueba de filtros, determinación de la estabilidad de las soluciones)

Se hicieron pruebas al sistema –instrumentos, analistas, equipos y sustancias de referencia– para verificar su operación con los criterios preestablecidos, que permitieron garantizar la confiabilidad de los resultados de la metodología analítica propuesta (13). En la solución estándar mixta de impurezas, se verificó la correcta elución cromatográfica (cuadro 2) de cada pico de impurezas en el fluconazol. Las estructuras químicas de los compuestos evaluados se presentan en la figura 1.

En la prueba de filtros, la solución estándar de fluconazol, usada para la valoración, se filtró bajo dos condiciones: en la primera, se descartaron los primeros 0,5 ml y, en la segunda, se descartó el primer mililitro. El volumen descartado se transfirió a tres viales independientes, según la condición.

Cuadro 2. Tiempos de retención relativa, con respectivo orden cromatográfico de elución (13)

Nombre	Tiempo de retención relativa (minutos)
Fluconazol - compuesto relacionado A	0,50
Impureza especifica	0,60
Fluconazol - compuesto relacionado B	0,81
Fluconazol - compuesto relacionado C	0,86
Fluconazol	1,00

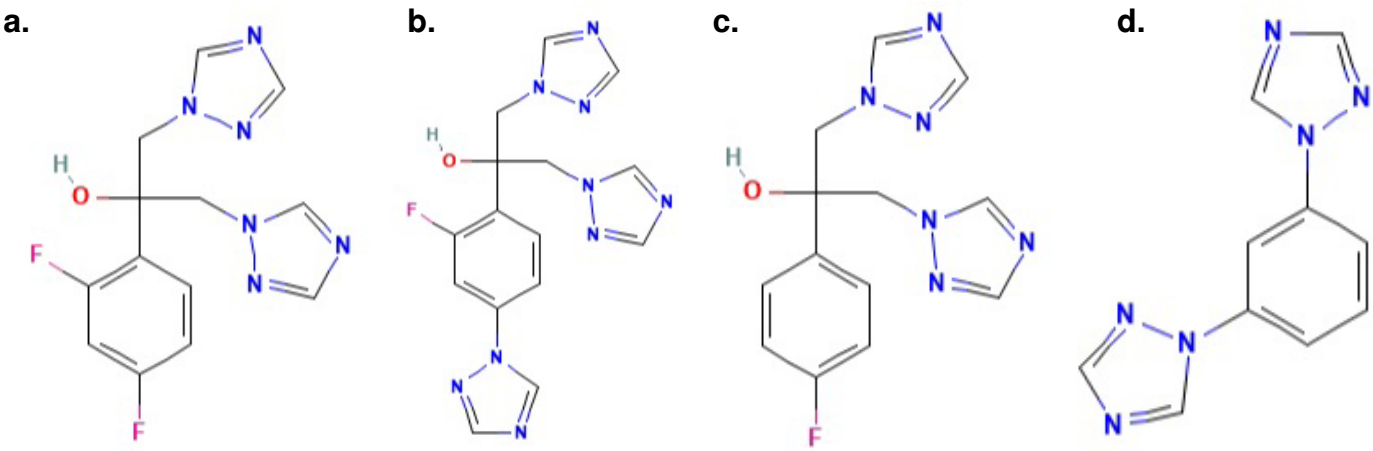


Figura 1. (a) fluconazol (2-(2,4-difluorofenil)-1,3-bis(1,2,4-triazol-1-il)propan-2-ol) (1); **(b)** fluconazol - compuesto relacionado A (2-[2-fluoro-4-(1H-1,2,4-triazol-1-il)fenil]-1,3-bis(1H-1,2,4-triazol-1-il)-propan-2-ol) (18); **(c)** fluconazol - compuesto relacionado B (2-(4-fluorofenil)-1,3-bis(1H-1,2,4-triazol-1-il)propan-2-ol) (19); **(d)** fluconazol - compuesto relacionado C (1,3-Di(1H-1,2,4-triazol-1-il)benceno) (20)

La estabilidad de las soluciones se determinó a partir de la preparación de la solución estándar de impurezas (estándar 1), el estándar 2 de valoración y un conjunto de tres muestras para la valoración. Este análisis se registró como tiempo cero. Se hicieron alícuotas por separado de las soluciones y las muestras, y se almacenaron a temperatura ambiente o se refrigeraron entre 2 y 8 °C. La estabilidad de las soluciones se evaluó nuevamente para las dos condiciones, en un periodo de 24 horas.

Límite de cuantificación

La prueba de límite de cuantificación, en la que cada analito puede cuantificarse confiablemente (21), se practicó a partir de los resultados previos de la solución estándar de impurezas con concentración de 10 µg/ml y se extrapoló la proporción señal/ruido a valores cercanos a 25. De esta manera, la solución para el límite de cuantificación se preparó a partir de las soluciones madre del estándar de impurezas con una concentración de 0,5 mg/ml.

Se tomaron alícuotas de 10 µl para preparar el fluconazol compuesto relacionado A; de 220,0 µl para el fluconazol compuesto relacionado B; de 12 µl para el fluconazol compuesto relacionado C, y de 234 µl para el fluconazol ingrediente farmacéutico activo (materia prima). Los compuestos se disolvieron y se llevaron a un volumen final de 20 ml con fase móvil. La concentración final obtenida fue: de 0,25 µg/ml para el fluconazol compuesto relacionado A; de 5,50 µg/ml para el fluconazol compuesto relacionado B; de 0,30 µg/ml para el fluconazol compuesto relacionado C, y de 5,85 µg/ml para el fluconazol ingrediente farmacéutico activo.

Estudios de degradación forzada en las muestras para determinar su especificidad

Para determinar la especificidad de los compuestos, se preparó una solución blanco, una control, dos de hidrólisis ácida (1,0 N y 0,1 N), dos de hidrólisis básica (1,0 N y 0,1 N), una de oxidación, una de termólisis y una solución sometida a fotólisis forzada. Las soluciones se sometieron a diferentes condiciones de degradación con calentamiento en baño de agua a 60 °C, cada una con un tiempo de corrido cromatográfico de 60 minutos.

Preparación de la solución blanco y de la solución control. En un balón volumétrico de 50 ml, que contenía 25 ml de diluyente, se adicionó 1,0 ml de 1,0 N de ácido clorhídrico, 1,0 ml de 1,0 N de hidróxido de sodio y 1,0 ml de peróxido de hidrógeno al 0,3 %. La solución se calentó por 30 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se llevó a volumen con fase móvil. La solución de control se preparó como se indica para la solución muestra de impurezas, a una concentración final de 3,0 mg/ml, sin someterse a ninguna degradación.

Condiciones de preparación de la solución muestra sometida a degradación

Hidrólisis ácida. En un balón volumétrico de 50 ml, se pesaron 150 mg de muestra de fluconazol, se agregaron 25 ml de diluyente y los compuestos se mezclaron hasta su completa disolución. Luego, se adicionó 1 ml de 1,0 N de ácido clorhídrico, se calentó por 30 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se neutralizó con 1,0 ml de 1,0 N de hidróxido de sodio.

Hidrólisis básica. En un balón volumétrico de 50 ml, se pesaron 150 mg de muestra de fluconazol, se agregaron 25 ml de diluyente y los compuestos se mezclaron hasta su completa disolución. Luego, se adicionó 1,0 ml de 1,0 N de hidróxido de sodio, se calentó por 30 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se neutralizó con 1,0 ml de 1,0 N de ácido clorhídrico.

Oxidación. En un balón volumétrico de 50 ml, se pesaron 150 mg de muestra de fluconazol, se agregaron 25 ml de diluyente y los compuestos se mezclaron hasta su completa disolución. Luego, se adicionó 1,0 ml de 0,3 % de peróxido de hidrógeno, se calentó por 30 minutos y se dejó enfriar.

Termólisis. En un vaso de precipitado, se pesaron 150 mg de muestra de fluconazol y se sometieron a una temperatura de 100 °C en un horno durante 24 horas. Se dejó enfriar y luego se agregaron 20 ml de diluyente. Los compuestos se mezclaron hasta su completa disolución y la mezcla se transfirió a un balón volumétrico de 50,0 ml.

Fotólisis. En un balón volumétrico de 50 ml, se pesaron 150 mg de muestra de fluconazol, que se expusieron durante 24 horas a una luz directa en cabina con una intensidad lumínica entre 2000 y 3750 lx. Luego, se agregaron 25 ml de diluyente y se mezclaron hasta su completa disolución.

Todas estas soluciones se llevaron a volumen con fase móvil.

Linealidad del sistema para valorar la materia prima y detectar impurezas orgánicas del fluconazol

Se preparó la linealidad del sistema de fluconazol para su valoración a 0,50 mg/ml (100 %). Se hicieron diluciones por triplicado con concentraciones finales de 0,45 mg/ml (90 %), 0,48 mg/ml (96 %), 0,50 mg/ml (100 %), 0,53 mg/ml (106 %) y 0,55 mg/ml (110 %). De igual modo, para detectar las impurezas de fluconazol (10 µg/ml) en los compuestos relacionados A, B y C, y el fluconazol de grado ingrediente farmacéutico activo, se preparó la linealidad del sistema de impurezas orgánicas, haciendo diluciones por triplicado para obtener un límite de cuantificación de 90 %, 100 %, 110 % y 120 %. La concentración usada del compuesto relacionado A fue 0,25 µg/ml, la del compuesto relacionado B fue 5,50 µg/ml, y la del compuesto relacionado C fue 0,30 µg/ml; las diluciones de la materia prima de fluconazol quedaron a concentraciones finales de 5,85 µg/ml, 9 µg/ml, 10 µg/ml, 11 µg/ml y 12 µg/ml.

Exactitud para valorar y detectar las impurezas orgánicas de fluconazol

Este parámetro se evaluó en el rango de la linealidad. Se analizaron tres puntos (90 %, 100 % y 110 %) para la valoración, y se seleccionaron como limité de cuantificación 100 % y 120 % para las impurezas, a partir de la concentración nominal del método para la valoración del analito y la cuantificación de las impurezas orgánicas.

Precisión para valoración e impurezas orgánicas de fluconazol

Repetibilidad del sistema de fluconazol. Se determinó a partir de seis inyecciones de la solución estándar de valoración, con la concentración analítica de trabajo del fluconazol que es 0,5 mg/ml; y seis inyecciones de la solución estándar de impurezas con la concentración analítica de trabajo del compuesto relacionado A, B y C, y el fluconazol materia prima de 10 µg/ml.

Reproducibilidad del método y precisión intermedia de fluconazol. Para su determinación, el analista 1 y el analista 2 prepararon dos series (serie 1 y serie 2) de seis muestras, cada una con la concentración analítica de trabajo para la valoración de fluconazol (0,5 mg/ml) y para la detección de impurezas orgánicas a la concentración analítica de trabajo de 10 µg/ml para los compuestos relacionados A, B y C, y fluconazol materia prima.

Parámetro de solidez (robustness). Este parámetro se estimó a partir de las siguientes variaciones: en días diferentes de análisis (día 1 y 2), en equipos diferentes (equipo 1 y 2) y por analistas diferentes (analista 1 y 2), tanto para la valoración como para la detección de impurezas orgánicas del fluconazol.

Resultados

Idoneidad del sistema

En la valoración se encontró que, para el estándar 1 de fluconazol había una simetría menor o igual a 2, con una desviación estándar relativa menor o igual a 2 % (para seis inyecciones consecutivas), mientras que, para el estándar 2 de valoración, se halló una correlación entre 98 y 102 %.

En el estándar de impurezas orgánicas se encontró, para todos los picos, una desviación estándar relativa menor o igual a 5 % y una resolución mayor o igual a 1,5 entre el fluconazol y los compuestos relacionados B y C. La desviación estándar relativa calculada para las respuestas de las seis inyecciones de límite de cuantificación fue menor o igual al 10 %. Se calculó una recomendada entre señal y ruido de 20 a 30, considerando la variabilidad de los equipos, aunque una relación entre señal y ruido de 10:1 era aceptable para estimar el límite de cuantificación, de acuerdo con las pautas de cromatografía señaladas por la farmacopea de Estados Unidos (21).

Estandarización de la metodología

Prueba de filtros. El porcentaje de recuperación para cada muestra estuvo en el rango de 98 a 102%. Las muestras no presentaron señales aportadas por los filtros que pudieran interferir en la identificación o cuantificación del analito de interés. La desviación estándar relativa de las respuestas de tres réplicas fue menor o igual a 2 %; y para las respuestas entre las seis inyecciones repetidas de la solución estándar sin filtrar fue menor o igual a 1 %.

Degradaciones forzadas para fluconazol. En las pruebas de degradación forzada se observó que el fluconazol presentó una alta estabilidad. Se verificó la ausencia de interferencias de los posibles productos de degradación en el método analítico con respecto al tiempo de retención del fluconazol (figura 2, a-f). Las condiciones de estrés no afectaron la estabilidad del fluconazol dado que los porcentajes de degradación fueron muy bajos.

Estabilidad de soluciones. La correlación entre el estándar 1 y el estándar 2 estuvo entre el 99 y el 101 % para las inyecciones iniciales de chequeo. Para las inyecciones intermedias, y al final de la secuencia, la correlación fue del 98 al 102 % con la solución estándar de valoración. La recuperación calculada entre el contenido promedio a las 24 horas respecto al obtenido en el tiempo cero fue del 98 al 102 %, en base seca. La desviación estándar relativa de las recuperaciones en cada tiempo no superó el 2 % (cuadro 3), lo que es equivalente a un buen resultado.

Validación de la metodología

Especificidad. Se determinó la metodología analítica empleada para cuantificar impurezas orgánicas presentes en el fluconazol materia prima; no se evidenciaron señales que pudieran interferir en la identificación y cuantificación del analito de interés (figura 3, a-h). La resolución no fue menor de 1,5, lo que indica un buen resultado. La pureza espectral del analito de interés se demostró con un *factor match* cercano a 1.000 para las pruebas realizadas en el *software Chromeleon*.

Linealidad del sistema para la valoración y detección de impurezas orgánicas de fluconazol. El coeficiente de correlación fue mayor de 0,999 para la valoración, y mayor o igual a 0,997 para las impurezas orgánicas. Se confirmó la ausencia de error sistemático, ya que la correlación entre el límite inferior del rango (0,45 mg/ml), la concentración nominal (0,5 mg/ml) y el límite superior del rango (0,55 mg/ml) frente al estándar 1, fue de 98-102 % para la valoración y fue del 80 al 120 % para las impurezas orgánicas. Los resultados de la pendiente de la regresión lineal, el coeficiente de correlación, el gráfico de la suma residual de los cuadrados y la dispersión aleatoria alrededor de la línea del cero, que fue de ± 2 % para la valoración y de ± 10 % para las impurezas orgánicas, confirmaron la linealidad del sistema (cuadro 4).

Exactitud para la valoración de fluconazol y sus impurezas orgánicas. El porcentaje de recuperación individual evaluado versus la calibración externa en la valoración para el fluconazol fue del 97 al 103 %, y para la cuantificación de las impurezas orgánicas, fue del 80 al 120 %. El porcentaje de recuperación media de cada nivel y el global versus el de la calibración externa fue del 98 al 102 % para la valoración del fluconazol, y del 80 al 120 % en la cuantificación de las impurezas orgánicas.

La desviación estándar relativa de las determinaciones de cada nivel, no fue mayor del 2 % para la valoración, mientras que, para las impurezas orgánicas, se estableció de acuerdo con la relación entre la concentración límite de impurezas y el límite de cuantificación: si la concentración límite de impurezas estaba entre 1 y 2 veces el límite de cuantificación, la desviación estándar relativa era menor o igual a 25 %; entre 2 y 10 veces el límite de cuantificación, la desviación estándar relativa era menor o igual a 15 %; y entre 10 y 20 veces el límite de cuantificación, la desviación estándar relativa era menor o igual a 5 %.

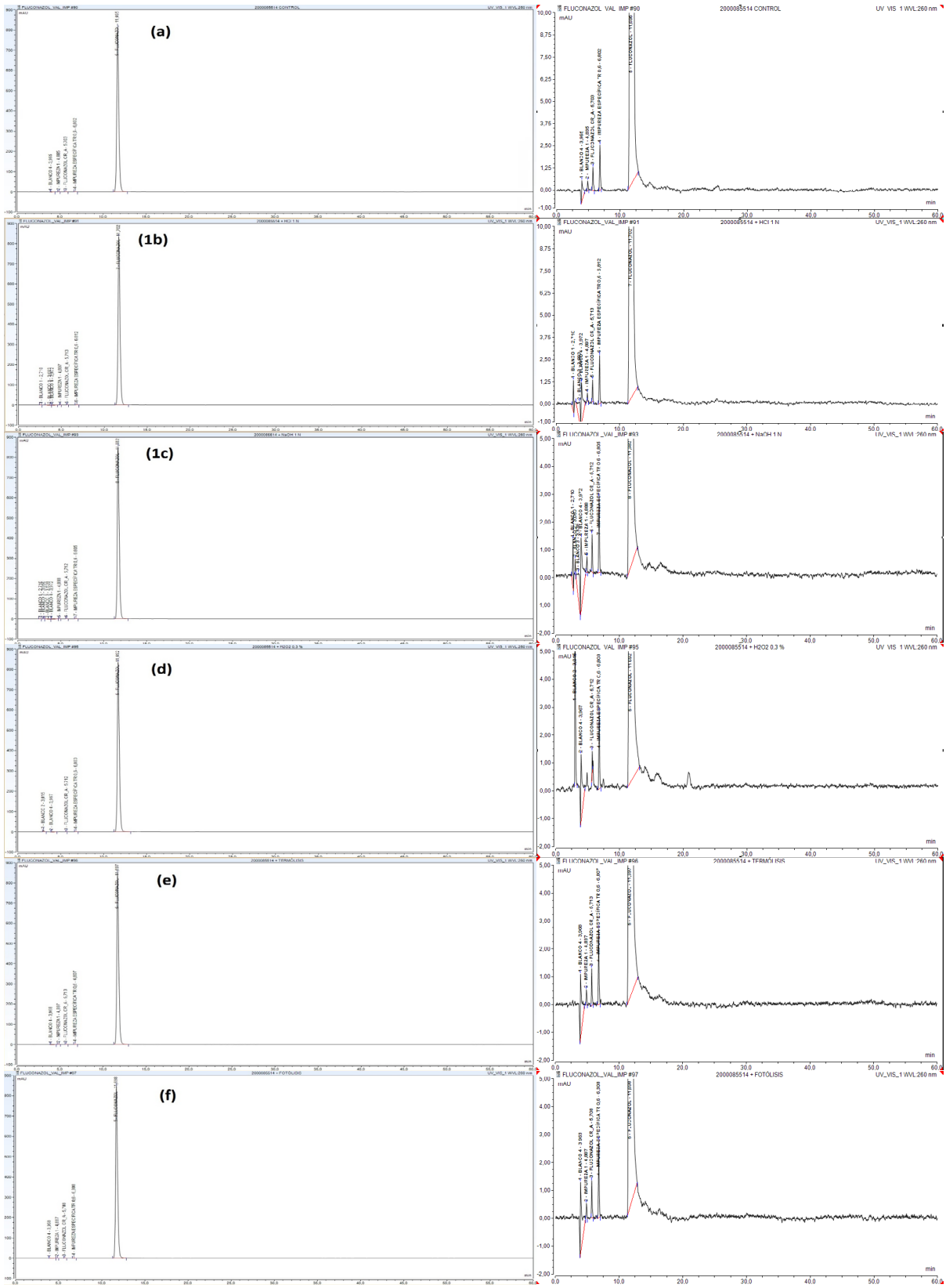


Figura 2. Las imágenes del lado izquierdo muestran los cromatogramas de fluconazol degradado por diferentes procesos: **(a)** muestra control de fluconazol (ingrediente farmacéutico activo), **(b)** hidrólisis ácida con 1,0 N de ácido clorhídrico, **(c)** hidrólisis básica con 1,0 N de hidróxido de sodio, **(d)** oxidación, **(e)** termólisis, **(f)** fotólisis. En el lado derecho se observan los mismos cromatogramas, pero a escala ampliada.

Cuadro 3. Resumen de los resultados de estabilidad en la solución estándar de valoración, la solución muestra de valoración y la solución estándar de impurezas orgánicas del fluconazol

Estándar de valoración				
Criterio de aceptación	**Condiciones**	**Correlación (%) 0 horas**	**Correlación (%) 24 horas**	**Recobro (%) 24 horas**
La correlación debe estar entre 98,0 y 102,0 %.	Ambiente	100,5	100,0	99,5
El recobro calculado entre la correlación promedio de la frecuencia evaluada y la correlación promedio inicial debe estar entre 98,0 y 102,0 %.	Refrigeración		100,1	99,6

Solución muestra				
Criterio de aceptación	**Condiciones**	**Contenido inicial (% ± RSD)**	**Contenido promedio (% ± RSD) 24 horas**	**Recobro (% ± RSD) 24 horas**
El RSD de las muestras en cada tiempo no es mayor de 2,0 %.	Ambiente	101,5 ± 0,1	100,9 ± 0,2	99,4
El recobro calculado entre el contenido promedio de la frecuencia evaluada y el contenido promedio inicial debe estar entre 98,0 y 102,0 %.	Refrigerado		100,6 ± 0,1	99,1

Estándar de impurezas orgánicas					
Criterio de aceptación	**Condiciones**	**Compuesto**	**Área 0 horas**	**Área 24 horas**	**Recobro (%) 24 horas**
El recobro calculado entre la correlación promedio de la frecuencia evaluada y la correlación promedio inicial debe estar entre 98,0 y 102,0 %.	Ambiente	fluconazol C.R. A	7,618685	7,632293	100,2
		fluconazol C.R. B	0,590195	0,580262	98,3
		fluconazol C.R. C	12,547291	12,540827	99,9
		fluconazol	0,652845	0,647447	99,2
	Refrigeración	fluconazol C.R. A	7,618685	7,624229	100,1
		fluconazol C.R. B	0,590195	0,587135	99,5
		fluconazol C.R. C	12,547291	12,506710	99,7
		fluconazol	0,652845	0,656819	100,6

RSD: desviación estándar relativa; C.R.: compuesto relacionado

Precisión para valorar y detectar impurezas orgánicas de fluconazol (repetibilidad del sistema, del método y precisión intermedia de fluconazol). La desviación estándar relativa de los resultados obtenidos de las seis réplicas realizadas no fue mayor del 2 % para la valoración y del 5 % para las impurezas orgánicas en la repetibilidad del sistema. En la valoración no se obtuvo una desviación estándar relativa mayor de 2 % entre los datos individuales por serie para la repetibilidad del método. Tampoco fue mayor del 3 % para la precisión intermedia (comparación entre el analista 1 y el analista 2). La diferencia absoluta entre las medias de los dos analistas no fue mayor del 2 % para la prueba de valoración (cuadro 5).

El coeficiente de variación entre los datos individuales por serie para la repetibilidad del método en las impurezas orgánicas, no fue mayor al establecido de acuerdo con la relación mencionada entre la concentración límite de impurezas y el límite de cuantificación: si la concentración límite de impurezas estaba entre 1 y 2 veces el límite de cuantificación, la desviación estándar relativa era menor o igual al 25 %; entre 2 y 10 veces el límite de cuantificación, la desviación estándar relativa era menor o igual al 15 %; entre 10 y 20 veces el límite de cuantificación, la desviación estándar relativa era menor o igual al 10 %; y si la concentración límite de impurezas superaba más de 20 veces el límite de cuantificación, la desviación estándar relativa era menor o igual al 5 %.

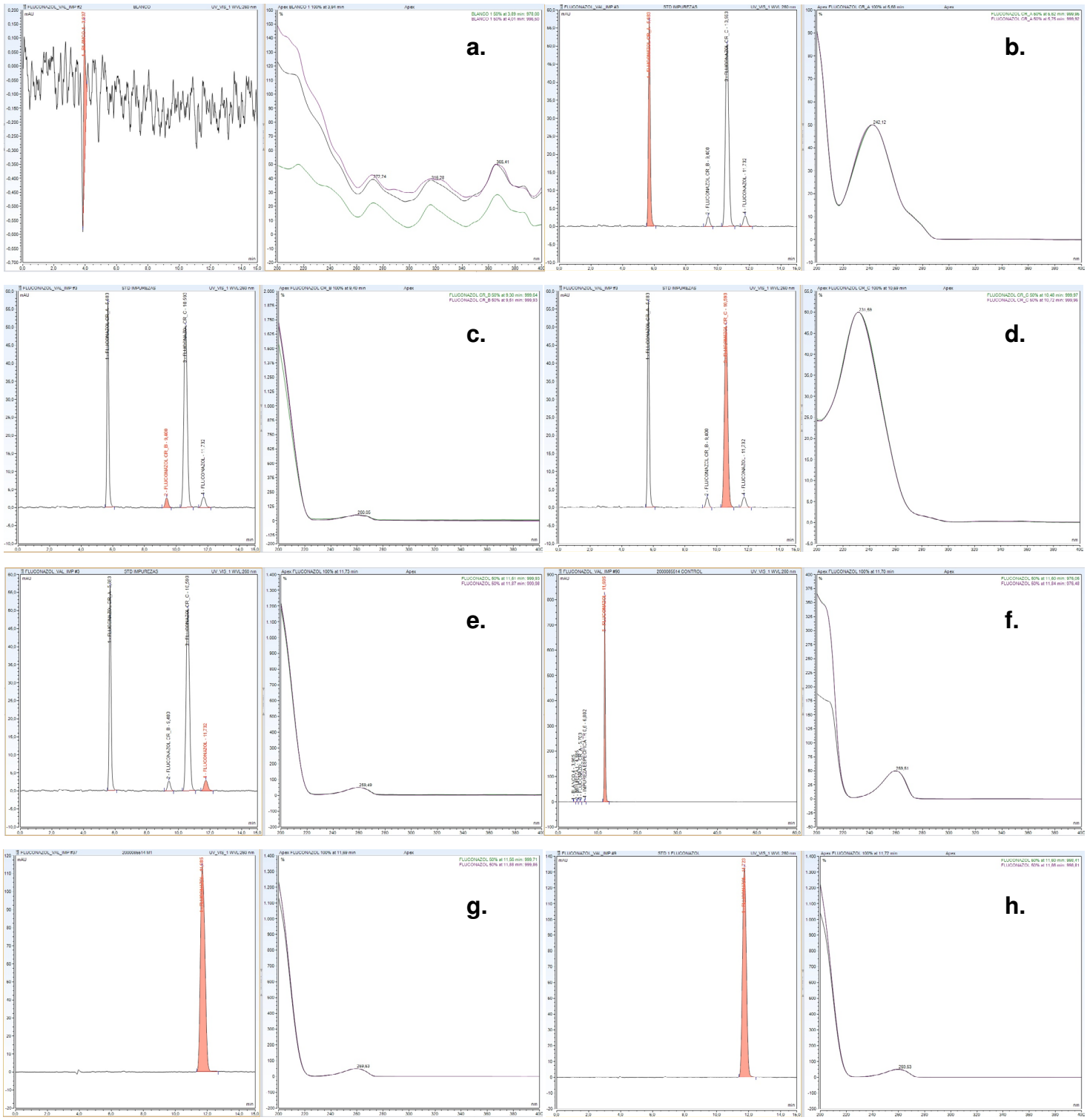


Figura 3. Perfiles cromatográficos de: **(a)** solución usada como blanco, **(b)** estándar de impurezas de fluconazol - compuesto relacionado A, **(c)** estándar de impurezas de fluconazol - compuesto relacionado B, **(d)** estándar de impurezas de fluconazol - compuesto relacionado C, **(e)** estándar de impurezas fluconazol, **(f)** muestra de impurezas de fluconazol, **(g)** estándar de valoración de fluconazol, **(h)** muestra de valoración de fluconazol

Cuadro 4. Resumen de los resultados de la linealidad del sistema en la valoración del fluconazol y la detección de sus impurezas orgánicas.

Criterio de aceptación	Valoración			Impurezas orgánicas			
				fluconazol			
				C.R. A	C.R. B	C.R. C	API
	Nivel (%)	Resultado (%)	Nivel (%)	Resultado (%)			
Pendiente		73,601		766,69	62,028	1262,3	69,315
r ≥ 0,999		0,99957		0,99991	0,99800	0,99995	0,99712
Evaluación del intercepto (ausencia de errores sistemáticos): La correlación entre el estándar y cada una de las inyecciones de los niveles evaluados, debe estar entre 98,0 y 102,0 % para la valoración, y entre 80,0 y 120,0 % para las impurezas orgánicas del fluconazol.	90	100,1	LQ	104,7	105,1	106,0	102,2
		100,5		105,6	104,2	109,8	100,9
		100,1		105,0	104,6	107,4	101,8
	100	100,2	100	102,6	102,4	105,7	98,1
		100,1		102,7	102,5	105,6	98,4
		100,1		103,0	100,5	105,6	100,0
	110	100,3	120	101,3	104,9	104,8	102,9
		100,2		101,5	103,2	105,4	102,8
		100,1		101,6	104,3	105,5	103,2
La dispersión aleatoria alrededor de la línea del cero ± 2,0 % para la valoración y ± 10,0 % para las impurezas orgánicas del fluconazol.	90	-0,3	LQ	-8,3	0,4	-3,0	1,5
		0,1		-7,5	-0,4	0,4	0,1
		0,1		-8,0	0,0	-1,7	1,0
	96	-0,1	90	0,6	2,1	-0,2	0,8
		0,0		0,2	0,9	0,1	-0,1
		0,4		0,8	1,0	0,2	1,6
	100	0,0	100	0,3	-1,5	0,0	-3,8
		-0,1		0,4	-1,5	-0,1	-3,5
		-0,1		0,7	-3,4	0,0	-2,0
	106	0,0	110	0,7	-0,7	1,1	0,9
		-0,5		-0,1	2,1	0,1	1,2
		0,1		-0,2	0,5	0,1	0,9
	110	0,2	120	-0,9	1,0	-0,8	0,6
		0,1		-0,8	-0,7	-0,2	0,5
		0,0		-0,6	0,4	-0,1	0,9

API: ingrediente farmacéutico activo; LQ: límite de cuantificación

Cuadro 5. Resumen de los resultados de la precisión del sistema en la valoración del fluconazol y la detección de sus impurezas orgánicas

Criterio de aceptación	Valoración		Impurezas orgánicas							
			Fluconazol							
			C.R. A		C.R. B		C.R. C		API	
			Resultado (%)							
RSD de la reproducibilidad del sistema ≤ 2,0 % para la valoración y ≤ 5,0 % para las impurezas orgánicas del fluconazol	**A1S1**	**A1S2**	**A1S1**	**A1S2**	**A1S1**	**A1S2**	**A1S1**	**A1S2**	**A1S1**	**A1S2**
	0,2	0,2	0,3	1,1	3,0	3,3	0,3	0,7	3,0	3,5
	A2S1	**A2S2**	**A2S1**	**A2S2**	**A2S1**	**A2S2**	**A2S1**	**A2S2**	**A2S1**	**A2S2**
	1,9	0,1	0,2	0,6	3,2	4,9	0,6	0,9	4,2	4,8
RSD de la reproducibilidad del método ≤ 2,0 % para la valoración y ≤ 5,0 % para las impurezas orgánicas del fluconazol (para el fluconazol y el fluconazol C.R. B ≤ 25,0 %)	**A1S1**	**A1S2**	**A1S1**	**A1S2**	**A1S1**	**A1S2**	**A1S1**	**A1S2**	**A1S1**	**A1S2**
	0,3	0,4	0,4	0,8	1,4	1,3	0,5	1,0	1,2	0,8
	A2S1	**A2S2**	**A2S1**	**A2S2**	**A2S1**	**A2S2**	**A2S1**	**A2S2**	**A2S1**	**A2S2**
	0,5	0,5	0,4	0,9	0,9	1,3	4,3	1,0	1,7	1,0
RSD de la precisión intermedia ≤3,0 % para la valoración y ≤10,0 % para las impurezas orgánicas del fluconazol (para el fluconazol y fluconazol C.R. B ≤ 30,0 %)	0,8		1,5		1,8		1,9		1,7	
La diferencia absoluta entre las medias de los dos analistas debe ser ≤ 2,0 % para la valoración y ≤ 10,0 % para las impurezas orgánicas del fluconazol.	Promedio A1									
	99,7		101,3		100,3		99,9		99,5	
	Promedio A2									
	100,9		100,6		102,1		101,5		98,2	
	Diferencia absoluta									
	1,2		0,7		1,8		1,6		1,3	

RSD: desviación estándar relativa; A1: analista 1; A2: analista 2; S1: serie 1; S2: serie 2

La precisión intermedia no fue mayor del 3 % (comparación entre el analista 1 y el analista 2). El coeficiente de variación entre series (precisión intermedia) no fue mayor del establecido según la relación entre la concentración límite de impurezas y el límite de cuantificación: si la concentración límite de impurezas estaba entre 1 y 2 veces el límite de cuantificación, la desviación estándar relativa era menor o igual al 30 %; entre 2 y 10 veces el límite de cuantificación, la desviación estándar relativa era menor o igual al 20 %; entre 10 y 20 veces el límite de cuantificación, la desviación estándar relativa era menor o igual al 15 %; y si la concentración límite de impurezas superaba más de 20 veces el límite de cuantificación, la desviación estándar relativa era menor o igual al 10 %. La diferencia absoluta entre las medias de los dos analistas no fue mayor del 10 % para la prueba de impurezas orgánicas (cuadro 5).

Solidez (*robustness*). La precisión intermedia formalmente conocida como solidez (*robustness*), estuvo dentro de los parámetros establecidos para las pruebas de valoración e impurezas orgánicas del fluconazol (cuadro 5). Estos parámetros, según indicaciones de la Conferencia Internacional de Armonización, se tomaron en el mismo laboratorio, pero en días, con analistas y con equipos diferentes (14), en búsqueda de la coincidencia de los resultados.

Discusión

Las soluciones presentaron estabilidad a temperatura ambiente y de refrigeración a las 24 horas, cumpliendo los parámetros de idoneidad. En la estandarización de la metodología, se obtuvo gran eficiencia del filtro hidrofílico de PVDF de 0,45 µm, ya que este no presentó retención del analito, ni tampoco generó señales adicionales que pudieran interferir al momento de cuantificar e identificar los analitos.

De acuerdo con los resultados obtenidos en las pruebas de degradación forzada, se confirmó que el método es específico y selectivo, y por lo tanto, permite la identificación inequívoca de los analitos de interés. Todos los resultados de las degradaciones se encontraron dentro del límite permitido. Además, se confirmó la naturaleza química estable del analito sometido a condiciones de estrés por hidrólisis ácida, hidrólisis básica, oxidación, termólisis y fotólisis, de manera que este parámetro también indica estabilidad de las soluciones.

La pureza espectral del analito de interés se demostró en todas las muestras sometidas a degradación forzada, ya que se obtuvieron valores de *factor match (software Chromeleon)* cercanos a 1.000. Asimismo, los reactivos usados para la prueba no interfirieron al momento de emplear el método.

La gran estabilidad de la molécula de fluconazol puede deberse a sus propiedades fisicoquímicas: tiene un peso molecular de 306,27 g/mol, una carga formal de cero, un área de superficie polar de 81,6 Å² que facilita la permeación de la molécula en las membranas celulares y que actúe sobre los receptores del sistema nervioso central (22); un punto de ebullición de 579,8 °C, un punto de fusión entre 138 y 140 °C y un pKa igual a 1,76 (1).

La prueba de estabilidad demostró que la solución estándar de valoración, la solución muestra de valoración y la solución estándar de impurezas para los compuestos relacionados A, B y C, y fluconazol (materia prima), son estables a temperatura ambiente y en refrigeración (2-8 °C) durante 24 horas. La recuperación de las soluciones no se vio afectada a las 24 horas, ni el contenido

inicial (manteniendo el contenido promedio), al igual que la desviación estándar relativa entre los diferentes contenidos de las muestras (cuadro 3).

En la validación de la metodología, se demostró la especificidad del método (figura 3, a-h). Ningún pico del diluyente interfirió en la identificación y la cuantificación de los compuestos relacionados A, B y C, y el fluconazol (materia prima). El método es selectivo y los reactivos usados para la prueba no obstaculizan su aplicación. Se demostró la linealidad del sistema para fluconazol en las pruebas de valoración y para los compuestos relacionados A, B y C, y fluconazol (materia prima) en las impurezas orgánicas. Los gráficos de los residuos mostraron una dispersión aleatoria alrededor de la línea cero para la valoración del ingrediente farmacéutico activo y las impurezas orgánicas del fluconazol no mostraron un patrón. La evaluación del intercepto y la ausencia de error sistemático presentaron una correlación entre el estándar y cada una de las inyecciones de los niveles evaluados para la valoración del ingrediente farmacéutico activo y las impurezas orgánicas del fluconazol (cuadro 4).

El método es exacto para el fin propuesto porque los porcentajes de recuperación de la prueba de valoración están dentro del rango establecido, así como aquellos de los compuestos relacionados A, B y C, y el fluconazol (materia prima) obtenidos en la prueba de impurezas orgánicas. La desviación estándar relativa entre los contenidos de las determinaciones de cada nivel fue menor del 2 %, tanto para la valoración como para las impurezas orgánicas.

Se demostró la precisión de las pruebas a partir de la repetibilidad y la reproducibilidad del método para la cuantificación del fluconazol –y los compuestos relacionados– en la valoración y en las impurezas orgánicas. La metodología evaluada fue precisa ya que la repetibilidad del sistema no superó una desviación estándar relativa del 2 % en la valoración y del 5 %, en las impurezas orgánicas. En la repetibilidad del método, se obtuvo una desviación estándar relativa inferior al 2 % en la valoración e inferior al 5 % para el compuesto relacionado A y C, mientras que, para el compuesto relacionado B y el fluconazol (materia prima), la repetibilidad del método tuvo una desviación estándar relativa inferior al 25,0 %. En la precisión intermedia, se obtuvo una desviación estándar relativa menor del 3 % en la valoración; y menor del 10 % para los compuestos relacionados A y C, e inferior al 30 % para el fluconazol compuesto relacionado B y el fluconazol (materia prima), en la detección de impurezas.

La diferencia absoluta entre las medias de los dos analistas fue menor del 2 % en la valoración y menor del 10 % en las impurezas orgánicas (cuadro 5). La metodología usada es lo suficientemente robusta al no verse afectada por variaciones pequeñas, aunque deliberadas, lo que indica su aptitud en condiciones normales de uso.

En este trabajo se desarrolló el método de análisis por HPLC-DAD de la materia prima fluconazol (ingrediente farmacéutico activo). Se estableció un tiempo total de la corrida cromatográfica por inyección de 15 minutos, que es un tiempo de respuesta rápido anclado a una mayor eficiencia de los equipos y un impacto ambiental más bajo al generar menos desechos de reactivos contaminantes. Se establecieron los rangos probables de tiempo de retención para cada uno de los picos de interés del fármaco, así: fluconazol compuesto relacionado A: 5,4 a 5,8 minutos; fluconazol compuesto relacionado B: 8,8 a 9,7 minutos; fluconazol compuesto relacionado C: 9,6 a 10,9 minutos; y fluconazol (materia prima): 10,8 a 12,4 minutos.

En la prueba de valoración, fue posible cuantificar fluconazol con precisión en un rango de 0,45 a 0,55 mg/ml, respecto a la concentración analítica de trabajo (0,50 mg/ml), con una exactitud de 100 % ± 2,0 % y una precisión menor o igual al 2 % del valor notificado. En la detección de impurezas orgánicas, se realizó la cuantificación precisa del fluconazol en un rango de 5,85 a 12,0 µg/ml; para el compuesto relacionado A, en un rango de 0,25 a 12,0 µg/ml; para el B, en un rango de 5,50 a 12,0 µg/ml; y para el C, en un rango de 0,30 a 12,0 µg/ml, respecto a la concentración analítica de trabajo (10,0 µg/ml), con una exactitud del 100 % ± 20 % y una precisión menor del 10 % del valor notificado.

Se validó la metodología por HPLC-DAD en fase inversa para la valoración, la identificación y la cuantificación de las impurezas orgánicas especificas e inespecíficas del fluconazol en materia prima. Asimismo, se proporcionaron los parámetros por evaluar y los criterios de aceptación, con los cuales se demostró que el método proporciona resultados analíticos veraces en condiciones de uso reales en un clima tropical, y valores exactos y reproducibles dentro del rango determinado. Además, se probó que el método validado es lo suficientemente selectivo y estable en las variaciones propuestas.

Agradecimientos

A la empresa privada, la cual apoyó con los recursos técnicos para la realización de este trabajo y a las personas que contribuyeron con su apoyo.

Referencias

1. PubChem. Fluconazole. Fecha de consulta: 12 de agosto de 2022. Disponible en: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3365
2. Tapia C. Mechanisms of action, adverse reactions and new antifungal agents. Medwave. 2005;5:e3548 https://doi.org/10.5867/medwave.2005.04.3548
3. Moncada DC, Montes M, Molina V, Velásquez JB, Gómez CI. Infección orofacial por *Conidiobolus coronatus* reporte de caso. Biomédica. 2016;36:15-22. https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2806
4. Rojas AE, Pérez JE, Hernández JS, Zapata Y. Análisis cuantitativo de la expresión de genes de resistencia a fluconazol en cepas de *Candida albicans* aisladas al ingreso de adultos mayores a una unidad de cuidados intensivos de Manizales, Colombia. Biomédica. 2020;40:153-65. https://doi.org/10.7705/biomedica.4723
5. Cortés JA, Ruiz JF, Melgarejo-Moreno LN, Lemos EV. Candidemia in Colombia. Biomédica. 2020;40:195-207. https://doi.org/10.7705/biomedica.4400
6. Nocua-Báez LC, Uribe-Jerez P, Tarazona-Guaranga L, Robles R, Cortés JA. Azoles de antes y ahora: una revisión. Rev Chil Infectol. 2020;37:219-30. https://doi.org/10.4067/s0716-10182020000300219
7. Sánchez-Hoyos F, Cárdenas A, Mercado-Camargo J, Domínguez-Moré G, Gómez-Estrada H. Validación de una metodología analítica USP por HPLC para la cuantificación de warfarina sódica en tabletas. Rev Colomb Cienc Quim Farm. 2016;45:470-83. https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v45n3.62053
8. Samaniego JJ, Arias-Arroyo G. Desarrollo y validación de una metodología analítica por HPLC para la cuantificación simultánea de fenilefrina clorhidrato, paracetamol, salicilamida, cafeína y clorfeniramina maleato en tabletas. Rev Soc Quím Perú. 2016;82:196-207. Fecha de consulta: 12 de agosto de 2022. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2016000200010&lng=es&tlng=es
9. Romero-Díaz JA, Nuva-Paz L, López M, Ferrada C, Carballo C. Validación de una técnica por cromatografía líquida de alta resolución para la determinación del contenido de Mangiferina en hojas de *Mangifera indica* L. Rev Cuba Plantas Med. 2014;19:167-78.

10. Ulate-Molina R, Borbón-Alpízar H, Sibaja-Brenes JP, Vega-Guzmán I, Arguedas-González M. Validación de un método de detección mediante cromatografía líquida (HPLC-DAD) para la determinación de aloína en productos alimenticios elaborados a partir de sábila (*Aloe vera*). Uniciencia. 2019;33:13-26. https://doi.org/10.15359/ru.33-2.2

11. Sarria R, Campo V, Gallo J, Muñoz V. Validación de un método para el análisis de cocaína en muestras de orina empleando extracción en fase sólida (SPE) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Rev Cienc. 2018;21:81. https://doi.org/10.25100/rc.v21i1.6350

12. Bustillo P, Daza ML, Sierra-Martínez N. Validación de una metodología por HPLC en fase inversa para la determinación de Candesartan Cilexetil en tabletas recubiertas. Rev Colomb Cienc Quím Farm. 2014;43:55-68. https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v43n1.45464

13. Unite States Pharmacopeia. USP Monographs, fluconazole. Fecha de consulta: 21 de marzo de 2022. Disponible en: https://doi.org/10.31003/USPNF_M33240_03_01

14. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Fecha de consulta: 12 de agosto de 2022. Disponible en: https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf

15. Organización Panamericana de la Salud. Buenas prácticas de la OMS para laboratorios de control de calidad de productos farmacéuticos. Fecha de consulta: 12 de agosto de 2022. Disponible en: https://www.paho.org/es/node/44617

16. Unite States Food and Drug Administration. Bioanalytical method validation. Fecha de consulta: 12 de agosto de 2022. Disponible en: https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf

17. Unite States Pharmacopeia. U.S. Pharmacopeial Convention. 1225 Validation of compendial procedures. Fecha de consulta: 21 de marzo de 2022. Disponible en: https://doi.org/10.31003/USPNF_M99945_04_01

18. PubChem. 1,3-Di(1H-1,2,4-triazol-1-yl)benzene. Nih.gov. Fecha de consulta: 12 de agosto de 2022. Disponible en: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1_3-Di_1H-1_2_4-triazol-1-yl_benzene

19. PubChem. 2-(4-fluorophenyl)-1,3-bis(1H-1,2,4-triazol-1-yl)propan-2-ol. Nih.gov. Fecha de consulta: 12 de agosto de 2022. Disponible en: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/134034

20. PubChem. 4-Defluoro-4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl) fluconazole. Nih.gov. Fecha de consulta: 12 de agosto de 2022. Disponible en: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11624578

21. United States Pharmacopeia. U.S. Pharmacopeial Convention. (621) Chromatography. Fecha de consulta: 12 de agosto de 2022. Disponible en: https://doi.org/10.31003/USPNF_M99380_01_01

22. Hitchcock SA, Pennington LD. Structure-brain exposure relationships. J Med Chem. 2006;49:7559-7583. https://doi.org/10.1021/jm060642i

Biomédica 2023;43(Supl.1):245-54
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.6900

Artículo original

Brote de *tinea capitis* y otras micosis superficiales en una comunidad urbana de Medellín

Nelson Andrés Sterling[1], Dubán Andrés Rincón[1], Sebastián Barrera[2], Erika Andrea Sánchez[2], Diana Yuledi Molina[2], Martha Eugenia Urán[2], María del Pilar Jiménez[2]

[1] Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia
[2] Grupo Micología Médica, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Introducción. Las dermatofitosis son infecciones fúngicas superficiales de epitelios queratinizados. La *tinea capitis* es una de ellas y afecta a poblaciones escolares vulnerables. Carpinelo es un barrio del área periférica de Medellín con precarias condiciones socioeconómicas. Ante la sospecha de un brote de dermatofitosis, los afectados fueron evaluados.
Objetivo. Evaluar clínica y microbiológicamente pacientes del barrio Carpinelo con sospecha de micosis cutáneas para determinar la presencia de un brote por dermatofitos.
Materiales y métodos. Se llevó a cabo un estudio descriptivo, de corte longitudinal, con muestreo a conveniencia. Se hizo una búsqueda activa de casos en el Jardín Educativo Buen Comienzo de Carpinelo en niños de la institución y sus familiares. Se evaluaron clínicamente y se tomaron muestras de escamas y cabellos para exámenes directos y cultivos microbiológicos. Se analizó el perfil demográfico, clínico y micológico, con el programa estadístico SPSS™, versión 25.
Resultados. Se estudiaron 57 pacientes, 47 eran menores de edad con una media de edad de seis años; se observó una proporción de hombres y mujeres de 2:1. Los pacientes con resultados positivos se diagnosticaron con *tinea capitis* (78,95 %), *tinea faciei* (15,79 %) y *tinea corporis* (10,52 %). El 75,43 % de los pacientes recibió tratamiento previo y de estos el 69,73 % fue con esteroides. El examen directo fue positivo en el 53,84 % y los cultivos en el 46,5 % de los casos. Los agentes aislados fueron: *Microsporum canis* (77,77 %), *Trichophyton* spp. (11,11 %), *Trichophyton rubrum* (5,55 %) y *Malassezia* spp. (5,55 %).
Conclusión. *Tinea capitis* fue la presentación clínica más común y *M. canis* el dermatofito más frecuentemente aislado. Llamó la atención el uso de esteroides como primera y única opción del tratamiento empírico, lo cual resalta la importancia del diagnóstico microbiológico para proporcionar la terapia apropiada.

Palabras clave: dermatomicosis; tiña; tiña del cuero cabelludo; brotes de enfermedades.

***Tinea capitis* outbreak and other superficial mycosis in an urban community of Medellín**

Introduction. Dermatophytoses are superficial fungal infections of the keratinized epithelium like *tinea capitis.* The latte mainly affects school-vulnerable populations. Carpinelo is a peripheral neighborhood in Medellín with poor socioeconomic conditions and where a suspected *tinea capitis* outbreak took place.
Objective. To study and characterize, clinically and microbiologically, patients with suspected dermatophytosis in Carpinelo.
Material and methods. We carried out a descriptive and longitudinal study with an active case search of *tinea capitis* in children and their relatives from the *Jardín Educativo Buen Comienzo* community in Carpinelo. Patients were clinically evaluated, and samples of scales and hair were taken to perform mycological studies with a 10 % potassium hydroxide and culture in Sabouraud and Mycosel agar. We analyzed the data with the statistical program SPSS™. 25 version.
Results. Fifty-seven individuals were studied: 47 were children with a mean age of six years and a ratio of 2:1 male to female. Patients with confirmed diagnosis presented the following clinical forms: *tinea capitis* (78.95%), *tinea faciei* (15.79%) or *tinea corporis* (10.52%). Out of the total, 69.76% of the patients had previous treatment with steroids. The direct test was positive in 53.84% of the samples, and 46.15% had positive cultures. The isolated species were: *Microsporum canis* (77.77%), *Trichophyton* spp. (11.11%), *Trichophyton rubrum* (5.55%), and *Malassezia* spp. (5.55 %).
Conclusion. *Tinea capitis* was the most common clinical form, and *M. canis* was the most frequently isolated species. The use of steroids as the first and only option for empiric treatment was worth of notice. The findings of this study point out the importance of microbiological diagnosis in choosing the best treatment for the patients.

Key words: Dermatomycoses; tinea; *tinea capitis*; disease outbreaks.

Recibido: 21/03/2023
Aceptado: 24/07/2023
Publicado: 25/07/2023

Citación:
Sterling NA, Rincón DA, Barrera S, Estrada M, Sánchez EA, TorresS, *et al.* Brote de *tinea capitis* y otras micosis superficiales en una comunidad urbana de Medellín. Biomédica. 2023;43(Supl.1):245-54. https://doi.org/10.7705/biomedica.6900

Correspondencia:
María del Pilar Jiménez, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Carrera 51 D N°62-29, laboratorio 218, Medellín, Colombia
Teléfonos: (604) 219 6053 y (313) 647 4333; fax: (604) 219 6051
delpilar.jimenez@udea.edu.co

Contribución de los autores:
Nelson Andrés Sterling y Dubán Andrés Rincón: identificación del brote de micosis, diligenciamiento del consentimiento informado, recolección de datos y escritura del manuscrito
Sebastián Barrera: evaluación clínica de los pacientes y escritura del manuscrito
Mateo Estrada: diligenciamiento del consentimiento informado, recolección de datos y evaluación clínica de los pacientes
Erika Andrea Sánchez, Susana Torres, Diana Yuledi Molina, Martha Eugenia Urán: toma, procesamiento y evaluación de las muestras de los pacientes y escritura del manuscrito
María del Pilar Jiménez: evaluación clínica y análisis de resultados de laboratorio, prescripción del tratamiento, seguimiento a los pacientes y escritura del manuscrito

Financiación:
El estudio no tuvo financiación externa.

Conflicto de intereses:
Los autores manifiestan que no tienen conflicto de intereses que impidan la publicación del artículo.

Los dermatofitos son hongos filamentosos, hialinos, tabicados, queratinofílicos, con capacidad de invadir tejidos queratinizados derivados de la epidermis y generar infecciones en la piel, el cabello y las uñas. Son causantes de algunas de las enfermedades infecciosas más frecuentes en el hombre (1) con una amplia gama de cuadros clínicos según su lugar de aparición, y con un espectro clínico que va desde manifestaciones leves hasta lesiones inflamatorias (1,2).

Las infecciones producidas por este grupo de hongos son generalmente superficiales y afectan principalmente el estrato córneo de la piel (3). Estos hongos se pueden clasificar en función de sus hábitats naturales como antropofílicos, zoofílicos y geofílicos, y su origen se condiciona según la epidemiología y la clínica de las lesiones que producen (3).

Entre los factores de riesgo descritos para estas infecciones encontramos el contacto con animales o personas infectadas, o con fómites, como se ha descrito en brotes estudiados en centros de cuidado infantil y en escuelas (4,5).

En este estudio se describen las características clínicas y microbiológicas de un brote de micosis superficiales en una comunidad con condiciones socioeconómicas bajas en el barrio Carpinelo de Medellín entre septiembre y diciembre del 2018.

Materiales y métodos

Se llevó a cabo un estudio descriptivo, de corte longitudinal, con un muestreo a conveniencia. Se adelantó una búsqueda activa de casos en el Jardín Educativo Buen Comienzo de la Alcaldía de Medellín del barrio Carpinelo, comuna uno de Medellín. Se evaluaron 57 pacientes. Los 57 pacientes estaban conformados por 47 menores de edad, 8 adultos que trabajaban en el jardín infantil –dos profesoras, un auxiliar de cuidado, una persona de servicios generales, una persona en oficios varios, un constructor y dos madres de los niños del jardín infantil– y 2 mascotas cuyos propietarios eran familias de los niños que asistían al jardín infantil.

Se realizaron dos jornadas de salud en dos días diferentes, llevados a cabo por estudiantes de la Facultad de Medicina, médicos, profesores y personal adscrito al Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia.

A los pacientes con sospechas de micosis cutáneas se les explicó en qué consistía el procedimiento del examen clínico y la toma de muestras para la evaluación microbiológica.

Los adultos responsables de los menores de edad diligenciaron y firmaron el consentimiento informado, aprobado para este fin, por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia. La recolección de los datos demográficos y epidemiológicos se realizó mediante el diligenciamiento de formularios estructurados.

Para la evaluación médica durante la brigada se seleccionaron los individuos con lesiones características de las micosis superficiales en cualquier parte del cuerpo, que tuviesen forma de placas descamativas con borde eritematoso, con vesículas o sin ellas, con costras o sin ellas, con centro limpio o sin él, y con máculas o manchas hipocrómicas o hipercrómicas; en el cuero cabelludo se buscaron lesiones en forma de placa, descamativas, alopécicas o no, con bordes eritematosos, con costras o sin

ellas y con foliculitis o sin ella. Después de hacer esta selección se encontró que 57 pacientes presentaban una o varias de estas lesiones.

Se procedió a la evaluación clínica y al diligenciamiento de los formatos que permitían recolectar la información sociodemográfica, la historia clínica, los antecedentes personales y los tratamientos previos. Luego, se procedió a la toma de muestras de escamas mediante raspado con bisturí número 15 o 20 y a la obtención de cabellos de las lesiones de piel y anexos.

Para practicar el examen directo, las muestras se procesaron con hidróxido de potasio al 10 % y se tiñeron con azul de Evans o tinción de Gram. Se observaron al microscopio y se hizo la descripción morfológica de las estructuras fúngicas y bacterianas en los casos en los que se visualizaron.

Se sembraron muestras pareadas para cultivo en agar de Sabouraud y Mycosel™, excepto en los casos con sospecha de pitiriasis versicolor, cuando las muestras se sembraron en agar Dixon. Los medios sembrados se incubaron a temperatura ambiente durante 30 días y se analizaron periódicamente cada ocho días. En caso de no observar crecimiento en este tiempo, las muestras se cultivaron por 20 o 30 días más, solo en los casos en los que persistía sospecha de infección por dermatofito dado los resultados positivos del examen físico y el examen directo; las otras muestras se consideraron negativas a los 30 días.

Para la confirmación del agente etiológico, se realizó examen directo a las colonias, previa tinción con azul de lactofenol. A las muestras con crecimiento sugestivo de dermatofitos y sin esporulación, se les realizó una nueva siembra en agar arroz y agar papa-dextrosa. Se incubaron durante 10 días (o 20 días en algunos casos) a temperatura ambiente. Posterior a esto, se realizó una nueva placa con azul de lactofenol para observar las estructuras que permitieran la confirmación del respectivo género y especie.

En los casos en los que se observó crecimiento de colonias sugestivas de *Trichophyton* spp. en los medios de Mycosel™ y Sabouraud, se realizó la caracterización de la especie de dermatofito mediante su cultivo en agar lactosa púrpura de bromocresol, agar papa-dextrosa, urea y agar T1 (medio basal sin vitaminas) y T4 (medio con tiamina) durante ocho días.

El análisis estadístico descriptivo se hizo utilizando el programa IBM SPSS Statistics™, versión 25. Se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para determinar la normalidad de las variables cuantitativas. Se comparó el valor de las medianas mediante la prueba de Mann-Whitney cuando las variables no tuvieron una distribución normal. Las asociaciones entre las variables cualitativas se analizaron mediante la prueba de ji al cuadrado (c^2). El nivel de significancia estadística adoptado fue del 5 % ($p<0,05$).

Resultados

Se estudiaron 57 pacientes de la localidad de Carpinelo con sospecha clínica de dermatofitosis: 47 menores de edad, 8 adultos y 2 mascotas. Se tomaron 118 muestras, entre escamas (88) y cabellos (30), de 88 lesiones. De los 57 pacientes evaluados, 38 tuvieron resultados negativos en los exámenes de laboratorio. Los exámenes directos y los cultivos de las dos mascotas fueron negativos a pesar de presentar lesiones clínicamente compatibles con un proceso infeccioso de etiología fúngica. Sólo en dos de los ocho pacientes adultos, con lesiones sugestivas de micosis superficiales, se logró confirmar el

diagnóstico por resultados de laboratorio, mientras que 30 de los 47 menores tuvieron resultados negativos en los exámenes directos de los cultivos de escamas y de cabellos. En resumen, los resultados de los exámenes de laboratorio permitieron confirmar la etiología fúngica de las micosis superficiales en 19 de los 57 pacientes, con un total de 39 muestras positivas.

Los rangos de edad en los 47 menores de edad evaluados oscilaron entre los 7 meses y los 16 años, con una media de edad de 6 años y una proporción entre hombres y mujeres de 2:1 (cuadro 1).

Se indagó con los pacientes o con los adultos responsables del cuidado de los menores, por la posible exposición a factores de riesgo como contacto con mascotas (perros, gatos o ambos), fómites, actividades o juego con tierra, visitas a barberías o contacto con personas que presentaran lesiones compatibles con una dermatofitosis. Se encontró que el 80,71 % (n=47) de los pacientes con sospecha clínica había estado expuesto a algún factor de riesgo, mientras que el 42,11 % (n=24) refirió haber estado expuesto a tres o más factores de riesgo (figura 1).

Cuando se les preguntó a los pacientes por tratamientos previos durante la evolución de la enfermedad, el 75,43 % (n=43) manifestó haber usado algún tratamiento previo a la evaluación clínica y a la toma de la muestra (cuadro 2). El uso de esteroides fue el tratamiento más frecuentemente usado por el 69,76 % (n=30) de los pacientes: solos en el 37,2 % (n=16) o en combinación con antimicóticos y antibióticos en el 32,55 % (n=14) (cuadro 3). De los pacientes con diagnóstico confirmado, el 94,73 % (n=18) refirió tratamiento previo con antimicóticos, mientras que el 77,77 % (n=14) se había tratado previamente con esteroides solos o en combinación. En cuanto al uso de antimicóticos, la mayoría de los pacientes reportó su uso tópico: solo en el 13,95 % (n=6) o en combinación con esteroides y/antibióticos en el 32,55 % (n=14).

Cuadro 1. Distribución por sexo y edad de los pacientes atendidos en la brigada de salud en el jardín infantil Buen Comienzo de la localidad de Carpinelo, Medellín, septiembre del 2018

Edad (años)	Femenino (n)	Masculino (n)	Total [n (%)]
Menores de edad			
<2	0	1	1 (1,75)
2-5	11	17	28 (49,12)
6-11	6	8	14 (24,56)
12-16	0	4	4 (7,02)
Total	**17**	**30**	**47 (82,45)**
Adultos			
22	1	0	1 (1,75)
25	1	0	1 (1,75)
30	1	0	1 (1,75)
33	1	0	1 (1,75)
34	1	0	1 (1,75)
39	1	0	1 (1,75)
42	1	0	1 (1,75)
58	0	1	1 (1,75)
Total	**7**	**1**	**8 (14,04)**
Mascotas			
<2	0	1	1 (1,75)
2-5	0	0	0
6-11	1	0	1 (1,75)
Total	**1**	**1**	**2 (3,51)**

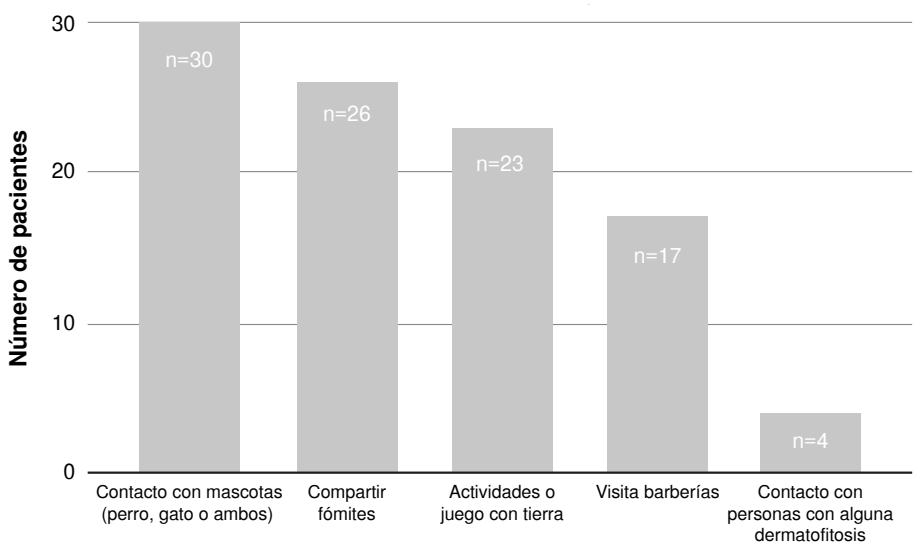


Figura 1. Factores de riesgo en los pacientes evaluados

Cuadro 2. Distribución de los pacientes según la exposición a tratamientos previos a la evaluación clínica y a la toma de las muestras para los exámenes de laboratorio

	Confirmación diagnóstica de micosis superficiales		
Tratamiento previo	**Negativo n (%)**	**Positivo n (%)**	**Total n (%)**
Si	25 (43,85)	18 (31,57)	43 (75,43)
No	2 (3,50)	1 (1,75)	3 (5,26)
Sin información	11 (19,29)	0	11 (19,29)
Total	38 (66,66)	19 (33,33)	57 (100)

Cuadro 3. Tratamientos previos a la evaluación clínica y microbiológica

	Confirmación de diagnóstico de micosis cutánea		
Tratamiento previo	**Negativo n**	**Positivo n**	**Total n**
Esteroides	8	8	**16**
Antimicóticos	3	3	6
Antibióticos	2	0	2
Esteroides más antimicóticos	6	3	**9**
Esteroides más antimicóticos más antibióticos	2	3	**5**
Tratamientos caseros	4	0	4
Queratinolíticos	1	0	1
Total	**26**	**17**	**43**

* Tratamientos caseros: vinagre, vaselina, hipoclorito de sodio diluido o ajo

De los pacientes con resultados positivos en los exámenes de laboratorio, el 16,66 % (n=3) usó antimicóticos solos y el 33,33 % (n=6) los usó en combinación con esteroides o antibióticos. Nueve (50 %) pacientes con diagnóstico confirmado usó antimicóticos antes de la evaluación clínica y microbiológica (cuadro 3). Sin embargo, tres pacientes con diagnóstico confirmado de querion de Celso, *tinea capitis* o pitiriasis versicolor, tomaron fluconazol oral por periodos mayores a un mes y medio o más (antes de la evaluación clínica y microbiológica), pero no presentaron mejoría de sus cuadros clínicos.

De las presentaciones clínicas encontradas en los pacientes con diagnóstico de micosis confirmado, la *tinea capitis* fue la más común en el 78,95 % (n=15) de los casos, dos pacientes presentaron querion de Celso (10,52 %), tres

presentaron *tinea faciei* (15,79 %) y dos tenían *tinea corporis* (10,52 %). En dos (10,52 %) pacientes se confirmó el diagnóstico de pitiriasis versicolor (figura 2).

En el examen físico se hallaron adenomegalias en el 35,9 % (n=14) de los pacientes, localizadas principalmente en la región cervical. Las características más comunes de las lesiones, en las diferentes formas clínicas, fueron descamación y eritema. En la figura 3 se presentan las características de las lesiones en los pacientes con diagnóstico confirmado de *tinea capitis*.

En el examen directo con hidróxido de potasio al 10 % y azul de Evans, se observaron estructuras fúngicas (hifas hialinas septadas o tabicadas artroconidias) en el 36,84 % (n=7), invasión de cabellos en el 57,89 % (n=11) y blastoconidias unigemantes en el 10,52 % (n=2). De las 18 muestras con crecimiento de cultivo se aisló *M. canis* en el 77,77 % (n=14), *T. rubrum* en el 5,55 % (n=1), *Trichophyton* spp. en el 11,11 % (n=2) y *Malassezia* spp. en el 5,55 % (n=1).

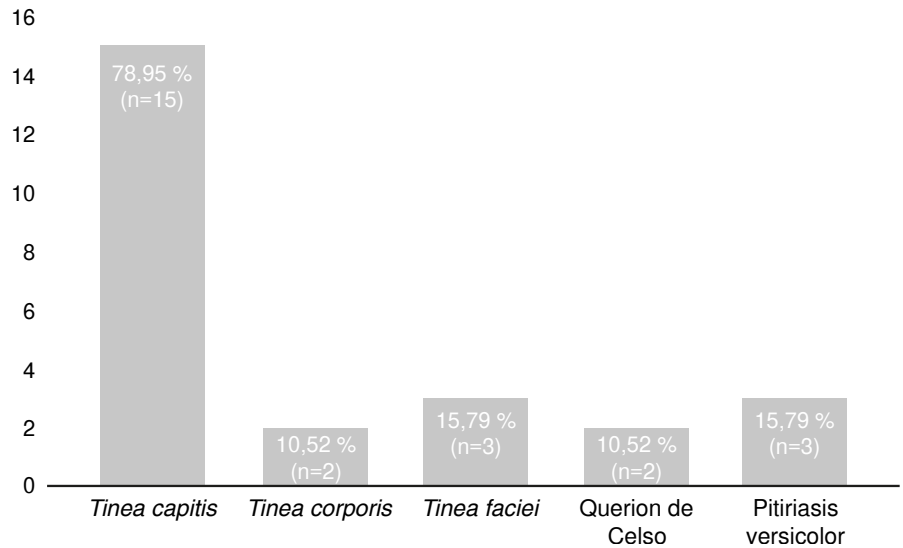


Figura 2. Formas clínicas presentadas por los pacientes en quienes se confirmó el diagnóstico de micosis cutáneas por exámenes de laboratorio.

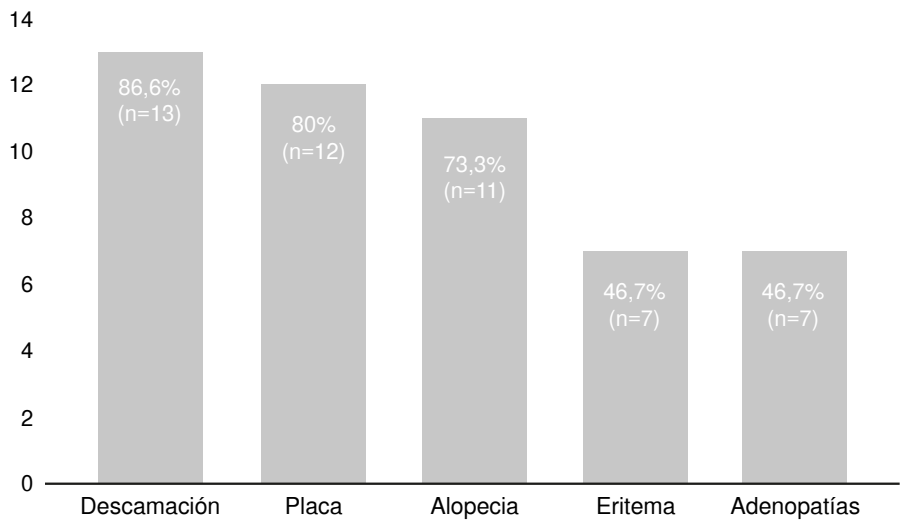


Figura 3. Características de las lesiones de los pacientes en quienes se confirmó microbiológicamente el diagnóstico de *tinea capitis*

En los hallazgos de los exámenes directos relacionados con el agente aislado en cultivo de las muestras de los pacientes en quienes se confirmó el diagnóstico por el laboratorio, se observó lo siguiente: en las muestras de seis pacientes al examen directo se observó invasión endotrix-ectotrix y de estas muestras se aisló en cultivo *M. canis*. En las muestras de otros dos pacientes se observaron en el examen directo hifas hialinas septadas o tabicadas, y de ellas se obtuvo a *M. canis* en cultivo; en las muestras de otros tres pacientes de las cuales creció *M. canis*, se observaron artroconidias en el examen directo; en un paciente, a pesar de que los resultados de los exámenes directos fueron negativos, se pudo aislar *M.canis* en cultivo.

Para las muestras de diez pacientes, solo después de ocho semanas en cultivo, se pudo identificar el agente causal: *M. canis* (n=7) y *Trichophyton* spp. (n=3).

Discusión

Las infecciones fúngicas de piel y anexos constituyen uno de los grupos más numerosos y diversos de todas las micosis. La prevalencia de las micosis superficiales ha aumentado en las últimas décadas (20-25 % de la población mundial) y se ha convertido en una de las infecciones más frecuentes en el humano (6,7). Sus agentes causales, los dermatofitos, sobreviven a temperaturas entre los 25 y los 28 °C, por esta razón, países tropicales como Colombia son adecuados para su supervivencia (6,7). La frecuencia y distribución de las formas clínicas producidas por los dermatofitos varían de acuerdo con la ubicación geográfica y los factores socioeconómicos, culturales y migratorios (8). Estas enfermedades pueden adquirirse por contacto con humanos infectados (antropofílicas), animales infectados (zoofílicas) y por contacto con la tierra (geofílicas); y se clasifican según su localización en el cuerpo (9).

Es así como en este reporte observacional, llevado a cabo en la localidad de Carpinelo de Medellín, se evaluaron 57 pacientes con sospecha clínica de dermatofitosis. De ellos, 47 pacientes eran menores de edad con un rango entre los 7 meses y los 16 años, y una media de edad de 6 años. La forma clínica más común de las dermatofitosis en este grupo fue la *tinea capitis* (78,95 %), seguida de la *tinea faciei* en 15,79 % y la *tinea corporis* (10,52 %).

Estos datos contrastan con lo encontrado en una investigación con estudiantes de nivel primario en Ayacucho (Perú), en el cual se encontró una frecuencia de 68 % de dermatofitosis en la población estudiada, con la siguiente distribución anatómica de las formas clínicas: 47 %, *tinea pedis* (espacios interdigitales de los pies); 29,4 %, *tinea faciei*; 19,1 %, *tinea corporis* y 4,4 %, *tinea capitis* (10). En un estudio realizado en Colombia, por Alvarado y colaboradores, en un periodo de 13 años (2000 a 2012), en pacientes con edades entre los 0 y los 18 años, encontraron una frecuencia de *tinea unguium* de 29,6 % y de *tinea capitis* de 28,4 % (11).

Microsporum canis fue el principal agente etiológico aislado en la población de este estudio, lo cual contrasta con observaciones realizadas en otros. En una investigación realizada en Etiopia, en estudiantes de escuela básica primaria, el agente etiológico predominante fue *Trichophyton violaceum* (12), mientras que en pacientes pediátricos de la India, *T. mentagrophytes* fue la especie identificada con mayor frecuencia en todos los sitios, excepto en el cuero cabelludo, donde fue más común la identificación de *T. tonsurans* (13). En los últimos 10 a 20 años, *T. tonsurans* ha sido el

microoganismo más frecuentemente aislado en los casos de *tinea capitis* en Norteamérica y Centroamérica, y en algunas regiones de Europa y África (14). En Bélgica se llevó a cabo un estudio reciente para evaluar los agentes causales de *tinea capitis* y los autores encontraron que los dermatofitos antropofílicos *M. audouinii* y *T. soudanense* eran los más frecuentes (15). En niños de República Dominicana con *tinea capitis* se aisló *T. tonsurans* en el 61,16 % de los casos, *M. audouinii* en el 24,27 % y *M. canis* en el 11,65 % de los pacientes (16).

En Colombia, en el estudio mencionado, realizado por Alvarado y Pereira en Bogotá, se evidenció que *T. rubrum* fue el dermatofito más aislado en los casos de *tinea unguium*, seguido de *M. canis* en los casos de *tinea capitis* (89,7 %) (11). Los datos de estos reportes y los del presente trabajo confirman la variabilidad del agente causal según la región geográfica.

En esta investigación, la forma clínica predominante fue la *tinea capitis* y el agente causal más aislado fue *M. canis,* lo que coincide con hallazgos de otro reporte de Medellín en el que *M. canis* fue hallado en el 86 % de los pacientes evaluados con esta condición (17).

Algunos de los factores de riesgo más frecuentes en la población estudiada fueron el contacto con mascotas –perro, gato o ambos– (30 %), el contacto con fómites (26 %) y las actividades o juegos con tierra (23 %). La alta frecuencia de contacto con mascotas como factor de riesgo contrasta con lo encontrado en un estudio en Camerún, en población infantil con *tinea capitis*, en el cual la presencia de animales no mostró tener una relevancia estadística en el desarrollo de esta infección (18). Por el contrario, la baja frecuencia de contacto con personas afectadas por dermatofitosis se diferencia de lo encontrado en estudiantes de área rural de Eskisehir (Turquía) donde se evidenció que la presencia de dermatofitosis en la familia era un factor de riesgo para el desarrollo de esta en los estudiantes (19), hallazgo también descrito en el estudio realizado en Bélgica (15).

En los resultados presentados en este reporte se destaca el porcentaje de pacientes que había usado o estaba usando esteroides, problema que ya ha sido tratado por otros autores, quienes evidencian que el uso frecuente de estos, de forma empírica, trae como consecuencia formas atípicas de las micosis, de difícil diagnóstico y que llevan a la cronicidad de las lesiones (20,21), persistencia y recurrencia de los cuadros clínicos (22,23), así como una mayor penetración del hongo en la dermis (20,21) y con esta secuelas irreversibles.

En resumen, en este estudio la *tinea capitis* fue la presentación clínica más común y *M. canis* el agente causal más frecuente. Llamó la atención el uso de esteroides como primera y única opción de tratamiento empírico, lo que resalta la importancia del diagnóstico microbiológico para proporcionar la terapia apropiada.

Es importante señalar que el número de casos de micosis superficiales que se confirmaron clínica y microbiológicamente en este estudio, se hizo en una ventana de tiempo muy corta y restringida a un solo lugar. Por esta razón, se planteó a la Secretaría de Salud del municipio de Medellín, la importancia de hacer búsqueda y vigilancia activa de estas infecciones en los otros jardines educativos de la Alcaldía de Medellín.

Referencias

1. Negroni, R. Historical aspects of dermatomycoses. Clin Dermatol. 2010;28:125-32. https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2009.12.010
2. Hay RJ. Tinea capitis: Current status. Mycopathologia. 2017;182:87-93. https://doi.org/10.1007/s11046-016-0058-8
3. Sahoo AK, Mahajan R. Management of tinea corporis, tinea cruris, and tinea pedis: A comprehensive review. Indian Dermatol Online J. 2016;7:77-86. https://doi.org/1010.4103/2229-5178.178099
4. Rubio MC, Rezusta A, Gil-Tomás J, Ruesca RB. Perspectiva micológica de los dermatofitos en el ser humano. Rev Iberoam Micol. 1999;16:16-22.
5. Dogo J, Afegbua SL, Dung EC. Prevalence of *Tinea capitis* among school children in Nok Community of Kaduna State, Nigeria. J Pathog. 2016;2016:9601717. https://doi.org/10.1155/2016/9601717
6. Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. Mycoses. 2008;51:2-15. https//doi.org/10.1111/j.1439-0507.2008.01606.x
7. Zhan P, Liu W. The changing face of dermatophytic infections worldwide. Mycopathologia. 2017;182:77-86. https//doi.org/10.1007/s11046-016-0082-8
8. Ameen M. Epidemiology of superficial fungal infections. Clin Dermatol. 2010;28:197-201. https//doi.org/10.1016/j.clindermatol.2009.12.005
9. Hawkins DM, Smidt AC. Superficial fungal infections in children. Pediatr Clin North Am. 2014;61:443-55. https//doi.org/10.1016/j.pcl.2013.12.003
10. Gavilán SM, Montero RSG. Dermatofitosis en estudiantes de la Institución Educativa "San Juan de la Frontera", Ayacucho, Perú, 2010. Rev Peru Epidemiol. 2011;15:65-8.
11. Alvarado Z, Pereira C. Fungal diseases in children and adolescents in a referral centre in Bogota, Colombia. Mycoses. 2018;61:543-8. https//doi.org/10.1111/myc.12774
12. Alemayehu A, Minwuyelet G, Andualem G. Prevalence and etiologic agents of dermatophytosis among primary school children in Harari Regional State, Ethiopia. J Mycol. 2016. https://doi.org/10.1155/2016/1489387
13. Mishra N, Rastogi MK, Gahalaut P, Yadav S, Srivastava N, Aggarwal A. Clinicomycological study of dermatophytoses in children: presenting at a tertiary care center. Indian J Paediatr Dermatol. 2018;19:326-30. https://doi.org/10.4103/ijpd.IJPD_98_17
14. Ameen M. Epidemiology of superficial fungal infections. Clin Dermatol. 2010; 28: 197-201. https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2009.12.005
15. Sacheli R, Harag S, Dehavay F, Evrard S, Rousseaux D, Adjetey A, *et al.* Belgian National Survey on *Tinea capitis*: Epidemiological considerations and highlight of terbinafine-resistant *T. mentagrophytes* with a mutation on SQLE gene. J Fungi (Basel). 2020;6:195. https://doi.org/10.3390/jof6040195
16. Arenas R, Torres E, Amaya M, Rivera ER, Espinal A, Polanco M, *et al. tinea capitis*. Emergencia de *Microsporum audouinii* y *Trichophyton tonsurans* en la República Dominicana. Actas Dermosifiliogr. 2010;101:330-5. https://doi.org/10.1016/j.ad.2009.12.004
17. Zuluaga A, Cáceres DH, Arango K, de Bedout C, Cano LE. Epidemiología de la *Tinea capitis*: 19 años de experiencia en un laboratorio clínico especializado en Colombia. Infectio. 2016;20:225-30. https://doi.org/10.1016/j.infect.2015.11.004
18. Kechia EA, Kouoto EA, Nkoa T, Nweze EI, Fokoua DC, Fosso S, *et al.* Epidemiology of *Tinea capitis* among school-age children in Meiganga, Cameroon. J Mycol Med. 2014;24:129-34. https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2013.12.002
19. Metintas S, Kiraz N, Arslantas D, Akgun Y, Kalyoncu C, Kiremitci A, *et al.* Frequency and risk factors of dermatophytosis in students living in rural areas in Eskisehir, Turkey. Mycopathologia. 2004;157:379-82. https://doi.org/10.1023/b:myco.0000030447.78197.fb
20. Lakhani SJ, Bilimoria SJ, Lakhani JD. Adverse effects of steroid use in dermatophytic infections: A cross sectional study. J Integr Heal Sci. 2017;5:63-8. https://doi.org/10.4103/2347-6486.240248
21. Erbagci, Z. Topical therapy for dermatophytoses: Should corticosteroids be included? Am J Clin Dermatol. 2004;5:375-84. https://doi.org/10.2165/00128071-200405060-00002

22. Wheat CM, Bickley RJ, Hsueh Y-H, Cohen BA. Current trends in the use of two combination antifungal/corticosteroid creams. J Pediatr. 2017;186:192-5. https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2017.03.031

23. Alston SJ, Cohen BA, Braun M. Persistent and recurrent tinea corporis in children treated with combination antifungal/ corticosteroid agents. Pediatrics. 2003;111:201-3. https://doi.org/10.1542/peds.111.1.201

Biomédica 2023;43(Supl.1):255-66
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.7020

Original article

The conventional diagnosis challenge: Real-time PCR and nested PCR correlation with the scoring system for individuals at high-risk of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia

Fernando Almeida-Silva[1], Rodrigo Almeida-Paes[1], Lisandra Serra-Damasceno[2,3], Edwiges Motta-Santos[4], Luiz Claudio Ferreira[5], Leonardo Pereira-Quintella[5], Marcela de Faria Ferreira[1,6], Mauro de Medeiros-Muniz[1], Rosely M. Zancopé-Oliveira[1]

[1] Laboratório de Micologia, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil
[2] Hospital São José de Doenças Infecciosas, Fortaleza, Ceará, Brasil
[3] Departamento de Saúde Comunitária, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil
[4] Laboratório de Medicina Intensiva, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil
[5] Serviço de Anatomia Patológica, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil
[6] Serviço Ambulatorial do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil

Introduction. *Pneumocystis jirovecii* is an opportunistic fungus that affects mainly people living with HIV (CD4 cell count lower than 200 cells/ml) and other immunosuppressed patients. Since *P. jirovecii* does not grow on routine mycological media, diagnosis of *P. jirovecii* pneumonia relies on indirect evidence of its presence in respiratory samples.
Objectives. To associate the results of direct immunofluorescence and two molecular methods with a score to predict *P. jirovecii* pneumonia in patients with AIDS.
Materials and methods. A prospective study was conducted with 40 patients. A respiratory sample collected before treatment was subjected to direct immunofluorescence using the Merifluor kit, to nested PCR targeting the mitochondrial large subunit ribosomal RNA, and to the VIASURE real-time PCR kit.
Results. These three techniques revealed *P. jirovecii* in 6, 12, and 15 samples, respectively. All positive samples by direct immunofluorescence were positive by nested PCR, and all positive samples by nested PCR amplified by real-time PCR. There was a statistically significant association between the *P. jirovecii* pneumonia score and the molecular methods. Two patients were early diagnosed and responded well to treatment.
Conclusion. Molecular methods, especially real-time PCR, are recommended for early diagnosis of *P. jirovecii* pneumonia in AIDS patients.

Keywords. Pneumonia, pneumocystis; fluorescent antibody technique, direct; real-time polymerase chain reaction.

Desafío diagnóstico: PCR anidada y en tiempo real frente a un sistema de puntuación en individuos con gran riesgo de neumonía por *Pneumocystis jirovecii*

Introducción. *Pneumocystis jirovecii* es un hongo oportunista que afecta principalmente a personas con HIV (recuento de CD4 menor de 200 células/ml) y a otros pacientes inmunosuprimidos. Como *P. jirovecii* no crece en los medios micológicos de rutina, el diagnóstico de neumonía por *P. jirovecii* se basa en la evidencia presente en muestras respiratorias.
Objetivos. Asociar los resultados de la inmunofluorescencia directa y los de dos métodos moleculares con un puntaje para predecir la neumonía causada por *P. jirovecii* en pacientes con sida.
Materiales y métodos. Se realizó un estudio prospectivo de 40 pacientes. Se recolectó una muestra respiratoria antes del inicio de tratamiento y se sometió a una prueba de inmunofluorescencia directa con el kit Merifluor, una PCR anidada para la amplificación de la subunidad larga del ribosoma mitocondrial y una PCR en tiempo real usando el kit VIASURE.
Resultados. Estas tres técnicas evidenciaron la presencia de *P. jirovecii* en 6, 12 y 15 muestras, respectivamente. Todas las muestras positivas por inmunofluorescencia directa fueron positivas en la PCR anidada y todas las muestras positivas en la PCR anidada amplificaron por PCR en tiempo real. Se encontró una asociación estadística entre los valores de la neumonía causada por *P. jirovecii* y los métodos moleculares. Dos pacientes con diagnóstico temprano respondieron satisfactoriamente al tratamiento.

Received: 12/05/2023
Accepted: 24/07/2023
Published: 25/07/2023

Citation:
Almeida-Silva F, Almeida-Paes R, Serra-Damasceno L, Motta-Santos E, Ferreira LC, Pereira Quintella L, *et al.* The conventional diagnosis challenge: Real-time PCR and nested PCR correlation with the scoring system for individuals at high-risk of Pneumocystis jirovecii pneumonia. Biomédica. 2023;43(Supl.1):255-66.
https://doi.org/10.7705/biomedica.7020

Corresponding author:
Fernando Almeida-Silva, Laboratório de Micologia, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz-INI/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil
fernando.almeida@ini.fiocruz.br; rosely.zancope@ini.fiocruz.br

Author's contributions:
Fernando Almeida-Silva and Rodrigo Almeida-Paes: Methodology, software, data formal analysis, investigation, visualization and manuscript writing
Fernando Almeida-Silva: investigation
Lisandra Serra Damasceno, Edwiges Motta-Santos, Luiz Claudio Ferreira and Leonardo Pereira Quintella: Methodology
Marcela de Faria Ferreira: Data formal analysis
Mauro de Medeiros Muniz: Validation, visualization and manuscript writing
Rosely M. Zancopé-Oliveira: Conceptualization, validation, resources, data curation, supervision, project administration, funding acquisition and manuscript writing
All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding:
This research was funded by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Ja-neiro (FAPERJ), grant number E-26/203.076/2016. R.M.Z-O. It was also supported in part by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 302796/2017-7) and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) E-26/202.527/2019.

Conflicts of interest:
The authors declare no conflict of interest.

Conclusión. Se recomiendan los métodos moleculares, especialmente la PCR en tiempo real, para el diagnóstico temprano de neumonía causada por *P. jirovecii* en pacientes con sida.

Palabras clave: neumonía por *Pneumocystis*; técnica de inmunofluorescencia directa; reacción en cadena en tiempo real de la polimerasa.

Fungal pulmonary infections remain one of the most important health problems encountered in immunocompromised individuals (1). In general, mycoses became a common finding after the AIDS epidemic onset, with several fungi causing disease in this population (1). Among these fungi, *Pneumocystis jirovecii* (formerly known as *Pneumocystis carinii*), which has a worldwide distribution, causes fungal pneumonia considered an AIDS-defining disease (2). *Pneumocystis jirovecii* pneumonia also occurs in non-HIV-infected patients such as transplant recipients, individuals with prolonged immunosuppressive therapies, with autoimmune complications, and neoplasic disorders under chemotherapy (3).

Historically, it was believed that *P. jirovecii* pneumonia was a direct consequence from a latent prior infection (4), but a study of 15 lung autopsies of immunocompetent individuals aged 15-75 years showed the absence of *P. jirovecii* and disproved this hypothesis (5). Nowadays, the most accepted hypothesis is *P. jirovecii* transmission from person to person or acquisition from the environment, both by airborne route. Furthermore, disease development can also occur due to reactivation or reinfection (6). This fungus can cause an asymptomatic infection to fulminant pneumonia depending on the host's immune status. The most severe case of this disease presents when CD4+ lymphocyte count is lower than 200 cells/ml, frequently occurring in male patients (7).

The *P. jirovecii* pneumonia diagnosis is difficult, mainly because *P. jirovecii* cannot grow in traditional mycological culture media such as Sabouraud or Mycosel (8). Cultures of *P. jirovecii* are obtained only in pneumocyte cell cultures, which are not available in most laboratories (9). Histopathologic diagnosis by staining methods or fungal visualization (with the fluorescent dye calcofluor white) depends on the fungal burden, specific staining and the observer's expertise (10). In some cases, the traditional histopathologic diagnosis can be difficult, due to similar structures present in the material that can lead to a misdiagnosis with other microorganisms, making differential diagnosis strongly necessary (11). In addition, serological methods based on antibody detection have limitations in *P. jirovecii* pneumonia diagnosis. Humans produce antibodies against the gpA protein, used in serological studies (12). However, due to high genetic variation, this protein is not widely studied. Another serological tests limitation is that patients from different geographic regions may have different levels of immune response to this surface protein (13).

Laboratory findings are generally not helpful in the *P. jirovecii* pneumonia diagnosis because many findings are compatible with other infections. For example, increased serum lactate dehydrogenase is present in HIV-infected patients (14-16). Symptoms such as fever, cough, dyspnea, and, in severe cases, respiratory failure, are also manifestations of other infections, such as tuberculosis (17), histoplasmosis (18), cryptococcosis (19), community-acquired pneumonias (CAP) (20), and more recently, coronavirus disease 2019 (COVID-19) (21).

Several research groups reported the use of molecular methods to detect and diagnose *P. jirovecii* (22-25). Molecular methods have a high sensitivity and specificity, almost without cross-reactivity, and present better results when compared with traditional diagnostic methods, including direct

immunofluorescence (23) and serology (24). Up to now, nested PCR and real-time PCR are the most widely used molecular diagnostic methods, and have different levels of sensitivity and specificity, according to the protocol and the selected target (26). These methods are not able to differentiate between colonization and infection, but provide fast and accurate results, important factors because faster results imply quicker diagnosis and treatment, improving the health quality of immunocompromised populations.

Even with a multitude of available molecular tests for *P. jirovecii* pneumonia diagnosis, the immunofluorescence assay remains as the gold standard for the diagnosis of pneumocystosis, as it detects the presence of spore or ascus (formerly known as cysts and trophozoites) (27). However, as exposed, it is a test with several limitations and requires careful result analysis, especially in cases with low fungal load, which can easily present false negative results with this technique (23). In these cases, it is hard to interpret if a positive molecular method result (performed with the same respiratory sample) is a true false-positive or if it indicates a fungal burden below the immunofluorescence detection limit.

This study aimed to compare the results of traditional, direct immunofluorescence assay *versus* molecular methodologies (nested PCR and a commercial real-time PCR kit) to detect *P. jirovecii* in respiratory samples from immunocompromised patients with fungal pneumonia suspicion and correlate with the scoring system to predict *P. jirovecii* pneumonia (28).

This study was approved by the Research Ethics Committee of the Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases – Oswaldo Cruz Foundation (INI-Fiocruz), CAAE 00580.0.009.000-09.

Materials and methods

Patients and samples

A study was conducted (2013-2014) in patients with suspected fungal pneumonia at *Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz,* Rio de Janeiro, Brazil. Inclusion criteria were patients over 18 years old and were hospitalized. The included patients were people living with HIV, a CD4+ cell count lower than 200 cells/ml, and clinical symptoms compatible with fungal pneumonia. Patients without sufficient respiratory samples to carry out all proposed methodologies were excluded. Respiratory samples for diagnosis were collected depending on the patient's condition and consent. Samples included spontaneous or induced sputum, tracheal wash, and bronchoalveolar lavage in a convenience sampling.

Culture

The culture was performed to check other possible fungal agents causing coinfections. After removing the airway mucus layer with citrate buffer and the N-acetylcysteine (a mucolytic agent) the samples were centrifuged at 11.500*g* for five minutes and cultivated in 2% Sabouraud Dextrose and Mycosel culture media (Becton Dickinson). Cultures were observed on a weekly basis during four weeks of incubation at room temperature. Possible fungi were identified by conventional mycologic techniques.

Hematoxylin and eosin, Grocott's and calcofluor white stains

Previous treatment with cellblock fixative was done for hematoxylin and eosin, and Grocott's stain, to yield a cellular pellet from the respiratory

materials in 1.5 ml. All samples were paraffin-embedded for posterior sections measuring 3-4 µm. The sections were stained with the traditional protocol for hematoxylin and eosin to evidence samples' cellular characteristics. Moreover, for the Grocott´s method, the samples were stained with metenamine silver nitrate and counterstained with light green. The calcofluor staining was performed using a commercial reagent (Calcofluor White Stain – Fluka Inc.). The reaction was performed using one drop of the sample, one drop of 10% potassium hydroxide, and one calcofluor drop, as the manufacturer instructed.

Direct immunofluorescence

One ml of 0.1% dithiothreitol was added, as a mucolytic agent, to 1 ml of the respiratory specimens. The mixture was incubated at 37 °C for 15 minutes and the supernatant was discarded. After this step, the direct immunofluorescence assay was conducted using the Merifluor *Pneumocystis* kit (Meridian Biosciences, Inc, OH, USA) according to the manufacturer's instructions. The results were observed with the fluorescence microscope Olympus-BX40® with a 400-fold magnification.

DNA extraction

The DNA was extracted from the respiratory samples using the QIAamp® DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany), following all the manufacturer´s recommendations. DNA concentrations were estimated using the Nanovue™ Plus Spectrophotometer (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

Human housekeeping gene β-globin PCR and nested PCR for P. jirovecii

The single step polymerase chain reaction (PCR) for human housekeeping gene β-globin was performed using the primer pair βglobinF (5'-GCA AGA AAG TGC TCG GTG C-3') and βglobinR (5'-TCA CTC AGT GTG GCA AAG GTG-3'). The total reaction volume was 50 µl, using 10 µl of DNA, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 2.5 mM $MgCl_2$, 1.5 units of Taq DNA polymerase (ThermoFisher, MA, EUA), 30 pMol of each primer and 200 µM of dNTPs (ThermoFisher, MA, EUA). The PCR was conducted with the following conditions: 95 °C for 5 minutes; 45 cycles at 95 °C for 30 s, 57 °C for 30 s, 72 °C for 30 s and one final extension at 72 °C for 10 minutes (29).

The nested PCR targeting the *P. jirovecii* mitochondrial large subunit ribosomal RNA (mtLSUrRNA), was performed using in the first round the primers pAZ 102-H (5'- GTG TAC GTT GCA AAG TAC TC-3') and pAZ 102-E (5'-GAT GGC TGT TTC CAA GCC CA-3'), and in the second reaction, the primers pAZ 102-X (5'-GTG AAA TAC AAA TCG GAC TAG G-3') and pAZ 102-Y (5'-TCA CTT AAT ATT AAT TGG GGA GC-3') (18). A total volume of 50 µl was set for each reaction, containing 10 µl DNA, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 2.5 mM $MgCl_2$, 1.5 units of Taq DNA polymerase, 10 µM of each primer and 200 µM of dNTPs. The mix of the nested PCR was similar, except for the use of 2 µl of the first reaction, used as template for the second reaction. Both reactions were performed following the protocol previously described (13), with minor modifications: The first reaction was cycled 40 times at 94 °C for 1.5 minutes, 60 °C for 1.5 minutes and 72 °C for 2 minutes. The second round was cycled 40 times at 94 °C for 1.5 minutes, 61.7 °C for 1.5 minutes and 72 °C for 2 minutes (30).

Both reactions were performed in a C1000 thermalcycler (BioRad, Germany) and electrophoresed on a 1% agarose gel stained with 0.5% ethidium bromide.

Viasure real-time PCR

The VIASURE *Pneumocystis jirovecii* real time PCR detection kit (CERTEST BIOTEC, Spain) was designed for *P. jirovecii* diagnosis in respiratory samples. After DNA isolation, the identification of *P. jirovecii* was performed by the amplification of a mtLSUrRNA conserved region, using specific primers and a fluorescent-labelled probe (FAM). The reaction was performed according to manufacturer's instructions in a Agilent AriaMX (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) qPCR thermal cycler. The reactions consisted in a polymerase activation at 95 °C for 2 minutes and 45 cycles of annealing/extension at 60 °C for 50 s. The results were analized in the Aria MX software (version 1.7.1).

Pneumocystis jirovecii pneumonia diagnosis

The final diagnosis of *P. jirovecii* pneumonia was reached after the correlation of all test results and its classification based on the scoring system proposed by Smith, Forbes and Gazzard (1992) (28) (supplementary table 1). The response to sulphamethoxazole/trimethoprim treatment was also considered.

Statistical analysis

Concordance between the defined categories by the diagnostic methods (positive or negative) was evaluated using the kappa coefficient, interpreted as described (31). Statistical analyses were performed using GraphPad Prism (version 5.0) software. Non-parametric tests were used to compare groups of continuous variables. Categorical variables were analized using the Fisher exact test. A p-value less than 0.05 was considered significant.

Institutional review board statement

The study was approved by the Institutional Ethics Committee of the Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases (protocol code CAAE 00580.0.009.000-09—date of approval: 26 February 2014).

Results

Patients and samples

During the study period, 40 patients fulfilled the inclusion criteria and were enrolled, resulting in 40 clinical respiratory samples (21 induced sputum, 11 tracheal wash, 5 bronchoalveolar lavage, and 3 spontaneous sputum) for analysis. Table 1 presents the clinical-epidemiological characteristics of the patients. After analyzing the clinical features of each patient, all individuals were assigned a final score to know the probability of having *P. jirovecii* pneumonia (table 2), ranging from 23 to 98%. All patients started sulphamethoxazole/trimethoprim prophylaxis after the respiratory samples collection.

Staining methods and culture

Most of the samples (72.5%) showed respiratory tract cells: squamous cells, cylindrical cells, and alveolar macrophages (data not shown) while 27,5% of the samples were paucicellular or presented cell absence. Among the staining techniques performed, calcofluor white, and silver staining did not reveal compatible *P. jirovecii* cells in any respiratory sample. All the cultures did not demonstrate any fungal growth. The results for all tested methodologies are presented in supplementary table 2.

Table 1. Clinical-epidemiological characteristics of the 40 patients included in the study

Variable	n	%
Sex		
Male	30	75
Female	10	25
Age		
18-19	1	2.5
20-39	23	57.5
40-59	16	40
Viral load[a]		
Not available	19	47.5
<1000	4	10
1000-10.000	5	12.5
10.001-100.000	2	5
>100.001	10	25
CD4+ count[b]		
<10	3	7.5
11-50	7	17.5
51-100	17	42.5
101-200	13	32.5

[a] copies/ml
[b] cells/ml

Table 2. Patients final score and *Pneumocystis jirovecii* pneumonia probability

Final scoring	Patients n (%)	*P. jirovecii* pneumonia probability (%)
<-3	0 (0)	
-3 to +6	19 (47.5)	23
> +6	10 (25)	82-87
>+19	11 (27.5)	98

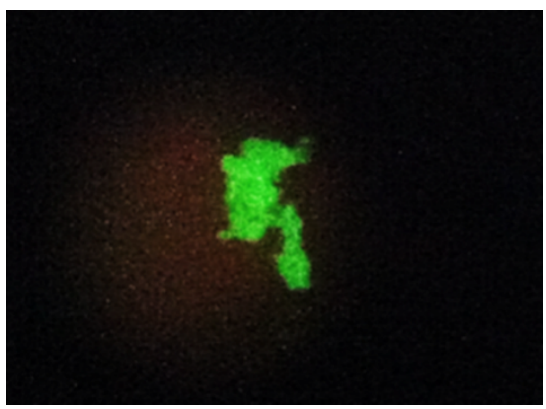


Figure 1. Representative positive direct immunofluorescence result at 400X. Fluorescent honeycomb structures seen in a sputum sample treated with the Merifluor® *Pneumocystis* kit

Direct immunofluorescence

Among the 40 clinical specimens evaluated, six samples (15%) had structures morphologically compatible with *P. jirovecii* stained with a fluorescent green color and were considered positive by direct immunofluorescence using the Merifluor Pneumocystis kit (figure 1).

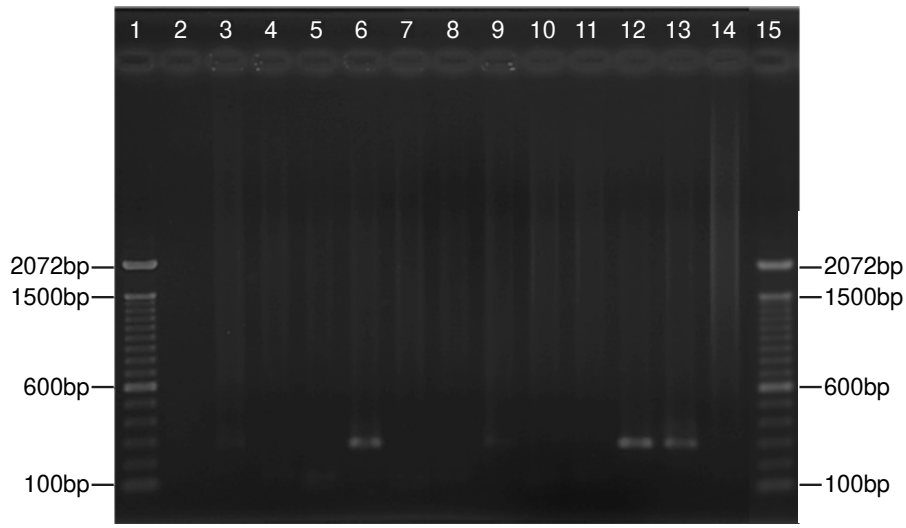


Figure 2. Representative nested polymerase chain reaction for *Pneumocystis* jirovecii in 11 samples. Lanes 1 and 15: Molecular weight (1 kb plus DNA ladder - ThermoFisher Scientific, Inc.); lanes 3, 6, 9, and 12: Positive samples with a fragment of 260 bp; lanes 2, 4, 5, 7, 8, 10 and 11: Negative samples; lane 13: Positive control, lane 14: Negative control. The size (base pairs - bp) of the bands is indicated in both sides.

Molecular methods

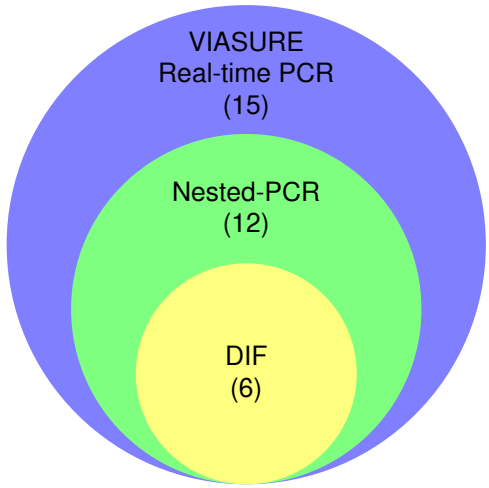
Partial amplification of the endogenous β-globin control gene yielded a specific fragment of 79 bp, evidencing successful DNA extraction from all respiratory specimens (supplementary figure 1). Nested PCR targeting the *mtLSUrRNA* gene revealed 12 positive specimens (30%), with a 260 bp fragment amplification (figure 2). The VIASURE *Pneumocystis jirovecii* real-time PCR detection kit, designed for the same conserved region of *mtLSUrRNA*, amplified 15 samples (37.5%). All positive samples by direct immunofluorescence were also positive by nested PCR, and all positive samples by nested PCR were amplified by real-time PCR (figure 3).

Clinical and laboratory findings correlation

The direct immunofluorescence, nested PCR, and VIASURE real-time PCR detection kit had discordant results for *P. jirovecii* detection. For this reason, a clinical-laboratory correlation with the results of all methodologies was performed, and generated a scoring system for individuals with high-risk of *P. jirovecii* pneumonia.

The direct immunofluorescence was negative for patients with a probability of 23% (19 patients among the 40 studied) for *P. jirovecii* pneumonia. This technique significantly demonstrated insatisfatory results in patients with low *P. jirovecii* pneumonia probability ($p = 0.02$, Fisher's exact test).

Nested PCR results for patients with a 23% probability of having *P. jirovecii* pneumonia indicated only one positive (5%) and 18 negative samples. Among patients with 82% or higher probability for *P. jirovecii* pneumonia, 11 (52%) samples were positive, while 10 (48%) were negative. A statistically significant difference between these two groups ($p = 0.0015$, Fisher's exact test) was detected. The kappa index demonstrated a moderated correlation (0.583) between direct immunofluorescence and nested PCR (figure 3).



DIF: Direct immunofluorescence; PCR: polymerase chain reaction

Figure 3. Venn diagram showing the number of positive results obtained in each method. An overlap of positive samples was observed with the different methodologies.

Table 3. Positive results in the different *Pneumocystis jirovecii* diagnostic methods among four possible scores of high-risk individuals to *Pneumocystis jirovecii* pneumonia

***P. jirovecii* pneumonia probability (n)**	**DIF**		**Nested PCR**		**VIASURE Real-time PCR**	
	n	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**
98% (11)	2	18	6	54	7	63
87% (2)	1	50	1	50	1	50
82% (8)	3	37.5	4	50	5	62.5
23% (19)	0	0	1	5	2	10

DIF: Direct immunofluorescence

The results of VIASURE *Pneumocystis jirovecii* real-time PCR evidenced a statistically significant difference between these two groups (p = 0.0011, Fisher's exact test); firstly, the group with 23% of PCP and in the second, the group higher than 82% of PCP. The kappa index demonstrated a moderated correlation (0.455) between direct immunofluorescence and real-time PCR results. In addition, an agreement was observed between nested PCR and real-time PCR (kappa = 0.833). All these results are summarized in table 3 and supplementary table 2.

Discussion

This study evaluated the performance of methods for the diagnosis of pneumonia caused by *P. jirovecii*. The analyzed samples consisted of respiratory material collected from 40 patients with AIDS, with considerable immunosuppression and respiratory symptoms compatible with those presented by fungal diseases. The use of the scoring system proposed by Smith, Forbes and Gazzard (1992) in the included patients, allowed us to predict different probabilities of *P. jirovecci* pneumonia among them.

The gold standard method to detect *P. jirovecii* is direct immunofluorescence, since this technique detects *P. jirovecii* in its two life-cycle stages (32). Conventional techniques have shown intrinsical limitations, such as microscopic visualization of clinical samples which depends on cellular quality, microorganism amount, and observer expertise (26). In our

sampling, the gold standard method showed the lowest positivity among the other diagnostic techniques tested. Direct immunofluorescence makes it possible to detect *P. jirovecii* only in patients with a higher probability of *P. jirovecii* pneumonia. It may indicate a failure of *P. jirovecii* pneumonia diagnosis in oligosymptomatic patients or at early stages of the disease. Our results corroborate the indication of other research groups about the use of molecular methods as alternative techniques to detect this fungal pathogen.

Several reports have shown the low sensitivity of conventional techniques when compared to molecular methods. A study with 275 clinical respiratory specimens, comparing Grocott´s stain, direct immunofluorescence, and nested PCR (targeting the *mtLSUrRNA*) revealed nine positive samples by the Grocott´s stain and 16 positive samples by direct immunofluorescence. However, when the samples were evaluated by nested PCR, the authors found *P. jirovecii* DNA in 44 samples (26).

Another report, using 50 clinical specimens of respiratory origin and comparing three methodologies: Giemsa, direct immunofluorescence, and nested PCR (targeting the mtLSUrRNA), showed that Giemsa stain detected *P. jirovecii* only in one sample, direct immunofluorescence yielded four positive results and nested PCR resulted in 36 positive samples (33).

A study comparing nine molecular methods showed that nested PCR targeting the *mtLSUrRNA* gene should be considered the most sensitive technique (34) for *P. jirovecii* pneumonia diagnosis. The explanation for the better performance of this technique is that the *mtLSUrRNA* gene is fully involved in basic metabolic processes, and it has a high degree of genetic conservation (35) in *P. jirovecii*. In addition, the high number of *P. jirovecii* mitochondrias makes the *mtLSUrRNA* gene an excellent target for *P. jirovecii* pneumonia diagnosis (26), increasing the sensitivity of the nested PCR. For this reason, this partial sequence has become the molecular target most suitable for *P. jirovecii* detection. The results herein corroborate the utility of the *mtLSUrRNA* gene for early detection of pneumonia caused by *P. jirovecii* (36).

In contrast with most eukaryotic organisms, *P. jirovecii* has only one copy of the gene encoding the ribosomal RNA, and this explains why techniques that use internal transcribed spacer (ITS) region as diagnostic target has low efficiency (37). The VIASURE real-time PCR kit was also developed to target the *mtLSUrRNA* gene. The results obtained in this study were better than those of nested PCR, with three additional patients diagnosed with *P. jirovecii* pneumonia. These results suggest that the VIASURE real-time PCR should be used for *P. jirovecii* pneumonia diagnosis in laboratories with the structure to perform it.

The lack of studies with this commercial kit does not allow us to establish a difference between *P. jirovecii* colonization and infection. However, our results together with the proposed clinical score indicated a possible *P. jirovecii* infection in the evaluated patients. To the best of our knowledge, this is the first study associating the Smith *et al.* (1992) score with laboratory data. Positive samples were detected in patients with lower *P. jirovecii* pneumonia probabilities based on the scoring system, which leads us to believe that this detection occurred in the early stages of the disease. Among the 40 studied patients, we observed that nested PCR was positive in the 12 samples, and among these, six were also positive by direct immunofluorescence. The increase in the positivity rate associated with the scoring system made us conclude that molecular methods, although not new, remain useful tools for the *P. jirovecii* pneumonia diagnosis.

Nested-PCR is an accessible technique for many laboratories, and the results are not observer-dependent like those of direct immunofluorescence. However, cross-contamination may occur between the first and second reactions, so laboratories should be careful when handling these samples. Real-time PCR provides fast results, also observer-independent, and have a low chance of external DNA contamination. However, it requires expensive equipment that may not be available in all centers handling patients with AIDS.

With the results of this work, it was concluded that nested PCR provides accurate results in laboratory practice for pneumocystosis diagnosis, especially in laboratories with basic infrastructure. However, the VIASURE real-time PCR showed superior results compared to nested PCR. Therefore, we suggest that, in countries where the kit is approved for diagnostic use, it should be performed as a routine test when the necessary infrastructure is available. Molecular results should be interpreted along with each patient's clinical signs and symptoms, and the score previously suggested (28) is adequate for this purpose.

References

1. Hoving JC, Brown GD, Gómez BL, Govender NP, Limper AH, May RC, *et al.* AIDS-related mycoses: Updated progress and future priorities. Trends Microbiol. 2020;28:425-8. https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.01.009
2. Limper AH, Adenis A, Le T, Harrison TS. Fungal infections in HIV/AIDS. Lancet Infect Dis. 2017;17:e334-43. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30303-1
3. Meléndez-Rivera JG, Ciofoaia GA. *Pneumocystis jirovecii* prophylaxis. Treasure Island: StatPearls; 2021.
4. Thomas CF Jr., Limper AH. *Pneumocystis* pneumonia. N Engl J Med. 2004;350:2487-98. https://doi.org/10.1056/NEJMra032588
5. Peters SE, Wakefield AE, Sinclair K, Millard PR, Hopkin JM. A search for *Pneumocystis carinii* in post-mortem lungs by DNA amplification. J Pathol. 1992;166:195-8. https://doi.org/10.1002/path.1711660217
6. Truong J, Ashurst JV. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. Treasure Island: StatPearls; 2021.
7. Phair J, Muñoz A, Detels R, Kaslow R, Rinaldo C, Saah A. The risk of *Pneumocystis carinii* pneumonia among men infected with human immunodeficiency virus type 1. Multicenter AIDS Cohort Study Group. N Engl J Med. 1990;322:161-5. https://doi.org/10.1056/NEJM199001183220304
8. White PL, Price JS, Backx M. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: epidemiology, clinical manifestation and diagnosis. Curr Fungal Infect R. 2019;13:260-73. https://doi.org/10.1007/s12281-019-00349-3
9. Schildgen V, Mai S, Khalfaoui S, Lusebrink J, Pieper M, Tillmann RL, *et al. Pneumocystis jirovecii* can be productively cultured in differentiated CuFi-8 airway cells. mBio. 2014;5:e01186-14. https://doi.org/10.1128/mBio.01186-14
10. Carmona EM, Limper AH. Update on the diagnosis and treatment of *Pneumocystis* pneumonia. Ther Adv Respir Dis. 2011;5:41-59. https://doi.org/10.1177/1753465810380102
11. Guarner J, Brandt ME. Histopathologic diagnosis of fungal infections in the 21st century. Clin Microbiol Rev. 2011;24:247-80. https://doi.org/10.1128/CMR.00053-10
12. Gingerich AD, Norris KA, Mousa JJ. *Pneumocystis* pneumonia: immunity, vaccines, and treatments. Pathogens. 2021;10. https://doi.org/10.3390/pathogens10020236
13. Daly K, Koch J, Respaldiza N, de la Horra C, Montes-Cano MA, Medrano FJ, *et al.* Geographical variation in serological responses to recombinant *Pneumocystis jirovecii* major surface glycoprotein antigens. Clin Microbiol Infect. 2009;15:937-42. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02716.x
14. Sabbagh W, Darwich NS. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and newly diagnosed human immunodeficiency virus (AIDS) in a 63-year-old woman. Am J Case Rep. 2018;19:927-31. https://doi.org/10.12659/AJCR.909612

15. Langevin B, Saleh M. Radiological presentation of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia mimicking bacterial pneumonia. BMJ Case Rep. 2016;2016: bcr2016215207. https://doi.org/10.1136/bcr-2016-215207

16. Waks AG, Tolaney SM, Galar A, Arnaout A, Porter JB, Marty FM, *et al. Pneumocystis jirovecii* pneumonia (PCP) in patients receiving neoadjuvant and adjuvant anthracycline-based chemotherapy for breast cancer: incidence and risk factors. Breast Cancer Res Treat. 2015;154:359-67. https://doi.org/10.1007/s10549-015-3573-2

17. Pandey S, Ghosh S, Halder P, Pal D, Modak DC, Guha SK. Pulmonary tuberculosis and *Pneumocystis jirovecii* concurrent pneumonia in HIV infected patients at a resource limited setting in Eastern India: A case series. Indian J Tuberc. 2020;67:378-82. https://doi.org/10.1016/j.ijtb.2019.08.003

18. Wahab A, Chaudhary S, Khan M, Smith SJ. Concurrent *Pneumocystis jirovecii* and pulmonary histoplasmosis in an undiagnosed HIV patient. BMJ Case Rep. 2018;2018:bcr2017223422. https://doi.org/10.1136/bcr-2017-223422

19. Obmann VC, Bickel F, Hosek N, Ebner L, Huber AT, Damonti L, *et al.* Radiological CT patterns and distribution of invasive pulmonary *Aspergillus*, non-*Aspergillus*, *Cryptococcus* and *Pneumocystis jirovecii* mold infections - A multicenter study. Rofo. 2021;193:1304-14. https://doi.org/10.1055/a-1482-8336

20. Nambu A, Ozawa K, Kobayashi N, Tago M. Imaging of community-acquired pneumonia: Roles of imaging examinations, imaging diagnosis of specific pathogens and discrimination from noninfectious diseases. World J Radiol. 2014;6:779-93. https://doi.org/10.4329/wjr.v6.i10.779

21. Szydlowicz M, Matos O. *Pneumocystis* pneumonia in the COVID-19 pandemic era: Similarities and challenges. Trends Parasitol. 2021;37:859-62. https://doi.org/10.1016/j.pt.2021.07.010

22. Muñoz C, Zuluaga A, Restrepo A, Tobón A, Cano LE, González A. Molecular diagnosis and detection of *Pneumocystis jirovecii* DHPS and DHFR genotypes in respiratory specimens from Colombian patients. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012;72:204-13. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2011.11.015

23. Chotiprasitsakul D, Pewloungsawat P, Setthaudom C, Santanirand P, Pornsuriyasak P. Performance of real-time PCR and immunofluorescence assay for diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia in real-world clinical practice. PLoS ONE. 2020;15:e0244023. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244023

24. Bateman M, Oladele R, Kolls JK. Diagnosing *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: A review of current methods and novel approaches. Med Mycol. 2020;58:1015-28. https://doi.org/10.1093/mmy/myaa024

25. Perret T, Kritikos A, Hauser PM, Guiver M, Coste AT, Jaton K, *et al.* Ability of quantitative PCR to discriminate *Pneumocystis jirovecii* pneumonia from colonization. J Med Microbiol. 2020;69:705-11. https://doi.org/10.1099/jmm.0.001190

26. Gupta R, Mirdha BR, Guleria R, Kumar L, Samantaray JC, Agarwal SK, *et al.* Diagnostic significance of nested polymerase chain reaction for sensitive detection of *Pneumocystis jirovecii* in respiratory clinical specimens. Diagn Microbiol Infect Dis. 2009;64:381-8. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.04.008

27. Robert-Gangneux F, Belaz S, Revest M, Tattevin P, Jouneau S, Decaux O, *et al.* Diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in immunocompromised patients by real-time PCR: A 4-year prospective study. J Clin Microbiol. 2014;52:3370-6. https://doi.org/10.1128/JCM.01480-14

28. Smith D, Forbes A, Gazzard B. A simple scoring system to diagnose *Pneumocystis carinii* pneumonia in high-risk individuals. AIDS. 1992;6:337-8.

29. Nascimento CR, Lima MA, de Andrada-Serpa MJ, Espindola O, Leite AC, Echevarria-Lima J. Monocytes from HTLV-1-infected patients are unable to fully mature into dendritic cells. Blood. 2011;117:489-99. https://doi.org/10.1182/blood-2010-03-272690

30. Wakefield AE, Pixley FJ, Banerji S, Sinclair K, Miller RF, Moxon ER, *et al.* Amplification of mitochondrial ribosomal RNA sequences from *Pneumocystis carinii* DNA of rat and human origin. Mol Biochem Parasitol. 1990;43:69-76. https://doi.org/10.1016/0166-6851(90)90131-5

31. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics. 1977;33:159-74.

32. Elvin K, Linder E. Application and staining patterns of commercial anti-*Pneumocystis carinii* monoclonal antibodies. J Clin Microbiol. 1993;31:2222-4. https://doi.org/10.1128/jcm.31.8.2222-2224.1993

33. El Hodaky ES, Ouda N, Meshref M, El Bassiouny S, El Masry M, Gamal El Din H. Comparison of different methods to diagnose *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in children with haematological malignancies. Egypt J Med Microbiol. 2008;17:151-9.

34. Robberts FJ, Liebowitz LD, Chalkley LJ. Polymerase chain reaction detection of *Pneumocystis jirovecii*: Evaluation of 9 assays. Diagn Microbiol Infect Dis. 2007;58:385-92. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2007.02.014

35. Beard CB, Carter JL, Keely SP, Huang L, Pieniazek NJ, Moura IN, *et al.* Genetic variation in *Pneumocystis carinii* isolates from different geographic regions: implications for transmission. Emerg Infect Dis. 2000;6:265-72. https://doi.org/10.3201/eid0603.000306

36. Sing A, Roggenkamp A, Autenrieth IB, Heesemann J. *Pneumocystis carinii* carriage in immunocompetent patients with primary pulmonary disorders as detected by single or nested PCR. J Clin Microbiol. 1999;37:3409-10. https://doi.org/10.1128/JCM.37.10.3409-3410.1999

37. Tang X, Bartlett MS, Smith JW, Lu JJ, Lee CH. Determination of copy number of rRNA genes in *Pneumocystis carinii* f. sp. hominis. J Clin Microbiol. 1998;36:2491-4. https://doi.org/10.1128/JCM.36.9.2491-2494.1998

Archivos suplementarios

Supplementary table 1. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia probability based on clinical features following a scoring system for high-risk individuals

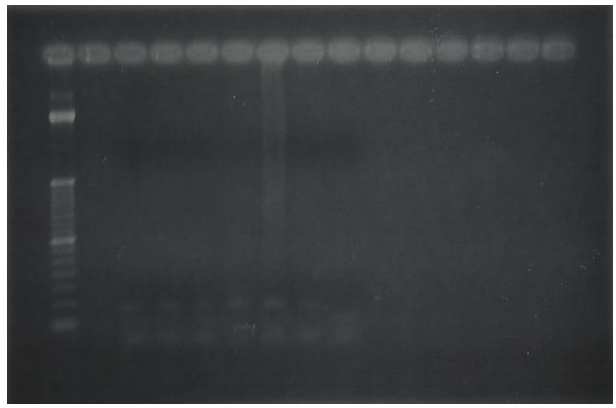
Feature	Patients n	Score
Starting score	40	+3
Clinical symptoms		
Yes	9	+6
No	31	-9
No prophylaxis		
Yes	27	+7
No	13	-9
Infiltrates in torax radiography		
Yes	26	+12
No	14	-6
Desaturation		
Yes	16	+9
No	24	-13
Range of possible scores		-34 to +37

Supplementary table 2. Individual results of the patients included in this study (specimen, T CD4+ count, viral load, direct immunofluorescence, nested-PCR, real-time PCR and Pneumocystis jirovecii pneumonia probability)

Sample number	Specimen	T-CD4+	VL	DIF	Nested PCR	VIASURE Real-time PCR	PCP Probability
1	TW	51	NA	0	0	0	<23%
2	TW	51	NA	0	0	0	98%
3	TW	51	NA	0	0	0	98%
4	TW	189	<40	0	0	0	>87%
5	TW	110	544.934	0	0	0	<23%
6	IS	305	2.427.730	0	1	1	>82%
7	TW	7	116.689	0	1	1	98%
8	IS	112	850.578	0	1	1	98%
9	IS	8	350.638	1	1	1	>82%
10	IS	200	10.745	0	0	0	<23%
11	IS	308	NA	0	0	0	<23%
12	IS	43	NA	0	0	0	<23%
13	IS	62	NA	0	0	0	<23%
14	IS	70	NA	0	0	1	<23%
15	IS	64	NA	0	0	0	<23%
16	SS	60	NA	1	1	1	>82%
17	BAL	402	333.849	0	1	1	<23%
18	IS	32	177.036	1	1	1	>82%
19	IS	39	NA	1	1	1	98%
20	TW	469	48	0	0	0	<23%
21	IS	42	NA	0	0	1	98%
22	IS	46	<40	0	0	0	<23%
23	IS	68	4.740	0	0	1	>82%
24	IS	70	NA	0	0	0	>82%
25	TW	67	NA	0	0	0	>82%
26	IS	98	45.904	0	0	0	>82%
27	IS	92	NA	0	0	0	<23%
28	BAL	39	3.193	0	0	0	<23%
29	TW	48	5.002	0	0	0	98%
30	SS	130	25.940	0	0	0	<23%
31	SS	86	580.521	0	0	0	<23%
32	IS	35	NA	0	0	0	98%
33	BAL	238	1.628	0	1	1	98%
34	TW	111	1.689	1	1	1	>87%
35	SS	0	718.648	1	1	1	98%
36	IS	64	NA	0	0	0	<23%
37	BAL	128	NA	0	0	0	<23%
38	BAL	238	1.628	0	1	1	98%
39	TW	79	262	0	0	0	<23%
40	IS	72	NA	0	0	0	<23%

PCP: *Pneumocystis jirovecii* pneumonia; DIF: Direct Immunofluorescence; T-CD4+: T-CD4 count; VL: Viral load; IS: Induced sputum; BAL: Bronchoalveolar lavage; TW: Tracheal wash; SS: Spontaneous; 1 = positive; 0 = negative

Supplementary figure 1. Representative image of the human β-globin gene partial amplification in the studied samples



Biomédica 2023;43(Supl.1):267-77
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.6943

Topic review

Disaster mycology

Daniel F. Q. Smith, Arturo Casadevall

W. Harry Feinstone Department of Molecular Microbiology and Immunology, Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, Baltimore MD, USA

Natural and human-made disasters have long played a role in shaping the environment and microbial communities, also affecting non-microbial life on Earth. Disaster microbiology is a new concept based on the notion that a disaster changes the environment causing adaptation or alteration of microbial populations –growth, death, transportation to a new area, development traits, or resistance– that can have downstream effects on the affected ecosystem. Such downstream effects include blooms of microbial populations and the ability to colonize a new niche or host, cause disease, or survive in former extreme conditions. Throughout history, fungal populations have been affected by disasters. There are prehistoric archeological records of fungal blooms after asteroid impacts and fungi implicated in the fall of the dinosaurs. In recent times, drought and dust storms have caused disturbance of soil fungi, and hurricanes have induced the growth of molds on wet surfaces, resulting in an increased incidence of fungal disease. Probably, the anticipated increase in extreme heat would force fungi adaptation to survive at high temperatures, like those in the human body, and thus be able to infect mammals. This may lead to a drastic rise of new fungal diseases in humans.

Key words: Mycology; fungi; climate change; *Candida auris*; natural disasters.

Micología de desastres

Los desastres naturales o los causados por el hombre impactan la formación de ecosistemas y comunidades microbianas, y también afectan las formas de vida no microbianas. Este concepto es conocido como “microbiología de desastres”, una subespecialización de la microbiología, basada en los cambios ambientales generados por un desastre y las posibles adaptaciones o alteraciones de las poblaciones microbianas –crecimiento, muerte, trasporte a una nueva región, o adquisición de resistencia o de nuevas características– que influirán en el moldeamiento del ecosistema transformado. Algunos de los efectos de estas adaptaciones pueden ser: el surgimiento de poblaciones microbianas, la habilidad de colonizar nuevos nichos u huéspedes, la generación de nuevas enfermedades, o el crecimiento de microorganismos en condiciones que antes eran “extremas” para ellos.
A lo largo de la historia, varias poblaciones de hongos han sido afectadas por desastres. Existen registros arqueológicos prehistóricos que evidencian la presencia y el crecimiento de hongos luego del impacto de asteroides, y otros de hongos relacionados con la extinción de los dinosaurios. Actualmente, las sequías y las tormentas de polvo causan perturbaciones en las comunidades de hongos del suelo, y los huracanes inducen el crecimiento de hongos filamentosos en superficies húmedas, lo que aumenta la cantidad de enfermedades por hongos. Además, con el aumento de las temperaturas extremas es posible que los hongos puedan adaptarse para sobrevivir a temperaturas más altas, equivalentes a las temperaturas corporales, y nuevas especies puedan infectar mamíferos. Esto puede llevar a un aumento drástico de las infecciones fúngicas en humanos.

Palabras clave: micología; hongos; cambio climático; *Candida auris*; desastres naturales.

Disaster microbiology is a newly described field that seeks to understand how natural disasters (such as hurricanes, tornadoes, tsunamis, droughts, and extreme heat) and human-made disasters (such as pollution, war, mechanical failures, and nuclear reactor meltdowns) affect microorganisms, and how these microbial changes affect ecosystems and human health (1,2). We could define disaster mycology as the study of how natural and human-made disasters impact fungal populations, for example, by affecting fungal properties such as stress adaptations, virulence, and their growth in new niches and locations that could impact human, animal, and plant health.

Received: 15/03/2023
Accepted: 08/06/2023
Published: 13/06/2023

Citation:
Smith DF, Casadevall A. Disaster mycology. Biomédica. 2023;43(Supl.1):267-77. https://doi.org/10.7705/biomedica.6943

Corresponding author:
Arturo Casadevall, W. Harry Feinstone Department of Molecular Microbiology and Immunology, Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, Baltimore, Maryland, 21205, USA
Phone number: (1) (410) 502 8915
acasade1@jh.edu

Author contributions:
Daniel F. Q. Smith and Arturo Casadevall contributed to the conceptualization, writing, and editing of the manuscript.

Funding:
Daniel F. Q. Smith and Arturo Casadevall were supported in part by NIH grants R01 AI162381, R01 AI152078, and R01 HL059842. Daniel F. Q. Smith was supported in part by NIH grant T32 AI007417.

Conflicts of interest:
No conflict of interest is reported.

Prehistory

Fungal communities have been directly impacted by natural disasters for hundreds of millions of years. The first fossil records of fungi date from at least 800 million years ago to potentially as far back as 2.4 billion years ago (3). Fossils of filamentous microbes, consistent with fungi, are growing on an impact crater dating to 458 million years ago during the Ordovician period (4). It is possible that this fungal colonization, following the meteor impact, occurred due to the heat and hydrocarbons provided by the impact and the resulting hydrothermal system. This is an early example in which a natural disaster permitted the growth and colonization of a fungal species in a new environmental niche.

Following the largest extinction event in global history, the Permian-Triassic extinction, or the "Great Dying," approximately 252 million years ago, there was an apparent surge of fungal growth. Evidence for this reported fungal growth comes from a fossil record of *Reduviasporonites* spores, a layer with a thickness ranging from centimeters to almost a meter, containing scarce other organic matter or fossils (5,6). However, this interpretation of the fossil record remains controversial due to physical and biochemical similarities between algal and fungal spores (7). Other hypotheses propose that these fungal species increased in prevalence due to the massive amount of decaying biomass following the extinction event (8); or that the ecological shifts following volcanic eruptions and drought during the Permian extinction event weakened the immune systems of plants and made them more susceptible to infection with *Reduviasporonites,* as occurs with modern plants following natural disasters, resulting in the loss of forests due to fungal disease (8). Gueidan *et al.* molecularly and paleontologically dated the origin of rock-inhabiting fungi to the Triassic period during and after the Permian extinction (9). This mass extinction event may have reduced competition for slow-growing rock-inhabiting fungi (9), the formation of the landmass Pangea caused widespread and prolonged droughts, spurring the evolution of relatively stress-resistant fungi that inhabited rocks and were capable of growing in nutrient-poor conditions (9). The ancestors of these rock-inhabiting fungi are still found in nutrient-poor ecosystems today.

Similarly, the geological boundary that corresponds to the time between the Cretaceous and Tertiary periods, 65 million years ago, known as the K-T boundary, contains a layer of soot and fungal spores (10). The spike of fungal spores coincides with the extinction of dinosaurs, and an iridium spike suggests a meteor collision, likely at the Chicxulub impact, off the coast of what is now the Yucatan peninsula. Together, these features paint a picture of a meteor impact causing a massive loss of plants and animals, which resulted in a proliferation of fungi as decomposers. Such findings have also led to a hypothesis that the fungal bloom after the massive ecosystem disruption, and the death at the end of the Cretaceous, conduced to the death of surviving dinosaurs on Earth and the survival and proliferation of mammals due to its resistance to fungi (11-13).

This hypothesis, named Fungal-Infection Mammalian-Selection posits that the global cooling following the K-T cataclysm affected dinosaurs' thermoregulation, causing them to suffer cooler body temperatures than expected. Dinosaurs were supposed to be mesotherms, meaning their body temperatures varied according to body size, baseline metabolic rate, and environmental conditions. These conditions altered the dinosaurs' control

over their body temperature, unlike mammals who are endothermic (14,15). As a result, smaller dinosaurs and dinosaurs in colder climates may have had lower baseline body temperatures (14,15).

These body temperatures, influenced by post-disaster famine and cooling conditions, could have led to fungal proliferation. Most known modern-day fungi do not survive at higher body temperatures (greater than 37 ˚C), which provide a natural resistance to fungal infection (16). That temperature barrier blurring could have predisposed dinosaurs to fungal disease (11). Bony lesions consistent with chronic fungal disease have recently been described in dinosaurs' bone fossils (17). However, whether fungal diseases contributed to the demise of the dinosaurs is unknown. The ecological catastrophe associated with the meteorite impact may have been sufficient to eventually cause dinosaurs to go extinct. The findings of a fungal bloom following the calamity would have exposed any survivors to large *inocula* of fungal spores, placing an additional stress on those remaining alive. Conversely, the Fungal-Infection Mammalian-Selection hypothesis proposes that mammals, which can retain their body temperature homeostasis better than large reptiles, survived and became a dominant class of life on Earth because their temperatures protected them against fungal diseases after the K-T boundary calamity.

The complete effects of such prehistoric disasters on fungal populations, and thus on global ecosystems, on plant or animal health, or on the course of fungal evolution, are hard to estimate. Theories can be suggested from fossil records, isotropic analysis, and genetic histories, but is unknown the extent of the catastrophe's consequences for mycology.

Recent history

Natural disasters have affected fungal populations since the end of the age of dinosaurs, through the age of mammals, and throughout human civilization. However, detailed mycological effects of disasters have rarely been described. Some epidemiologists suggested that the tenth plague described in the Book of Exodus, death of the first-born son, is actually related to disaster mycology (18,19). They hypothesized that the hail from the seventh plague would have destroyed crops, causing moldy wheat and mycotoxin production. The ingestion of toxins induced illness and death. Beyond using fungal agents to interpret historical or religious events, there are scarce examples tracing the fungal adaptations or alterations as consequence of disasters. Until recent centuries, fungal diseases began to be recognized, diagnosed, and named.

Disasters, changes in host susceptibility, and the rise of fungal diseases

The second half of the 20th century ushered in an age of fungal diseases unprecedented in human history, partly due to the erosion of the immune system in some populations (20). Specifically, those decades saw the rise of the HIV/AIDS epidemic, proliferation of immunosuppressive anti-cancer chemotherapies, and immunosuppressive steroids used to treat transplant recipients and patients with other chronic and inflammatory diseases. Some of these conditions may arise in part from disasters. For instance, the human-made disaster of air pollution, with petrochemicals and particulate matter, resulted in elevated rates of lung cancer and acute myeloid leukemia (21-23). Exposure to a human-made radiation disaster, such as the fallout following the atomic bombings in Hiroshima and Nagasaki, increased the incidence of acute myeloid leukemia in the population (24). Rates of acute myeloid

leukemia and other hematological malignancies intensified for people who lived near the site of the Chernobyl nuclear power plant disaster in Ukraine or helped in decontamination efforts (25,26).

Treatment for those cancers involves immunosuppressive immunotherapies, increasing the risk of fungal disease development, while acute myeloid leukemia results in immunosuppression because it affects all the myeloid-derived blood cells, including important immune cells during fungal infections such as macrophages, monocytes, and neutrophils. Additionally, acute myeloid leukemia can be treated with bone-marrow transplantation accompanied by a previous corticosteroid treatment to prevent transplant rejection, but this can cause additional immunosuppression. Among patients with hematological malignancies, up to 4% develop invasive fungal infections (27). A study about the prevalence of fungal infections in hospitalized children with malignancies found that up to 7% developed fungal infections, predominately associated with acute myeloid leukemia and neutropenia (28). Natural disasters are defined by the United States Federal Emergency Management Agency (FEMA) as, “the negative impact(s) following an actual occurrence of natural hazard(s) in the event that it significantly harms a community (29).” While FEMA does not list pandemics, epidemics, or plagues as a natural hazard or natural disaster, De Rubeis *et al*. have recently posited that pandemics and epidemics fall under the category of natural disaster as they arise from a natural origin and cause sudden, significant, and multifaceted harm to communities (30).

With this in mind, we would consider the HIV/AIDS epidemic and the continued spread of HIV (Human Immunodeficiency Virus) as a natural disaster. An HIV-untreated infection could result in the loss of CD4+ T-cells, and ultimately, in a severely immunocompromised status. In this state, individuals can develop opportunistic infections and disease manifestations linked to the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Many common opportunistic infections are invasive fungal infections caused by *Pneumocystis jirovecii, Cryptococcus neoformans, Candida albicans,* or *Histoplasma* spp. Out of early 398 AIDS-related deaths in the United States, 240 occurred in patients infected exclusively with *P. jirovecii,* before the introduction of effective antiretroviral therapies (31). In recent estimates, approximately 50% of AIDS-related deaths were due to invasive fungal infections, mainly in patients not undergoing highly active retroviral therapy, with nearly one million deaths occurring annually (32).

Lately, with the emergence of SARS-CoV-2 in late 2019 and the subsequent COVID-19 pandemic, we saw an additional instance where a pandemic disaster resulted in an increase of fungal infections. Fungal superinfections have been noted in patients following severe COVID19 cases, particularly those caused by *Aspergillus, Rhizopus, Cryptococcus,* and *Candida* species (33,34). Cases of invasive fungal infection after severe COVID-19 are associated with certain risk factors, including immunosuppressive corticosteroid treatments to treat severe symptoms and inflammatory immune responses, prolonged ventilation and intubation, and underlying conditions such as cancer (34). In intubated COVID-19 patients, the frequency of COVID-associated pulmonary aspergillosis was 2-15% (35). Since the beginning of the COVID19 pandemic in the United States, fungal infections death rate was from 1.2 per 100,000 people per year to 1.8 per 100,000 per year (36). Additionally, 21.9% of deaths caused by fungal infections in 2020-2021 in the United States were associated with COVID-19 infections (36).

Disasters and alterations to fungal communities in the 20th and 21st centuries

While some examples of pollution, radiation, war, and pandemic disasters have eroded the host immune response and made people more susceptible to fungi, other disasters have altered fungi in a way that puts them in direct contact with people, thus causing disease. For example, during earthquakes, dust storms, and droughts in the American Southwest, *Coccidioides* spp. can become aerosolized from displaced soil and inhaled by people in the affected areas. These resulted in localized outbreaks of coccidioidomycoses, in the cases of a windstorm in California in 1977, the Northridge Earthquake in California in 1994, and repeated droughts in Arizona throughout the late 1990s (37-39). Similarly, natural disasters such as tornadoes, like the ones occurring in Joplin, Missouri, in 2011, can cause severe wounds that become infected when exposed to environmental fungi in debris and the air, leading to serious fungal infections such as mucormycosis (40). In other instances, floodings, such as occurred during the East Japanese tsunami of 2011 and the Indian Ocean tsunami of 2004, also produce the aerosolization of soil and ground fungi, provoking “tsunami lung”, which consists of severe fungal infections like aspergillosis, scedosporiosis, and mucormycosis (41,42).

In other instances, natural disasters can shift the environmental niches of fungi and lead to their growth in new areas, causing new exposure and subsequent disease. For example, a hypothesis stated that the Great Alaskan Earthquake of 1964 followed by a tsunami in the Pacific Ocean caused fungi, such as *Cryptococcus gattii,* to wash ashore and colonize the land of the Pacific Northwest of the United States and Canada, including Vancouver Island (43). The phylogenetic analysis shows a divergence of the Pacific Northwest environmental samples, approximately between 1930 and 1950 and an association between the tsunami-struck location and the incidence of *C. gattii* infections and its environmental isolations. The *C. gattii* that may have colonized the Pacific Northwest coast has caused periodic *C. gattii* outbreaks since 1999 in seemingly immunocompetent individuals (43,44). Other flooding events, including hurricane Katrina in 2005 and hurricane María in 2017, provoked water damage to structures, which induced new fungal growth, usually in the form of mold (45-47). This new mold growth can generate serious health issues for residents, including asthma, sick building syndrome, or other allergic reactions. Following hurricane Harvey in 2017, invasive mold infections in Houston, Texas, increased even in persons who would not typically be considered at risk for invasive fungal diseases (48).

In the 20th and 21st centuries, we have seen instances of fungal infections following human-made or hybrid disasters. In 1997, during the Maccabiah Games in Israel, the Maccabiah Bridge spanning the Yarkon River collapsed while the athletes of the Australian delegation were crossing. This river was heavily contaminated with waste and pollution (49). Following the collapse, several members of the delegation inhaled aerosolized *Pseudallescheria boydii* (*Scedosporium apiospermum)* fungus, resulting in systemic infections and death of four individuals (49,50). Other instances of fungal infections have arisen from human-caused disasters in the form of contaminated medical supplies. Following the 2004 Indian Ocean tsunami, some medical supplies, including spinal anesthesia, were kept in sub-optimal conditions. Anesthesia supplies became contaminated with *Aspergillus fumigatus,* which resulted in an outbreak of fungal meningitis in women who underwent caesarean section surgery (51). In 2012-2013, several

batches of preservative-free methylprednisolone, typically injected epidurally, were contaminated by the fungus *Exserohilum rostratum* due to improper sterilization and unsafety protocols by the manufacturing company. This contamination led to an outbreak of 749 cases of *E. rostratum* infection, including 391 with fungal meningitis, resulting in approximately 40 deaths (52,53). In Summer and Fall 2022, there were similar cases of fungal meningitis in Durango, Mexico: the use of epidermal anesthesia contaminated with the fungus *Fusarium solani* caused 77 cases and 29 deaths (54).

The future

The past century saw the rise of fungal diseases in humans, primarily due to alterations in the fungal environment and their hosts, including the weakening of our immune systems through immunosuppressive medical treatments, the HIV/AIDS epidemic, or fungal exposure following disasters. As climate change accelerates, in the next century and beyond, without mitigation efforts, we can expect increasing flooding disasters, droughts, extreme heat and heatwaves, and increased emergence and incidence of pandemic or epidemic-capable pathogens (20,55,56). These disasters, caused by anthropogenic climate change, are predicted to cause shifts in the environmental niches of some fungi, via drought and flooding (57), while other disasters, including extreme heat, can drive the adaptation of fungi to survive at human body temperature and thus become potential pathogens (58,59).

Fungal adaptations to a changing climate

One feature of mammals, including humans, is endothermy. It allows us to maintain a high body temperature, which has protected us from being infected by many fungal species, even during immune deficiencies (16). However, with increasing global temperatures and more frequent and longer duration of extreme heat events, it is hypothesized that fungi will gain thermotolerance and be able to persist at human physiological body temperature (59,60). The adaptation to extreme heat in the coming decades may result in the emergence of more fungal species capable of causing disease in humans. Analysis of the thermotolerance of fungal species deposited in the Westerdijk Fungal Biodiversity Institute collection showed an increase in the maximal growth temperature for basidiomycetous yeasts over recent decades, consistent with adaptations to a warming climate (61). It may have already occurred with *Candida auris,* first recognized clinically in 2009, and genetically distinct clades described almost simultaneously across the globe (58). The isolates of *C. auris* recovered during recent outbreaks of the fungus appear to have diverged within the past 40 years, in line with the rising global temperatures (62), while closely related fungal species do not share the same degree of thermotolerance as *C. auris* (58). *C. auris* poses an ominous threat, not only due to its durability and high resistance to drugs and environmental stress, but also because it may foretell what the 21st and 22nd centuries' infectious disease landscape has in store.

Alterations to fungal ecosystems

Heat and climate change also can result in droughts and changing of ecosystem boundaries. Some prediction affirms that the increased frequency of drought and dust-storm conditions in the American Southwest could dramatically extend the geographical distribution of *Coccidioides,* increasing the risk of millions of people suffering coccidioidomycosis in the coming decades (57,63). Similarly, changing weather patterns can

modify the geographical ranges of animal reservoirs and vectors carrying microorganisms and viruses that can cause diseases (55,56), potentially leading to new epidemics or pandemics. As we have seen with the HIV/AIDS, influenza (64), and COVID-19 public health disasters, even the spread of non-fungal pathogens can lead to fungal infections burgeoning and disease. Lastly, in the 21st century, tropical cyclones are expected to increase in number and intensity as ocean temperatures rise (65,66). These flooding disasters increase the risk of mold damage, resulting in allergic diseases like asthma and overloading the healthcare system with infectious diseases-sick people. Additionally, as in the case of *C. gattii* colonization of the Pacific Northwest, described above (43), as the frequency and intensity of floodings continue, it could result in the colonization of land with marine-dwelling fungi. These aquatic fungi may have the ability to cause disease in humans or develop adaptations over time that enable virulence.

Concluding remarks

Throughout time, disasters have impacted fungi and have caused them to adapt to new environments and inhabit new niches. Following global cataclysms and mass extinctions, fungi flourished (6,10), which could have led to the extinction of the Age of Reptiles (11), but also helped recycle nutrients in the environment and re-established life itself. In the past century, natural and human-made disasters have triggered isolated and worldwide outbreaks of fungal infections. In the coming century, as disasters continue to intensify and ecosystems shift due to climate change, we can expect fungal outbreaks, and emerging fungal diseases to likewise intensify and shift. As disasters continue to destroy, fungi will continue to adapt, helping break down ecosystems and rebuilding them. The stories of fungi include disasters, but also stories of recovery.

Acknowledgement

We would like to thank Dr. Ángela Restrepo for her decades of commitment and dedication to the field of medical mycology. We would like to thank Paola Ramos Irizarry for her very helpful editing and translation assistance. Arturo Casadevall and Daniel Smith were supported in part by NIH grants R01 AI162381, R01 AI152078, and R01 HL059842. Daniel Smith was supported in part by NIH grant T32 AI007417.

References

1. Smith DFQ, Casadevall A. Disaster microbiology—a new field of study. mBio. 2022;13:e01680-22. https://doi.org/10.1128/mbio.01680-22
2. American Society for Microbiology. Microbes and Climate Change – Science, People & Impacts: Report on an American Academy of Microbiology Virtual Colloquium held on Nov. 5, 2021. Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 2022. Consulted: May 1st, 2022. Available from: https://asm.org/Reports/Microbes-Climate-Change-Science,-People,-Impacts
3. Berbee ML, Strullu-Derrien C, Delaux PM, Strother PK, Kenrick P, Selosse MA, *et al*. Genomic and fossil windows into the secret lives of the most ancient fungi. Nat Rev Microbiol. 2020;18:717-30. https://doi.org/10.1038/s41579-020-0426-8
4. Ivarsson M, Broman C, Sturkell E, Ormö J, Siljeström S, van Zuilen M, *et al*. Fungal colonization of an Ordovician impact-induced hydrothermal system. Sci Rep. 2013;3:3487. https://doi.org/10.1038/srep03487
5. Rampino MR, Eshet Y. The fungal and acritarch events as time markers for the latest Permian mass extinction: An update. Geoscience Frontiers. 2018;9:147-54. https://doi.org/10.1016/j.gsf.2017.06.005

6. Steiner MB, Eshet Y, Rampino MR, Schwindt DM. Fungal abundance spike and the Permian-Triassic boundary in the Karoo Supergroup (South Africa). Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol. 2003;194:405-14. https://doi.org/10.1016/S0031-0182(03)00230-X
7. Hochuli PA. Interpretation of "fungal spikes" in Permian-Triassic boundary sections. Glob Planet Change. 2016;144:48-50. https://doi.org/10.1016/j.gloplacha.2016.05.002
8. Visscher H, Sephton MA, Looy CV. Fungal virulence at the time of the end Permian biosphere crisis? Geology. 2011;39:883-6. https://doi.org/10.1130/G32178.1
9. Gueidan C, Ruibal C, de Hoog GS, Schneider H. Rock-inhabiting fungi originated during periods of dry climate in the late Devonian and middle Triassic. Fungal Biol. 2011;115:987-96. https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.04.002
10. Vajda V, McLoughlin S. Fungal proliferation at the Cretaceous-Tertiary boundary. Science. 2004;303:1489. https://doi.org/10.1126/science.1093807
11. Casadevall A. Fungal virulence, vertebrate endothermy, and dinosaur extinction: Is there a connection? Fungal Genet Biol. 2005;42:98-106. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2004.11.008
12. Casadevall A. Fungi and the rise of mammals. PLOS Pathog. 2012;8:e1002808. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002808
13. Casadevall A, Damman C. Updating the fungal infection-mammalian selection hypothesis at the end of the Cretaceous Period. PLOS Pathog. 2020;16:e1008451. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008451
14. Gillooly JF, Allen AP, Charnov EL. Dinosaur fossils predict body temperatures. PLOS Biol. 2006;4:e248. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040248
15. Grady JM, Enquist BJ, Dettweiler-Robinson E, Wright NA, Smith FA. Evidence for mesothermy in dinosaurs. Science. 2014;344:1268-72. https://doi.org/10.1126/science.1253143
16. Robert VA, Casadevall A. Vertebrate endothermy restricts most fungi as potential pathogens. J Infect Dis. 2009;200:1623-6. https://doi.org/10.1086/644642
17. Woodruff DC, Wolff EDS, Wedel MJ, Dennison S, Witmer LM. The first occurrence of an avian-style respiratory infection in a non-avian dinosaur. Sci Rep. 2022;12:1954. https://doi.org/10.1038/s41598-022-05761-3
18. Marr JS, Malloy CD. An epidemiologic analysis of the ten plagues of Egypt. Caduceus. 1996;12:724.
19. Marr JS, Malloy CD. Effects of mycotoxins in health and disease. JAMA. 1997;278:1062-3. https://doi.org/1010.1001/jama.278.13.1062
20. Casadevall A. Climate change brings the specter of new infectious diseases. J Clin Invest. 2020;130:553-5. https://doi.org/10.1172/JCI135003
21. Filippini T, Hatch EE, Rothman KJ, Heck JE, Park AS, Crippa A, *et al.* Association between outdoor air pollution and childhood leukemia: A systematic review and dose–response meta-analysis. Environ Health Perspect. 2019;127:46002. https://doi.org/10.1289/EHP4381
22. Yu CL, Wang SF, Pan PC, Wu MT, Ho CK, Smith TJ, *et al.* Residential exposure to petrochemicals and the risk of leukemia: Using geographic information system tools to estimate individual-level residential exposure. Am J Epidemiol. 2006;164:200-7. https://doi.org/10.1093/aje/kwj182
23. Pope III CA, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, *et al.* Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. JAMA. 2002;287:1132-41. https://doi.org/10.1001/jama.287.9.1132
24. Bizzozero OJ, Johnson KG, Ciocco A, Hoshino T, Itoga T, Toyoda S, *et al.* Radiation-related leukemia in Hiroshima and Nagasaki, 1946-1964. N Engl J Med. 1966;274:1095-101. https://doi.org/10.1056/NEJM196605192742001
25. Gluzman D, Imamura N, Sklyarenko L, Nadgornaya V, Zavelevich M, Machilo V. Patterns of hematological malignancies in Chernobyl clean-up workers (1996-2005). Exp Oncol. 2006;28:60-3.
26. Koval SV, Gluzman DF, Sklyarenko LM, Ivanivska TS, Zavelevich MP, Philchenkov AA, *et al.* Hematological malignancies in Ukraine in post-Chernobyl era: Sources of data and their preliminary analysis. Ann Hematol. 2020;99:1543-50. https://doi.org/10.1007/s00277-020-04076-5

27. Pagano L, Caira M, Candoni A, Offidani M, Fianchi L, Martino B, *et al*. The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: The SEIFEM-2004 study. Haematologica. 2006;91:1068-75.

28. Mor M, Gilad G, Kornreich L, Fisher S, Yaniv I, Levy I. Invasive fungal infections in pediatric oncology. Pediatr Blood Cancer. 2011;56:1092-7. https://doi.org/10.1002/pbc.23005

29. Federal Emergency Management Agency. Natural hazards. National risk index. Consulted: Jan 6, 2023. Available from: https://hazards.fema.gov/nri/natural-hazards

30. Rubeis VD, Lee J, Anwer MS, Yoshida-Montezuma Y, Andreacchi AT, Stone E, *et al*. Impact of disasters, including pandemics, on cardiometabolic outcomes across the lifecourse: A systematic review. BMJ Open. 2021;11:e047152. https://doi.org/110.1136/bmjopen-2020-047152

31. Jaffe HW, Bregman DJ, Selik RM. Acquired immune deficiency syndrome in the United States: The First 1,000 Cases. J Infect Dis. 1983;148:339-45. https://doi.org/10.1093/infdis/148.2.339

32. Armstrong-James D, Meintjes G, Brown GD. A neglected epidemic: fungal infections in HIV/AIDS. Trends Microbiol. 2014;22:120-7. https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.01.001

33. Basile K, Halliday C, Kok J, Chen SCA. Fungal infections other than invasive aspergillosis in COVID-19 patients. J Fungi (Basel). 2022;8:58. https://doi.org/10.3390/jof8010058

34. Hoenigl M, Seidel D, Sprute R, Cunha C, Oliverio M, Goldman GH, *et al.* COVID19-associated fungal infections. Nat Microbiol. 2022;7:1127-40. https://doi.org/10.1038/s41564-022-01172-2

35. Prattes J, Wauters J, Giacobbe DR, Salmanton-García J, Maertens J, Bourgeois M, *et al*. Risk factors and outcome of pulmonary aspergillosis in critically ill coronavirus disease 2019 patients — a multinational observational study by the European Confederation of Medical Mycology. Clin Microbiol Infect. 2022;28:580-7. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.08.014

36. Gold JAW, Ahmad FB, Cisewski JA, Rossen LM, Montero AJ, Benedict K, *et al*. Increased deaths from fungal infections during the COVID-19 pandemic—National Vital Statistics System, United States, January 2020–December 2021. Clin Infect Dis. 2022;ciac489. https://doi.org/10.1093/cid/ciac489

37. Centers for Disease Control and Prevention. Increase in coccidioidomycosis--Arizona, 1998-2001. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2003;52:109-12.

38. Flynn NM, Hoeprich PD, Kawachi MM, Lee KK, Lawrence RM, Goldstein E, *et al*. An unusual outbreak of windborne coccidioidomycosis. N Engl J Med. 1979;301:358-61. https://doi.org/10.1056/NEJM197908163010705

39. Schneider E, Hajjeh RA, Spiegel RA, Jibson RW, Harp EL, Marshall GA, *et al*. A Coccidioidomycosis outbreak following the Northridge, Calif, Earthquake. JAMA. 1997;277:904-8

40. Fanfair RN, Benedict K, Bos J, Bennett SD, Lo YC, Adebanjo T, *et al*. Necrotizing cutaneous mucormycosis after a Tornado in Joplin, Missouri, in 2011. N Engl J Med 2012;367:2214-25. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1204781

41. Kawakami Y, Tagami T, Kusakabe T, Kido N, Kawaguchi T, Omura M, *et al*. Disseminated aspergillosis associated with Tsunami lung. Respir Care. 2012;57:1674-8. https://doi.org/10.4187/respcare.01701

42. Benedict K, Park BJ. Invasive fungal infections after natural disasters. Emerg Infect Dis. 2014;20:349-55. https://doi.org/10.3201/eid2003.131230

43. Engelthaler DM, Casadevall A. On the emergence of *Cryptococcus gattii* in the Pacific Northwest: Ballast tanks, tsunamis, and black swans. mBio. 2019;10:e02193-19. https://doi.org/10.1128/mBio.02193-19

44. Espinel-Ingroff A, Kidd SE. Current trends in the prevalence of *Cryptococcus gattii* in the United States and Canada. Infect Drug Resist. 2015;8:89-97. https://doi.org/10.2147/IDR.S57686

45. Vélez-Torres LN, Bolaños-Rosero B, Godoy-Vitorino F, Rivera-Mariani FE, Maestre JP, Kinney K, *et al*. Hurricane María drives increased indoor proliferation of filamentous fungi in San Juan, Puerto Rico: A two-year culture-based approach. Peer J. 2022;10:e12730. https://doi.org/10.7717/peerj.12730

46. Cummings KJ, Cox-Ganser J, Riggs MA, Edwards N, Hobbs GR, Kreiss K. Health effects of exposure to water-damaged New Orleans homes six months after hurricanes Katrina and Rita. Am J Public Health. 2008;98:869-75. https://doi.org/10.2105/AJPH.2007.118398

47. Bolaños-Rosero B, Hernández-González X, Cavallín-Calanche HE, GodoyVitorino F, Vesper S. Impact of hurricane Maria on mold levels in the homes of Piñones, Puerto Rico. Air Qual Atmos Health. 2022;16:661-668. https://doi.org/10.1007/s11869-022-01297-7

48. Toda M, Williams S, Jackson BR, Wurster S, Serpa JA, Nigo M, *et al.* Invasive mold infections following Hurricane Harvey — Houston, Texas. Open Forum Infect Dis. 2023;10:ofad093. https://doi.org/10.1093/ofid/ofad093

49. Tal A. Pollution in a promised land: An environmental history of Israel. Pollution in a Promised Land. University of California Press; 2002. Consulted: Jan 7, 2023. Available from: https://www.degruyter.com/document/doi/10.1525/9780520936492/html

50. The Times of Israel. 25 years later, today's Australian delegation remembers the Maccabiah Bridge tragedy. Consulted: Jan 7, 2023. Available from: https://www.timesofisrael.com/25-years-later-todays-australian-delegation-remembers-the-maccabiah-bridge-tragedy/

51. Gunaratne PS, Wijeyaratne CN, Chandrasiri P, Sivakumaran S, Sellahewa K, Perera P, *et al.* An outbreak of *Aspergillus* meningitis following spinal anaesthesia for caesarean section in Sri Lanka: a post-tsunami effect. Ceylon Med J. 2006;51:137-42. https://doi.org/10.4038/cmj.v51i4.1142

52. Smith RM, Derado G, Wise M, Harris JR, Chiller T, Meltzer MI, *et al.* Estimated deaths and illnesses averted during fungal meningitis outbreak associated with contaminated steroid injections, United States, 2012–2013. Emerg Infect Dis. 2015;21:933-40. https://doi.org/10.3201/eid2106.141558

53. Smith RM, Schaefer MK, Kainer MA, Wise M, Finks J, Duwve J, *et al.* Fungal infections associated with contaminated methylprednisolone injections. N Engl J Med. 2013;369:1598-609. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1213978

54. Secretaría de Salud Gobierno de México. Comunicado Técnico Diario Meningitis Histórico 2022. Consulted: Jan 8, 2023. Available from: http://www.gob.mx/salud/documentos/comunicado-tecnico-diario-meningitis-historico-2022

55. Mora C, McKenzie T, Gaw IM, Dean JM, von Hammerstein H, Knudson TA, *et al.* Over half of known human pathogenic diseases can be aggravated by climate change. Nat Clim Chang. 2022;12:869-75. https://doi.org/10.1038/s41558-022-01426-1

56. Baker RE, Mahmud AS, Miller IF, Rajeev M, Rasambainarivo F, Rice BL, *et al.* Infectious disease in an era of global change. Nat Rev Microbiol. 2022;20:193-205. https://doi.org/10.1038/s41579-021-00639-z

57. Gorris ME, Treseder KK, Zender CS, Randerson JT. Expansion of coccidioidomycosis endemic regions in the United States in response to climate change. GeoHealth. 2019;3:308-27. https://doi.org/10.1029/2019GH000209

58. Casadevall A, Kontoyiannis DP, Robert V. On the emergence of *Candida auris*: Climate change, azoles, swamps, and birds. mBio. 2019;10: e01397-19 https://doi.org/10.1128/mBio.01397-19

59. Gange AC, Gange EG, Mohammad AB, Boddy L. Host shifts in fungi caused by climate change? Fungal Ecology. 2011;4:184-90.

60. Garcia-Solache MA, Casadevall A. Global warming will bring new fungal diseases for mammals. mBio. 2010;1:e00061-10. https://doi.org/10.1128/mBio.00061-10

61. Robert V, Cardinali G, Casadevall A. Distribution and impact of yeast thermal tolerance permissive for mammalian infection. BMC Biol. 2015;13:18. https://doi.org/10.1186/s12915-015-0127-3

62. Chow NA, Muñoz JF, Gade L, Berkow EL, Li X, Welsh RM, *et al.* Tracing the evolutionary history and global expansion of *Candida auris* using population genomic analyses. mBio. 2020;11:e03364-19. https://doi.org/10.1128/mBio.03364-19

63. Duarte-Escalante E, Reyes-Montes M del R, Frías-De-León MG, Meraz-Ríos B. Effect of climate change on the incidence and geographical distribution of coccidioidomycosis. In: Frías-De-León MG, Brunner-Mendoza C, Reyes-Montes M del R, Duarte-Escalante E, editors. The impact of climate change on fungal diseases. Cham: Springer International Publishing; 2022. p. 131-43. Consulted: Jan 8, 2023. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-030-89664-5_8

64. Vanderbeke L, Spriet I, Breynaert C, Rijnders BJA, Verweij PE, Wauters J. Invasive pulmonary aspergillosis complicating severe influenza: Epidemiology, diagnosis and treatment. Curr Opin Infect Dis. 2018;31:471. https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000504

65. Knutson TR, McBride JL, Chan J, Emanuel K, Holland G, Landsea C, *et al.* Tropical cyclones and climate change. Nature Geosci. 2010;3:157-63.

66. Walsh KJE, McBride JL, Klotzbach PJ, Balachandran S, Camargo SJ, Holland G, *et al.* Tropical cyclones and climate change. WIREs Climate Change. 2016;7:65-89.

Biomédica 2023;43(Supl.1):278-87
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.7082

Topic review

Candida auris: a global pathogen that has taken root in Colombia

Patricia Escandón[1], Shawn R. Lockhart[2], Nancy A. Chow[2], Tom M Chiller[2]

[1] Grupo de Microbiología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia.
[2] Mycotic Diseases Branch, Centers for Disease Control and Prevention, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta GA, USA

Candida auris has been recognized as an emerging multidrug-resistant pathogen with a significant public health burden, causing cases of invasive infection and colonization due to its persistence on inanimate surfaces, ability to colonize skin of some patients, and high transmissibility in healthcare settings.

The first sporadic report of the isolation of this species from the ear canal of a patient in Asia was in 2009 and reports from other regions of the world soon followed. However, it was not until 2015 that global epidemiological alerts were communicated as a result of an increasing number of reports of invasive infections caused by *C. auris* in several countries. Colombia was soon added to this list in 2016 after an unusual increase in the number of *C. haemulonii* isolates was reported, later confirmed as *C. auris*. Since the issuing of a national alert by the Colombian National Institute of Health together with the Ministry of Health in 2016, the number of cases reported reached over 2,000 by 2022.

Colombian isolates have not shown pan resistance to available antifungals, unlike *C. auris* strains reported in other regions of the world, which leaves patients in Colombia with therapeutic options for these infections. However, increasing fluconazole resistance is being observed. Whole-genome sequencing of Colombian *C. auris* isolates has enhanced molecular epidemiological data, grouping Colombian isolates in clade IV together with other South American isolates.

Data from Colombia showed that public health authorities, scientific community, and the general public need to be aware of fungal diseases as they present an often-deadly threat to patients.

Key words: *Candida auris*; infections; drug resistance; fungi; whole genome sequencing; Colombia.

Received: 15/06/2023
Accepted: 24/07/2023
Published: 24/07/2023

Citation:
Escandón P, Lockhart SR, Chow NA, Chiller TM. *Candida auris:* a global pathogen that has taken root in Colombia. Biomédica. 2023;43(Supl.1):278-87. https://doi.org/10.7705/biomedica.7082

Corresponding author:
Patricia Escandón, Grupo de Microbiología, Instituto Nacional de Salud, Calle 26 N° 51-20, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: (+57-1) 220 7700, extensión 1558
pescandon@ins.gov.co

Author's contributions:
Patricia Escandón: Concept and design of the manuscript, acquisition of data and drafted the article.
Nancy A. Chow, Shawn R. Lockhart and Tom M Chiller: Acquisition of data

Funding:
This work was supported by the Centers for Disease Control and Prevention and the *Instituto Nacional de Salud* de Colombia.

Conflicts of interest:
All authors report no potential conflicts of interest. The findings and conclusions in this report are those of the authors and do not necessarily represent the official position of the funding agencies or of the CDC.

***Candida auris*: un agente patógeno global que se ha arraigado en Colombia**

Candida auris ha sido reconocido como un agente patógeno multirresistente emergente con una carga significativa en la salud pública. Genera casos de infección invasiva y colonización debido a su persistencia en superficies inanimadas, su capacidad para colonizar fácilmente la piel de algunos pacientes y su alta transmisibilidad en el ambiente hospitalario.

El primer reporte esporádico de esta especie fue en Asia en el 2009 cuando se realizó su aislamiento a partir del conducto auditivo de un paciente, y pronto le siguieron reportes en otras regiones del mundo. Sin embargo, no fue hasta 2015 que se conocieron las alertas epidemiológicas a nivel mundial debido a un aumento en el número de casos de infecciones causadas por *C. auris* en varios países.

Colombia se sumó a la lista en 2016 luego de un aumento inusual en el número de aislamientos de *C. haemulonii* informados, que luego se confirmaron como *C. auris*. Desde que el Instituto Nacional de Salud junto con el Ministerio de Salud emitieron la Alerta Nacional en el 2016, el número de casos reportados superó los 2.000 en el 2022.

Los aislamientos colombianos no han mostrado resistencia generalizada a los antifúngicos disponibles, contrario a lo reportado para cepas de *C. auris* en algunas regiones del mundo, por lo que los pacientes en Colombia aún cuentan con opciones terapéuticas para estas infecciones. No obstante, se ha observado un aumento en la resistencia al fluconazol. La secuenciación del genoma completo agrupó los aislamientos colombianos en el Clado IV, junto con otros sudamericanos de *C. auris*, y aportó al conocimiento de los datos epidemiológicos moleculares de esta especie.

Los datos de Colombia evidencian que las autoridades de salud pública, la comunidad científica y el público en general deben ser conscientes de las enfermedades fúngicas, ya que a menudo representan una amenaza mortal para los pacientes.

Palabras clave: *Candida auris*; infecciones; resistencia a medicamentos; hongos; secuenciación completa del genoma; Colombia.

Candida auris is an emerging yeast, first reported over a decade ago and is now a cause of severe invasive infections in healthcare settings worldwide. It is of public health concern because its identification via conventional biochemical methods is difficult. It persists on surfaces and has high transmissibility. Serious bloodstream infections of *C. auris* have been reported globally in healthcare facilities, causing a mortality rate between 30 and 60% (1).

In Latin America, bloodstream infections due to *Candida* (candidemia) have an incidence of 1.18 cases per 1000 hospital admissions. In Colombia, the incidence is 1.96 cases per 1000 hospital admissions, one of the highest in the region according to data from the Network of Invasive Mycosis in Latin America (2).

Over time, the number of candidemia cases in Colombia has continued to increase, and changes in the distribution of the causative species from *C. albicans* to *Candida* species other than *C. albicans* have occurred. There has been a predominance of *C. tropicalis, C. parapsilosis* and *C. glabrata* cases (3) and, more recently, a significant number of cases caused by the multidrug-resistant emerging yeast *C. auris*, with more than 2,000 cases confirmed by the *Instituto Nacional de Salud* (4,5).

The clinical importance of *C. auris* has increased in different regions of the world, not only because of the number of patients infected but also because of the antifungal resistance patterns. This is the reason for the heightened clinical concern in some areas. This review presents the general global situation of this fungal pathogen, emphasizing the experience of laboratory-based surveillance in Colombia.

Current state of *Candida auris*

Candida auris was first described in 2009 in Japan where it was isolated from the external ear canal of a patient (6). In 2011, three bloodstream infections caused by *C. auris* were described in South Korea (6), establishing that this new species could cause invasive infections. Subsequently, there were reports from several hospitals in India (7) and South Africa (8) confirming the wide distribution of this organism. The first description of *C. auris* in the Americas was in 2012 and 2013 from bloodstream infections in patients from Venezuela, although some publications erroneously described cases as originating from Brazil (9). In 2015, studies based on whole-genome sequencing of isolates from these countries suggested nearly simultaneous, and recent, independent emergence of different clonal populations on three continents (10).

In the Americas, Colombia was the next country in the region to identify cases dating back to 2013, where bloodstream isolates were initially identified as *Candida haemulonii*, and then confirmed as *C. auris* in 2015 (4,5,11). These isolates were identified as the South American clade (clade IV).

In 2016, the United States and the Pan American Health Organization (PAHO) issued alerts on *C. auris*. This helped to generate outreach and identification of the further spread in the region. Shortly after these alerts, *C. auris* was reported in the United States, Panama, and Canada. Isolates from the US were found to be from multiple clades, not just the South American clade, while Panama isolates were all South American. It was clear that spread was occurring from travel within the region but also from outside (10,12,13).

In 2019, two more countries in the Americas reported isolates, Chile and Costa Rica, both with cases identified with travel history (14); and then

during the COVID-19 pandemic, Brazil and Mexico were added to the list of countries reporting *C. auris* cases (15,16).

A map published by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) shows the continuous spread of *C. auris* in the United States as well as global transmission (https://www.cdc.gov/fungal/diseases/candidiasis/tracking-c-auris.html, (17). Figure 1 shows the global distribution of this emerging pathogen through February 2021, indicating countries with cases of *C. auris*.

Candida auris has been recovered from many specimen types, including sterile body fluids (such as urine), tissues, and other sources such as burns and wounds, as well as non-sterile sites such as respiratory specimens and superficial body sites (axilla, groin, nose, etc.). Globally, bloodstream infections are the most common infection associated with *C. auris* invasive disease, leading to elevated mortality rate in patients (18-20).

There are no comprehensive data regarding the specific risk factors for *C. auris* infections compared to colonizations. However, available data suggest that predisposing factors for acquiring an invasive infection by this pathogen are very similar to those of other types of *Candida* infections, including antifungal and antibiotic use, the use of lines and tubes penetrating the body (central venous catheters, feeding tubes), diabetes and surgeries (20,21). The global and local spread of *C. auris* has been enhanced by the ability of the pathogen to survive for long periods of time on environmental surfaces in healthcare settings, especially when infection control and prevention practices are suboptimal. Dispersion, spread, and transmission within and between medical institutions and geographical areas have been facilitated by its capacity to spread through contact with contaminated environmental surfaces or equipment, and potentially from person to person (4,10,21).



Figure 1. Countries with reported *Candida auris* cases through February 15, 2021

Laboratory-based surveillance of *Candida auris* in Colombia

In Colombia, the circulation of *C. auris* was retrospectively identified in 2012 in the city of Santa Marta, on the north coast of the country. Although those sporadic isolates were not confirmed as being *C. auris* until 2015, they add to the case count of national surveillance. Laboratory-based surveillance of *C. auris* officially began in 2016, almost simultaneously with the global alerts and the identification of an unusual number of cases of bloodstream infections caused by *C. haemulonii*, later confirmed by molecular methods as *C. auris*, which prompted the laboratory-based surveillance. The identification of *C. auris* in the northern and central regions of Colombia urged public health authorities to issue a national alert for *C. auris* invasive infections (4,22,23). Subsequently, the epidemiological alert encouraged increased detection and reporting of patients colonized and infected by this pathogen.

Following the issue of the national alert, the *Instituto Nacional de Salud* of Colombia encouraged the national laboratory network to report all infections and outbreaks caused by *C. auris*. This is one of the few fungal diseases with mandatory reporting in the country. Public health laboratories also submit clinical isolates, mainly from invasive specimens (blood, urine with catheter, cerebrospinal fluid, and other sterile fluids) from their local network of hospitals and health institutions to the Microbiology Group at the *Instituto Nacional de Salud*. All the isolates are confirmed using polymerase chain reaction (PCR) with specific primers (24) and Biotyper MALDI-TOF ((BrukerTM, Billerica, MA, USA) at the reference laboratory of the *Instituto Nacional de Salud*.

From 2016 to 2022, a total of 2,119 isolates were received through laboratory-based surveillance, including 393 from colonization (18.5%) and 1,726 clinical cases (81.5%). The distribution of reported cases in Colombia varies within the 18 out of 33 departments participating in the surveillance. Bogotá (21.3%), Bolívar (16.7%) and Atlántico (13.7%) submitted the highest number of isolates (figure 2). The median age of patients was 34 years, but children (less than 15 years old) comprised 22% of the total cases, and pediatric intensive care units have played an important role in the transmission of *C. auris* in hospital settings. Most cases (67.3%) occurred in men. As has been reported globally, clinical isolates recovered from Colombian patients were mainly from bloodstream infections (78.6%) and a smaller proportion from other sterile body fluids, urine specimens, and other non-sterile specimens (4,5,25-27). There have been many reports of *C. auris* infections associated with COVID-19 patients (15-17,28), and this was also true in Colombia, where 189 (25.2%) patients with a confirmed diagnosis of SARS-CoV-2 also had an infection with *C. auris* during the period 20202021.

Candida auris is often misidentified when using the standard diagnostic tests available in Colombian laboratories, which can lead to inaccurate treatment of patients. In Colombia, the availability of advanced diagnostic technologies such as MALDI-TOF is not common in most public laboratories, so routine diagnosis is performed using automated equipment such as VITEK® 2 (Biomerieux). Laboratory-based surveillance in Colombia often receives isolates wrongly identified as *C. auris* by VITEK® 2. The most frequent misidentification of *C. auris* is as *C. haemulonii*, as expected from its close phylogenetic relationship (22% of the isolates from 2018-2021 were identified as *C. haemulonii*).

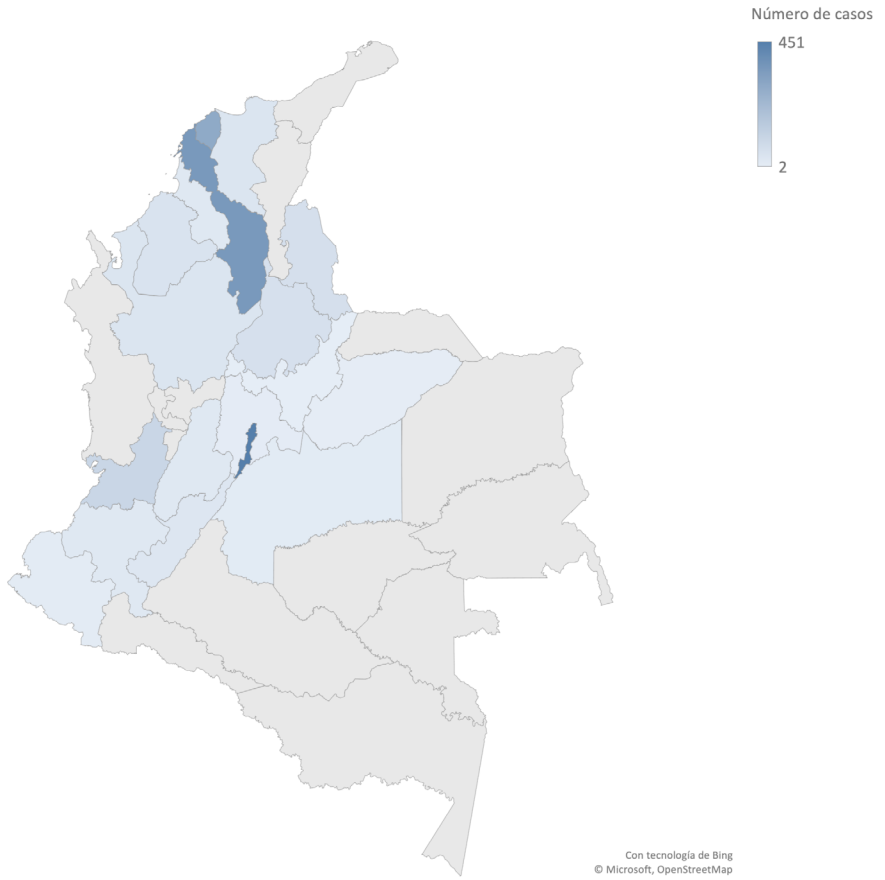


Figure 2. Confirmed cases of *Candida auris* in Colombia, 2016-2022. Darked blue color regions represent those areas with higher numbers of cases.

Given this finding, the Microbiology Group of the *Instituto Nacional de Salud* carried out a retrospective analysis of the isolates reported through the World Health Organization net as *C. haemulonii* and found that during the period 2013-2018, a total of 448 isolates of *C. haemulonii* had been reported, mainly from Barranquilla (52%), Santander (14.5%), Bogotá (13%) and Valle del Cauca (7%). This finding suggests that previously undetected *C. auris* may have been circulating in Colombia before 2016 and may have been misidentified as its closely related species *C. haemulonii* (25-27), which is not as common (5).

Another troubling feature of *C. auris* is that it can colonize patients for many months and persist in the environment despite the use of standard healthcare facility disinfectants. Patients may be asymptomatically colonized with *C. auris* on the skin, including nares, oropharynx, rectum, axilla, and other body sites, and this risks transmission of the fungus to other patients within the same healthcare setting, putting all the patients at risk for invasive *C. auris* infections. The Centers for Disease Control and Prevention (CDC) recommends screening for *C. auris* as an important component of surveillance and outbreak investigations.

In Colombia, several outbreaks have been identified by the national surveillance system since the first cases were reported through the laboratorybased surveillance in 2016. The first outbreaks in different facilities characterized by the *Instituto Nacional de Salud* together with the support and

effort of personnel from the Mycotic Disease Branch at CDC occurred in four hospitals in three cities with 40 confirmed cases of *C. auris* candidemia.

Investigation of these cases found associated risk factors similar to those reported for infections by other *Candida* species (diabetes, hemodialysis, catheter use), high mortality rates (up to 50%), and hospital transmission, confirming the ability of this fungus to cause healthcare-associated outbreaks (21,28).

A recent study on the north coast of Colombia, designed to compare mortality rates of *C. auris* candidemia with those of the other *Candida* species, revealed that the mortality of *C. auris* candidemia was not higher than that of other *Candida* species, reinforcing the need for adherence to prevention and control practices in the hospital setting (29,30).

Molecular epidemiology and whole-genome sequencing of *Candida auris*

The molecular epidemiology of *C. auris* is complex. From its first genomic description, four major subtypes or clades (clades I-IV) were identified, displaying a strong association with geography (10). Clade I was characterized by *C. auris* cases from countries in South Asia (*i.e.*, India and Pakistan), clade II by a case from Japan in East Asia, clade III by cases from South Africa in Africa, and clade IV by cases from Venezuela in South America. With tens to hundreds of thousands of single-nucleotide polymorphisms (SNP) separating the clades, clades I-IV were reported to be genetically distinct, with significantly less diversity observed within each clade. More recently, a description of Iranian cases resulted in a fifth major clade of *C. auris* (clade V) (31,32).

In response to the 2015-2016 *C. auris* outbreaks in Colombia, whole genome sequencing was conducted to describe its molecular epidemiology (11). Cases were from clade IV and clustered with Venezuela cases, further supporting the strong phylogeographic structure of *C. auris*. Additionally, *C. auris* was isolated from the healthcare environment (*e.g.*, bed rails, mobile equipment, floors, door handles). Isolates also belonged to the clade IV. Although cases and environmental samples represented four hospitals from two distinct geographic areas, isolates were separated by only 40 SNPs. Notably, a well-supported separation was observed between cases and environmental samples from the northern region compared to those from the central region. These findings provided evidence for localized transmission of *C. auris* at the regional level as well as a widespread outbreak. As part of an updated molecular epidemiologic description, we analyzed *C. auris* cases across Colombia, occurring from 2016 until 2021, and isolates continued to be of clade IV (unpublished data, figure 3). This finding suggests that *C. auris* introduction of other clades into Colombia has not occurred or has occurred but without subsequent transmission.

Globally, over 40 countries now report *C. auris* cases, and several countries have reported cases from multiple clades including Canada, Kenya, Mexico, South Africa, and the United States (33-39). Since the first genomic descriptions (10,34), genetic diversity is increasing within the clades. It is of interest to understand how the global distribution of *C. auris* will affect this species in Colombia. Future investigations should frequently monitor the molecular epidemiology of *C. auris* across the country to better understand changes in spread, antifungal resistance, and epidemiology.



Figure 3. Whole genome sequencing of Colombian *Candida auris* isolates recovered from 2016 until 2021. Isolates cluster by country, except 16 isolates from Bogotá that grouped with isolates from Venezuela. Analysis was done using MycoSNP geneflow, version 0.21, and B11245 (Venezuela) Clade IV reference genome.

Candida auris and antifungal resistance

Antifungal resistance has been one of the defining characteristics of *C. auris*, but the story in Colombia has been slightly different. Since the first reported cases of Colombia in 2015 and using the preliminary breakpoints set by the CDC, the resistance rate to fluconazole was 11% (10/87 isolates) and to amphotericin B was 31% (27/87 isolates) (4,11). This lack of resistance is consistent with US findings in Chicago among isolates whose closest match were Colombian clade IV isolates (Centers for Disease Control and Prevention, unpublished data; 33,34). It contrasts with some of the first clade IV isolates from Venezuela and Panama, which are universally resistant to fluconazole, and isolates from other clades with higher azole resistance (9,12).

Other Colombian studies with early emergent isolates showed the same sensitivity pattern, with fluconazole sensibility ranging from 18 to 59% and amphotericin B resistance ranging from 22 to 29% (18,22). Amphotericin B-resistant isolates were more common in the north of the country (3,12). Throughout the surveillance period, echinocandin resistance was extremely rare, with only one isolate identified (9,10). Some evidence points out increased fluconazole resistance in Colombia. From 2016 through 2019, the fluconazole minimum inhibitory concentration 50 (MIC_{50}) was 4-8 µg/ml, but in 2020, it increased to 32 µg/ml, indicating that at least 50% of the isolates from 2020 were fluconazoleresistant (9). During the same time frame, a similar change in the MIC_{50} to amphotericin B was not observed, but the overall resistance rate from 2016-2020 increased to 33%.

Pediatric cases of *C. auris* have been rare in Colombia, with only two reports of 13 and 6 cases from two facilities (11,12). Among those 19 cases, 3 (16%) and 13 (68%) were resistant to fluconazole and amphotericin B, respectively. The only echinocandin-resistant isolate was from a pediatric patient (20).

The fluconazole-resistance mechanism of Colombian isolates is predominantly the amino acid change in the *ERG11* gene at either Y132F or K143R, similar to that of clade 1 isolates (11,40,41). The amphotericin B-resistance mechanism is still unknown. In a single Colombian study monitoring the outcome of 34 *C. auris* patients, antifungal resistance was not statistically associated with patient outcome (21).

Final remarks

As *C. auris* emerged on the global scene, it almost immediately caused a significant number of outbreaks and captured the attention of both the scientific community and public health authorities. The impact was such that it was recently added to the WHO fungal priority pathogens list in the critical priority group. This classification is meant to highlight the critical need to do further research and develop diagnostics tools and treatments (42).

What lies in the future for emerging fungal pathogens is uncertain. We still do not understand how *C. auris* emerged so rapidly as a multidrug-resistant, adaptive, and transmissible fungus with an unprecedented capacity to survive in hospital environments and cause infections in severely ill patients.

Candida auris is here to stay, with a high number of cases in Colombia, the region, and the world. This organism highlights the need for fungal surveillance to detect the emergence of new fungal pathogens. On the positive side, *C. auris* has brought an unprecedented awareness of fungal diseases and the need for enhanced detection and diagnosis.

Acknowledgements

We acknowledge the expert assistance of the staff of the national laboratory networks, and of the clinicians and epidemiologists of the participating hospitals in Colombia. We thank Elizabeth Misas for providing figure 3 of the manuscript.

References

1. Garcia-Bustos V, Cabanero-Navalon MD, Ruiz-Saurí A, Ruiz-Gaitán AC, Salavert M, Tormo MA, *et al.* What do we know about *Candida auris*? State of the art, knowledge gaps, and future directions. Microorganisms. 2021;9:2177. https://doi.org/10.3390/microorganisms9102177
2. Martinez-Parada I, Agudelo-Quintero E, Prado-Molina D, SernaTrejos J. Situación actual de *Candida auris* en Colombia, 2021. An Fac Med. 2021;82:242-3. https://doi.org/10.15381/anales.v82i3.21089
3. Alvárez C, Cortes J, Denning D. Burden of fungal infections in Colombia. J Fungi (Basel). 2018;4:41. https://doi.org/110.3390/jof4020041
4. Escandón P, Cáceres DH, Espinosa-Bode A, Rivera S, Armstrong P, Vallabhaneni S, *et al.* Notes from the Field: Surveillance for *Candida auris* - Colombia, September 2016–May 2017.MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2018;67:459-60. https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6715a6
5. Escandón P, Cáceres D, Lizarazo D, Lockhart S, Megham L, Duarte C. Laboratory-based surveillance of *Candida auris* in Colombia, 2016-2020. Mycoses. 2022;65:222-5. https://doi.org/10.1111/myc.13390
6. Satoh K, Makimura K, Hasumi Y, Nishiyama Y, Uchida K, Yamaguchi H. *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. Microbiol Immunol. 2009;53:41-4. https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2008.00083.x
7. Chowdhary A, Sharma C, Duggal S, Agarwal K, Prakash A, Singh PK, *et al.* New clonal strain of *Candida auris*, Delhi, India. Emerg Infect Dis. 2013;19:1670-3. https://doi.org/10.3201/eid1910.130393

8. Magobo RE, Corcoran C, Seetharam S, Govender NP. *Candida auris*-associated candidemia, South Africa. Emerg Infect Dis. 2014; 20:1250-1. https://doi.org/10.3201/eid2007.131765
9. Calvo B, Melo ASA, Perozo-Mena A, Hernández M, Francisco EC, Hagen F, *et al.* First report of *Candida auris* in America: clinical and microbiological aspects of 18 episodes of candidemia. J Infect. 2016;73:369-74. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2016.07.008
10. Lockhart SR, Etienne KA, Vallabhaneni S, Farooqi J, Chowdhary A, Govender, NP, *et al.* Simultaneous emergence of multidrug-resistant *Candida auris* on 3 continents confirmed by whole-genome sequencing and epidemiological analyses. Clin Infect Dis. 2017;64:134-40. https://doi.org/10.1093/cid/ciw691
11. Escandón P, Chow NA, Caceres DH, Gade L, Berkow EL, Armstrong P, *et al.* Molecular epidemiology of *Candida auris* in Colombia reveals a highly related, countrywide colonization with regional patterns in Amphotericin B resistance. Clin Infect Dis. 2019;68:15-21. https://doi.org/10.1093/cid/ciy411
12. Araúz AB, Cáceres DH, Santiago E, Armstrong P, Arosemena S, Ramos C, *et al.* Isolation of *Candida auris* from 9 patients in Central America: importance of accurate diagnosis and susceptibility testing. Mycoses. 2018;61:44-47. https://doi.org/10.1111/myc.12709
13. Schwartz IS, Hammond GW. First reported case of multidrug-resistant *Candida auris* in Canada. Can Commun Dis Rep. 2017;43:150-3. https://doi.org/10.14745/ccdr
14. Moreno MV, Simian ME, Villarroel J, Fuenzalida LM, Yarad MF, Soto A, *et al.* Primer aislamiento de *Candida auris* en Chile. Rev Chil Infectol. 2019;36:76773. https://doi.org/10.4067/S0716-10182019000600767
15. de Almeida JN, Francisco EC, Hagen F, Brandão IB, Pereira FM, Presta Dias PH, *et al.* Emergence of *Candida auris* in Brazil in a COVID-19 Intensive Care Unit. J Fungi. 2021;7:220. https://doi.org/10.3390/jof7030220
16. Villanueva-Lozano H, Treviño-Rangel R de J, González GM, RamírezElizondo MT, Lara-Medrano R, Aleman-Bocanegra MC, *et al.* Outbreak of *Candida auris* infection in a COVID-19 Hospital in Mexico. Clin Microbiol Infect. 2021;27:813-6. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.12.030
17. Lyman M, Forsberg K, Sexton DJ, Chow NA, Lockhart SR, Jackson BR, *et al.* Worsening spread of *Candida auris* in the United States, 2019 to 2021. Ann Intern Med. 2023;176:489-95. https://doi.org/10.7326/M22-3469
18. Morales-López SE, Parra-Giraldo CM, Ceballos-Garzón A, Martínez HP, Rodríguez GJ, Álvarez-Moreno CA, *et al.* Invasive infections with multidrug-resistant yeast *Candida auris*, Colombia. Emerg Infect Dis. 2017;23:162-4. https://doi.org/10.3201/eid2301.161497
19. Chakrabarti A, Sood P, Rudramurthy SM, Chen S, Kaur H, Capoor M, *et al.* Incidence, characteristics and outcome of ICU-acquired candidemia in India. Intensive Care Med. 2015;41:285-95. https://doi.org/10.1007/s00134-014-3603-2
20. Berrio I, Caceres DH, Coronell R W, Salcedo S, Mora L, Marin A, *et al.* Bloodstream infections with *Candida auris* among children in Colombia: clinical characteristics and outcomes of 34 cases. J Pediatric Infect Dis Soc. 2021; 10:151-4. https://doi.org/10.1093/jpids/piaa038.PMID: 32373928
21. Armstrong PA, Rivera SM, Escandon P, Caceres DH, Chow N, Stuckey MJ, *et al.* Hospital-associated multicenter outbreak of emerging fungus *Candida auris*, Colombia, 2016. Emerg Infect Dis. 2019;25:1339-46. https://doi.org/10.3201/eid2507.180491
22. Parra-Giraldo CM, Valderrama SL, Cortes-Fraile G, Garzón JR, Ariza BE, Morio F, *et al.* First report of sporadic cases of *Candida auris* in Colombia.Int J Infect Dis. 2018;69:63-7. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.01.034
23. Instituto Nacional de Salud. Alerta por emergencia global de infecciones invasivas causadas por la levadura multiresistente *Candida auris.* Accessed: May 12, 2023. Available from: https://www.ins.gov.co/BibliotecaDigital/alerta-global-de-infecciones-causadas-por-levadura-multirresistente-candida-auris.pdf
24. Kordalewska M, Zhao Y, Lockhart SR, Chowdhary A, Berrio I, Perlin DS. Rapid and accurate molecular identification of the emerging multidrug-resistant pathogen *Candida auris*. J Clin Microbiol. 2017;55:2445-52. https://doi.org/10.1128/JCM.00630-17
25. Instituto Nacional de Salud. Vigilancia por laboratorio de *Candida auris,* 2016-primer semestre 2018. Bogotá: Instituto Nacional de Salud; 2018.

26. Instituto Nacional de Salud. Vigilancia por laboratorio de *Candida auris* en Colombia 2018-2020. Bogotá: INS; 2020.
27. Instituto Nacional de Salud. Vigilancia por laboratorio de *Candida auris* en Colombia 2018-2021. Bogotá: INS; 2021
28. Caceres DH, Rivera SM, Armstrong PA, Escandón P, Chow NA, Ovalle MV, *et al.* Case-case comparison of *Candida auris* versus other *Candida* species bloodstream infections: results of an outbreak investigation in Colombia. Mycopathologia. 2020;185:917-923. https://doi.org/10.1007/s11046-020-00478-1
29. Alvarez-Moreno CA, Morales-López S, Rodriguez GJ, Rodriguez JY, Robert E, Picot C, *et al.* The mortality attributable to Candidemia in *C. auris* is higher than that in other *Candida* species: myth or reality? J Fungi (Basel). 2023;9:430. https://doi.org/10.3390/jof9040430
30. Roberts SC, Zembower TR, Ozer EA, Qi C. Genetic evaluation of nosocomial *Candida auris* transmission. J Clin Microbiol. 2021;59:e02252-20. https://doi.org/10.1128/JCM.02252-20
31. Safari F, Madani M, Badali H, Kargoshaie AA, Fakhim H, Kheirollahi M, *et al.* A chronic autochthonous fifth clade case of *Candida auris* otomycosis in Iran. Mycopathologia. 2022:187;121-7. https://doi.org/10.1007/s11046-021-00605-6
32. Chow NA, de Groot T, Badali H, Abastabar M, Chiller T, Meis JF. Potential fifth clade of *Candida auris*, Iran, 2018. Emerg Infect Dis. 2019:25:1780. https://doi.org/10.3201/eid2509.190686
33. Chow NA, Gade L, Tsay SV, Forsberg K, Greenko JA, Southwick KL, *et al.* Multiple introductions and subsequent transmission of multidrug-resistant *Candida auris* in the USA: a molecular epidemiological survey. Lancet Infect Dis. 2018:18;137784. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30597-8
34. Chow NA, Muñoz JF, Gade L, Berkow EL, Li X, Welsh RM, *et al.* Tracing the evolutionary history and global expansion of *Candida auris* using population genomic analyses. mBio. 2020;11:e03364-19. https://doi.org/10.1128/mBio.03364-19
35. De Luca DG, Alexander DC, Dingle TC, Dufresne PJ, Hoang LM, Kus JV, *et al.* Four genomic clades of *Candida auris* identified in Canada, 2012-2019. Med Mycol. 2022:60. https://doi.org/10.1093/mmy/myab079
36. González-Duran E, Contreras-Pérez CU, Cáceres D, Ríos-Rosas C, Pinon-Ortega J, Téllez-Saucedo MD, *et al.* The use of readily available laboratory tests for the identification of the emerging yeast *Candida auris* in Mexico. Arch Microbiol. 2022:204;592. https://doi.org/10.1007/s00203-022-03159-3
37. Naicker SD, Maphanga TG, Chow N, Allam M, Kwenda S, Ismail A, *et al.* Clade distribution of *Candida auris* in South Africa using whole genome sequencing of clinical and environmental isolates. Emerg Microbes Infect. 2021:10;1300-8. https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1944323
38. Rudramurthy SM, Chakrabarti A, Paul RA, Sood P, Kaur H, Capoor MR, *et al. Candida auris* candidaemia in Indian ICUs: analysis of risk factors. J Antimicrob Chemother. 2017:72;1794-801. https://doi.org/10.1093/jac/dkx034
39. Sharma C, Kumar N, Pandey R, Meis JF, Chowdhary A. Whole genome sequencing of emerging multidrug resistant *Candida auris* isolates in India demonstrates low genetic variation. New Microbes New Infect. 2016;13;77-82. https://doi.org/10.1016/j.nmni.2016.07.003
40. Misas E, Escandón P, McEwen JG, Clay OK. The LUFS domain, its transcriptional regulator proteins, and drug resistance in the fungal pathogen *Candida auris*. Protein Sci. 2019;28:2024-9. https://doi.org/10.1002/pro.3727
41. Healey KR, Kordalewska M, Jiménez Ortigosa C, Singh A, Berrío I, Chowdhary A, *et al.* Limited *ERG11* mutations identified in isolates of *Candida auris* directly contribute to reduced azole susceptibility. Antimicrob Agents Chemother. 2018;62:e01427-18. https://doi.org/10.1128/AAC.01427-18
42. Organización Mundial de la Salud. WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. Geneva: WHO; 2022.

Biomédica 2023;43(Supl.1):288-311
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.7052

Revisión de tema

Taxonomía de los hongos: un rompecabezas al que le faltan muchas piezas

Álvaro León Rúa-Giraldo
Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Los hongos son organismos polifacéticos presentes en casi todos los ecosistemas de la tierra, donde establecen diversos tipos de simbiosis con otros seres vivos. A pesar de ser reconocidos por los humanos desde la antigüedad –y de la cantidad de trabajos que han profundizado sobre su biología y ecología–, aún falta mucho por conocer sobre estos organismos.
Algunos de los criterios que clásicamente se han utilizado para su estudio, hoy resultan limitados y hasta cierto punto permiten un agrupamiento de los aislamientos según algunas características, pero generan confusión en su clasificación y, más aún, cuando se pretende comprender sus relaciones genealógicas.
Los caracteres fenotípicos no son suficientes para identificar una especie de hongos y, menos aún, para construir una filogenia amplia o de un grupo particular. Hay grandes vacíos que hacen que los árboles generados sean inestables y fácilmente debatidos.
Para los profesionales de la salud, parece que la identificación de los hongos hasta niveles inferiores como género y especie es suficiente para elegir el tratamiento más adecuado para su control, comprender la epidemiología de los cuadros clínicos asociados y reconocer los brotes y los factores determinantes de la resistencia a los antimicrobianos. No obstante, la ubicación taxonómica dentro del reino permitiría establecer relaciones filogenéticas entre los taxones fúngicos, facilitando la comprensión de su biología, su distribución en la naturaleza y la evolución de su potencial patogénico.
Los avances de las técnicas de biología molecular y las ciencias de la computación en los últimos 30 años han permitido cambios importantes dirigidos a establecer los criterios para definir una especie fúngica y alcanzar una construcción filogenética más o menos estable. Sin embargo, el camino por recorrer aún es largo, y supone un trabajo mancomunado de la comunidad científica a nivel global y el apoyo a la investigación básica.

Palabras clave: hongos; clasificación; filogenia; evolución biológica; código de barras del ADN taxonómico.

Fungal taxonomy: A puzzle with many missing pieces

Fungi are multifaceted organisms found in almost all ecosystems on Earth, where they establish various types of symbiosis with other living beings. Despite being recognized by humans since ancient times, and the high number of works delving into their biology and ecology, much is still unknown about these organisms.
Some criteria classically used for their study are nowadays limited, generating confusion in categorizing them, and even more, when trying to understand their genealogical relationships. To identify species within Fungi, phenotypic characters to date are not sufficient, and to construct a broad phylogeny or a phylogeny of a particular group, there are still gaps affecting the generated trees, making them unstable and easily debated.
For health professionals, fungal identification at lower levels such as *genus* and species, is enough to select the most appropriate therapy for their control, understand the epidemiology of clinical pictures associated, and recognize outbreaks and antimicrobial resistance. However, the taxonomic location within the kingdom, information with apparently little relevance, can allow phylogenetic relationships to be established between fungal taxa, facilitating the understanding of their biology, distribution in nature, and pathogenic potential evolution.
Advances in molecular biology and computer science techniques from the last 30 years have led to crucial changes aiming to establish the criteria to define a fungal species, allowing us to reach a kind of stable phylogenetic construction. However, there is still a long way to go, and it requires the joint work of the scientific community at a global level and support for basic research.

Keywords: Fungi; classification; phylogeny; biological evolution; DNA barcoding, taxonomic.

Recibido: 13/06/2023
Aceptado: 21/07/2023
Publicado: 24/07/2023

Citación:
Rúa-Giraldo AL. Taxonomía de los hongos: un rompecabezas al que le faltan muchas piezas. Biomédica. 2023;43(Supl.1):288-311. https://doi.org/10.7705/biomedica.7052

Correspondencia:
Álvaro León Rúa-Giraldo, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Calle 67 N°53-108, oficina 5-410, Medellín, Colombia
Teléfono: (301) 228 5085
alvaro.rua@udea.edu.co

Contribución de los autores:
Todo el artículo corresponde a la revisión bibliográfica y discusión del único autor.

Financiación:
No se recibió ningún tipo de apoyo económico para su elaboración.

Conflicto de intereses:
El autor declara que no tiene ningún conflicto de interés.

Cada vez los hongos reciben más atención y pasan a ocupar el sitio de honor que les corresponde por ser los moldeadores de la vida en la tierra. Es indiscutible su importancia ecológica y para la obtención de productos útiles para el humano, pero no se pueden menospreciar sus efectos dañinos en los seres vivos de todos los reinos. Las pérdidas económicas por afectación de cultivos de alimentos, el deterioro que generan sobre prácticamente cualquier material, la contaminación de ambientes extramurales e intramurales y los procesos de enfermedad en humanos y otros animales, hacen que sean nombrados a diario en los medios de comunicación masivos. Por ejemplo, *Candida auris*, como agente patógeno de fácil diseminación en ambientes hospitalarios y con gran resistencia a los antimicóticos de uso rutinario; los mucorales y su oportunismo en los pacientes con COVID-19, y la adquisición de resistencia cruzada a los antifúngicos por su uso indiscriminado en áreas de cultivo de algunos mohos ambientales que pueden infectar a los humanos, han activado las alarmas de los sistemas de salud mundial.

No obstante, a pesar de que los hongos son reconocidos por los humanos desde la prehistoria, es relativamente poco lo que se sabe de ellos. En esta revisión se pretende abordar los conceptos más recientes sobre la definición de una especie dentro de los hongos, y los métodos que se han utilizado para identificarlos y organizarlos de acuerdo con su ascendencia evolutiva. Al final, se presenta la clasificación que, por su solidez y poca complejidad, describe de una manera más sencilla el árbol de la vida del reino Fungi (*Fungal Tree of Life,* FToL).

El reino de los hongos es el menos conocido de los tres “grandes” reinos eucarióticos después de los animales y las plantas, a pesar de ser el segundo grupo de organismos más rico en especies después de los animales (1). En la naturaleza, los hongos son los principales degradadores de la materia orgánica, responsables de convertir los organismos muertos en pequeños bloques de nutrientes que otros seres vivos pueden utilizar. Es así como en las selvas tropicales, los hongos degradan, aproximadamente, el 50 % de la materia vegetal y animal muerta para evitar su acumulación y que asfixie a los demás seres vivos (2).

Sin embargo, los hongos también generan daño. Su capacidad de adaptación hace que puedan colonizar prácticamente todo ambiente sobre la tierra, contaminando y destruyendo todo a su paso (3). Algunos hongos son importantes fitopatógenos capaces de causar grandes pérdidas económicas por contaminación de los cultivos de importancia agrícola (4); también, pueden generar problemas de salud en humanos y animales, como procesos infecciosos, alérgicos e intoxicaciones (5). Los hongos patógenos y los oportunistas causan más de mil millones de infecciones humanas al año, con más de 1,6 millones de muertes (6).

Es dentro de este grupo donde recientemente se ha manifestado gran confusión debido a los constantes cambios taxonómicos de agentes patógenos reconocidos; algunos han pasado de ser una especie a un complejo de especies crípticas, con diferencias en su grado de virulencia y sensibilidad a los antifúngicos e, incluso, con cambio de género o una nueva denominación específica.

La identificación correcta de los hongos reviste gran importancia práctica, no sólo en el ámbito clínico humano, sino también, en patología vegetal, biodeterioro, biotecnología y estudios medioambientales. En la actualidad, esto cobra más relevancia cuando se evidencia el efecto del cambio climático

sobre el comportamiento ecológico de los hongos, la epidemiología de las micosis (7) y de los agentes patógenos de los cultivos (8), y la aparición más frecuente de hongos resistentes a los antifúngicos de uso común (9). Además, está el creciente interés por conocer la biodiversidad en el planeta para aprovechar su arsenal biotecnológico (10) o por describir nuevas especies antes que la evolución las elimine para siempre (11).

La taxonomía pretende colaborar en la clasificación y organización de los hongos, pero esta disciplina, dinámica y progresiva que se apoya en los avances científicos y tecnológicos, se ve obligada a la constante revisión y actualización, y origina –a veces de manera más acelerada de lo que es posible asimilar– cambios nomenclaturales en la construcción del árbol de la vida del reino Fungi (12,13).

¿Qué se considera una especie fúngica?

Una especie es definida como la unidad básica de clasificación biológica, pero no es un dato estático, sino que debe probarse cuando se disponga de nueva información. En la literatura biológica hay más de 30 conceptos de especies (14), incluidos los de uso común, como los morfológicos, los ecológicos, los fenotípicos, los biológicos, los de reconocimiento, los evolutivos, los de conglomerado genotípico y los de especies filogenéticas (15,16).

Entre los micólogos, se han utilizado diferentes conceptos para definir las especies fúngicas (15-17). El enfoque más clásico, con muchas disparidades taxonómicas, es el concepto morfológico (fenotípico) que define una especie con base en sus características morfológicas e, idealmente, por las diferencias entre ellas. Otros conceptos de amplio uso, principalmente en estudios ambientales y en fitopatología, son el politético, el ecológico y el biológico.

Los avances en biología molecular y su aplicación para el estudio de los genomas, además de las herramientas bioinformáticas que permiten análisis filogenéticos de mayor validez estadística, generaron el concepto de especie filogenética, ampliamente acogido por la comunidad científica, pero sin lograr su consenso (17). Sin embargo, este concepto ha tenido gran impacto en el posicionamiento taxonómico, pero con un efecto sutil en la clasificación de aquellos microorganismos asociados con enfermedades. No obstante, aunque los estudios basados en la filogenia genómica ofrecen nuevas perspectivas sobre la clasificación a niveles taxonómicos superiores, el reconocimiento de las especies y sus relaciones siguen siendo muy controvertidos y están sujetos a diferentes interpretaciones.

Esta diversidad de conceptos genera cierto caos en el momento de definir una especie, debido a que todos se siguen empleando y no hay consenso sobre cuál o cuáles deben ser abandonados o cuál es el concepto que debería ser seguido por todo taxónomo de hongos (18). Además, los hongos son un grupo demasiado diverso, lo que conlleva una alta plasticidad fenotípica originada por la naturaleza polifilética de las especies, los efectos del ambiente sobre su genoma o ambos. Por el contrario, los caracteres morfológicos, fisiológicos, ecológicos y hasta los de homología de secuencias, pueden compartirse entre especies no tan relacionadas filogenéticamente (19).

Además, el mencionado creciente interés por conocer la biodiversidad, aunado al rápido desarrollo de las ciencias ómicas, ha incrementado de manera exponencial el número de posibles especies “nuevas” en las bases de datos de hongos, especialmente por estudios en lugares poco explorados

(19), muchas de las cuales son sinónimos para especies ya reconocidas fenotípicamente, pero que no contaban con información de su genoma. Asimismo, un número muy importante de datos de secuencias parciales o totales de genomas han sido depositados sin seguir ninguna directriz consensuada, lo cual genera ruido y confusión (20,21).

Frente a este panorama tan agobiante, se han presentado varias propuestas que buscan establecer tales directrices con el fin de "normalizar" la manera de completar la información de los taxones ya reconocidos o la inclusión de otros nuevos en las bases de datos. En este sentido, Vellinga *et al.* (18) propusieron unos criterios para introducir nuevos géneros fúngicos. No obstante, para el nivel de especie, no ha sido posible alcanzar un acuerdo entre las numerosas revisiones y propuestas (15,17).

¿Cómo identificar una especie de hongo?

Las personas dedicadas al estudio y, específicamente, a la identificación de hongos, tradicionalmente han empleado los caracteres observables como criterio principal (22); sin embargo, este enfoque fenotípico ha sido muy criticado por su falta de terminología estandarizada y estable, y por su gran subjetividad. Además, se ha considerado que algunas características fenotípicas son inestables y dependen de las condiciones ambientales, como ocurre con el crecimiento en un cultivo artificial. Una clara limitación de los enfoques fenotípicos es que no pueden aplicarse a hongos que no crecen en cultivo (23). Además, los caracteres morfológicos son consecuencia de la evolución, por lo que su uso dentro de la sistemática fúngica como criterio de identificación, puede llevar a errores debido a procesos genéticos como la hibridación, la especiación críptica y la evolución convergente (24).

No obstante, las características macromorfológicas y micromorfológicas se han empleado –en algunos casos con mucho éxito– para la identificación y la clasificación de la mayoría de los hongos consignados en las bases de datos; incluso, las claves dicotómicas para el reconocimiento de especies basadas en características morfológicas se continúan utilizando en el diagnóstico clínico humano y en fitopatología (25). Tales características pueden ser de gran utilidad para la clasificación a nivel de orden y familia, pero suelen ser insuficientes para determinar niveles inferiores como género y especie (26). Otras características han sido introducidas progresivamente para ayudar a definir las especies de hongos, entre las que se incluyen factores ecológicos (abióticos y bióticos), fisiológicos, bioquímicos, reproductivos y genéticos (27).

La aplicación de las técnicas de biología molecular para el estudio del genoma de los hongos ha tenido gran impacto en la delimitación de especies y en la reevaluación de los caracteres diagnósticos (morfológicos, ecológicos y biológicos); además, ha hecho que la práctica de identificar y clasificar solo por la morfología ya no sea aceptable, según el último código internacional de nomenclatura para algas, hongos y plantas (CINB) (28).

Entre los métodos basados en secuencias de ADN para identificar especies de hongos, se resalta el código de barras de ADN, tecnología en la que se compara una o varias secuencias desconocidas (por lo general, una región corta de ADN, de 400 a 800 pares de bases) con una base de datos de secuencias reconocidas y depuradas de ADN (29). El uso de las secuencias de ADN fúngico amplificadas con iniciadores para las dos subunidades (subunidad grande o LSU-26S o 28S y subunidad pequeña

o SSU-18S) del ARN ribosómico, además de toda la región del espaciador transcrito interno (ITS1, 5.8S, ITS2), inició una nueva era en la identificación de secuencias filogenéticas moleculares en el reino Fungi (30).

En el 2011, durante el simposio *Amsterdam Declaration on Fungal Nomenclature* (31), se seleccionó la región conocida de manera general como "región ITS", como el marcador oficial del código de barras para los hongos (32). Varias técnicas novedosas de secuenciación, como la secuenciación de próxima generación (n*ext-generation sequencing,* NGS), ONT MinION nanopore y Pac Bio *sequencing*, permitieron que el código de barras del ADN sea más seguro, rápido, confiable y económico para la identificación de los hongos (33,34), e incrementaron vertiginosamente las secuencias de ITS disponibles en las bases de datos. Específicamente, en la versión 9.0 del 2022 de la base UNITE (https://unite.ut.ee/) se contabilizaban 6'441.764 secuencias de referencia ITS de hongos pertenecientes a 290.922 hipótesis de especies.

Estas especies hipotéticas se refieren a aquellas que no cuentan con la revisión taxonómica que debería acompañar a una especie e incluyen a los taxones conocidos como *dark taxa* o taxones oscuros, que podrían ser ya conocidos, pero que no se contaba con su secuencia ITS en la base de datos, o que podrían corresponder a taxones nuevos no caracterizados (35). Debido a la variación intragenómica de las secuencias ITS de muchos hongos (alrededor del 70 % de los incluidos en las bases de datos) (35,36), dichas secuencias son útiles en la identificación de un gran número de especies. Sin embargo, se ha demostrado que tal variabilidad no es tan prevalente o puede estar ausente en algunos géneros (~3-5 % de 127 hongos pertenecientes a Ascomycota y Basidiomycota), principalmente en aquellos con muchas especies, como *Aspergillus*, *Alternaria, Cladosporium*, *Penicillium* y *Trichoderma* (37).

Otro aspecto limitante sobre el uso de las secuencias ITS (o de cualquier secuencia de referencia) para la identificación de las especies de hongos, es la asignación de valores de corte, es decir, qué tanto porcentaje de diferencia en la composición del ADN puede considerarse suficiente para separar dos especies (38). No es posible aplicar un solo valor para todas las especies, incluso dentro de un mismo género, y más aún en aquellos con gran frecuencia de especies crípticas (39). También, se reconoce la dificultad para obtener secuencias ITS de alta resolución directamente por PCR y secuenciación Sanger de productos de PCR, debido a la heterogeneidad entre las copias del ITS dentro del grupo de genes ribosómicos de una misma cepa (40). Además, el análisis de especies tipo depositadas en "fungarios", o colecciones de hongos, ha demostrado la incapacidad de los iniciadores universales ITS para amplificar alrededor del 10 % de los hongos estudiados (32,41).

Para estos géneros de difícil delimitación a nivel de especie con este marcador o cuando se requiera solo llegar hasta niveles taxonómicos intermedios como familia o género, puede recurrirse a la amplificación y secuenciación de la región LSU (subunidad ribosómica grande del ARN) con sus dominios hipervariables D1 y D2 para establecer relaciones entre especies, o combinada con la región ITS para llegar a nivel de especie (42). Este es el juego de secuencias más utilizado en estudios de sistemática de hongos, como el ensamblaje del árbol de la vida del reino Fungi (43).

La incapacidad del marcador ITS para diferenciar las especies de algunos géneros, incluyendo importantes agentes patógenos oportunistas de animales y plantas, ha obligado a los micólogos a buscar alternativas. Los otros genes elegidos codifican para proteínas y poseen regiones

intrónicas (no codificantes) que suelen evolucionar a un ritmo más rápido en comparación con los ITS (44); suelen presentarse como copia única en el genoma, lo que permite un fácil reconocimiento de su homología y convergencia. También, poseen una longitud menos variable debido a que acumulan menos mutaciones en sus exones y, comparados con los genes ribosómicos, son más fáciles de alinear porque contienen menos ambigüedad debido a las restricciones de codones (44,45). Hay un consenso emergente sobre la utilidad del factor de elongación de la traducción 1-α (*Tef1*) como un código de barras excelente para la mayoría de los hongos estudiados (46).

Otros marcadores con aportes mayores en la identificación de especies de ciertos linajes incluyen la subunidad más grande (*RPB1*) y la segunda más grande de la ARN polimerasa (45,46), la β-tubulina (Tub2/BenA), la sexta subunidad de la ATP sintasa (ATP6) y el gen parcial de la calmodulina (*CaM*) de importancia para el estudio de Eurotiales, orden que incluye a *Aspergillus* y *Penicillium* (46). También, la proteína de mantenimiento del minicromosoma (MCM7) es promisoria para inferir relaciones filogenéticas de nivel superior e inferior (47).

Otros códigos de barras también específicos de taxón, son TOP1 (topoisomerasa 1) y PGK (fosfoglicerato cinasa) útil en la identificación de especies de Ascomycota, principalmente *Fusarium* y *Penicillium*; LNS2 (proteína hipotética) para miembros de Pucciniomycotina, ACT (ɣ-actina) para Sordariomycetes, Dothideomycetes y otros fitopatógenos; y COX1 (subunidad de la citocromo oxidasa I) utilizada en la identificación de los hongos del suelo. Estos marcadores podrían servir para complementar la información cuando los ITS y Tef1 sean insuficientes (45,46,48).

¿Cuántas especies de hongos existen?

El número de hongos siempre ha sido un tema intrigante, por lo que muchos grupos, principalmente de micólogos taxónomos o que trabajan con biodiversidad, han propuesto modelos para estimar su número real.

Las primeras estimaciones se basaron en el número de hongos registrados en plantas concretas. Bisby y Ainsworth, en 1943 (49), estimaron el número de hongos en unos 100.000; no obstante, quizá el punto de partida fue el trabajo de Hawksworth en 1991 (50), en el que estimaba que había 1,5 millones de especies, aproximadamente, basado –entre otros parámetros– en la existencia de unos seis taxones únicos para cada especie vegetal.

Los avances recientes en las tecnologías de secuenciación del ADN han dado lugar a cambios en las estimaciones del número de especies fúngicas. Blackwell, en el 2011, con los hallazgos de los estudios de secuenciación de próxima generación, asumió que el número de especies fúngicas oscilaba entre 3,5 y 5,1 millones (51). No obstante, estas estimaciones se basan en el estudio de ciertas plantas huéspedes y se reconoce que muchos hongos no tienen una especificidad de huésped aparente y son bastante ubicuos, lo que seguro lleva a subestimar el número real de especies.

En 2017, Hawksworth y Lücking consideraron de 2,2 a 3,8 millones como las cifras más acertadas, también partiendo de extrapolaciones de las proporciones planta:hongo, y teniendo en cuenta las especies crípticas, las tasas y los patrones con los que se están describiendo nuevas especies, los nichos inexplorados y las especies basadas en el ADN recuperado de muestras ambientales (52). Con los datos generados recientemente a partir

de estudios independientes y dependientes de cultivos, se calculó que las especies de hongos en la tierra ascienden a 12 (11,7-13,2) millones (19).

Recientemente, Baldrian *et al.* (53) analizaron las secuencias de más de 200 estudios publicados hasta el 2019, en los que se emplearon secuenciación de ADN de alto rendimiento para obtener más de 250 millones de secuencias ITS2, y estimaron que la riqueza total de taxones fúngicos no sintónicos es de 6,28 millones. No obstante, para el 2021, en las bases de datos reconocidas [Index Fungorum (https://www.indexfungorum.org/) y Mycobank (https://www.mycobank.org/)], solo hay un poco más de 150.000 especies aceptadas, aunque estas cifras seguirán cambiando a medida que se diseñen nuevas metodologías de fácil ejecución, idealmente económicas, y cuando se realicen estudios en nuevos ambientes.

Por el momento, es necesario pensar en dónde pueden encontrarse las especies de hongos que aún faltan para completar el árbol de la vida del reino Fungi (39). Hawksworth y Rossman (54) consideraron que los hongos no conocidos residen en hábitats ya conocidos y explorados, pero, simplemente, no es posible su recuperación y estudio con los métodos hasta ahora empleados. También, deben encontrarse en nichos no estudiados, debido a que, como se ha demostrado en algunos estudios, los microorganismos presentan patrones biogeográficos (55).

Muchas de las piezas que le faltan a la construcción del árbol de la vida fúngica no son fácilmente recuperables con las técnicas clásicas basadas en cultivo, pero su identificación solo a partir de secuencias denominas unidades taxonómicas moleculares operativas sin nombre [*Molecular Operational Taxonomic Unit* (MUTO)] aún no es aceptada por los estatutos que rigen el actual CINB (56); se consideran taxones oscuros, reconocidos en todos los linajes fúngicos principales (57) y, en algunos casos, los únicos miembros descritos para linajes importantes, principalmente de los grupos basales (58).

Taxonomía fúngica: darle orden al caos

En la actualidad, el interés no solo yace en la identificación y reconocimiento de las especies, sino, también, en el establecimiento de relaciones entre ellas y en organizarlas en grupos definidos para construir el árbol de la vida de los diferentes reinos de los seres vivos (59). La taxonomía fúngica busca descubrir, describir y clasificar todas las especies de hongos, además de proporcionar herramientas para su identificación (20).

La biología molecular, desde su llegada, ha reorganizado constantemente el árbol de la vida fúngico, gracias al estudio de secuencias de ADN e, inclusive, del genoma completo, que permiten inferir relaciones filogenéticas entre linajes de hongos y facilitan la detección de especies crípticas con caracteres morfológicos o fisiológicos similares (27,37).

En la actualidad, hay muchos géneros y especies para los cuales no se ha podido resolver su posición taxonómica y para los que nuevos datos moleculares (incluyendo nuevas secuencias informativas o análisis de genoma completo) deben ser estudiados con un enfoque polifásico (44). Existen varias bases de datos con secuencias de ADN para la identificación de especies de hongos y organismos relacionados, y la generación de árboles filogenéticos y filogenómicos. Las más empleadas se presentan en las revisiones de Jayasiri *et al.* (60), Prakash *et al.* (61) y Raja *et al.* (37).

En general, quienes trabajan en la taxonomía de hongos sienten la necesidad de contar con una base de datos unificada que relacione toda la información actual o que tenga una interacción directa entre las diferentes bases de datos para la actualización de los nuevos taxones y completar vacíos importantes en en su conocimiento.

El árbol de la vida de los hongos

A pesar de que los micólogos adoptaron desde muy temprano la sistemática molecular para el descubrimiento y la clasificación de los hongos, la organización en su árbol de la vida sigue siendo muy cambiante, principalmente, a nivel de las ramas más basales. Esto se debe a la naturaleza oculta y microscópica de muchos taxones que no han sido considerados o cuentan con muy pocos representantes para la generación de ramas sólidas dentro de las construcciones filogenéticas.

En las últimas décadas se han producido cambios drásticos en la taxonomía superior de los hongos, evidenciados en la triplicación de los filos fúngicos, que han pasado de cuatro a doce o hasta 19 (62). Dos ingentes esfuerzos separados cuyo objetivo es aumentar drásticamente el muestreo de genomas para la construcción del árbol de la vida fúngico son el Proyecto "*1000 Fungal Genomes"* (http://1000.fungalgenomes.org/home), en el cual se propuso la secuenciación de 1.000 genomas fúngicos de todos los niveles del árbol, pero con mayor muestreo de linajes poco representados o ausentes en las bases de datos genómicas (63), y el conocido como "*Y1000+ Project*" (https://y1000plus.wei.wisc.edu), que propuso secuenciar los genomas de las 1.000 especies, aproximadamente, conocidas de levaduras (filo Ascomycota, subfilo Saccharomycotina).

Estos dos proyectos, más un número significativo de trabajos de grupos de todo el planeta, dejan a disposición de los taxónomos 2.420 secuencias de genomas completos de hongos a mediados de mayo de 2023 (https://mycocosm.jgi.doe.gov/mycocosm/home) (cuadro 1).

Por ser el más sólido, relativamente simple y ampliamente aceptado por los taxónomos, en esta revisión se presenta la descripción realizada en 2017, por Spatafora *et al.* (43), del árbol de la vida del reino, haciendo algunas aclaraciones y adiciones que surgieron desde su publicación. Para complementar la información de los clados, también se utilizó la filogenia propuesta por Naranjo-Ortiz y Gabaldón en el 2019 (24). En la figura 1 se presenta una modificación de los árboles propuestos en estas filogenias.

1. Hongos zoospóricos

Los hongos zoospóricos son el clado más primitivo del reino Fungi. Su morfología es simple al igual que su ciclo de vida, pero se evidencian diferencias importantes según los linajes (64). Dentro de este clado se incluyen: Opisthosporidia (Aphelidiomycota, Rozellomycota/Cryptomycota, Microsporidia), Blastocladiomycota y Chytridiomycota. Las relaciones evolutivas entre estos linajes siguen sin resolverse, dada la profunda divergencia entre estos, el muestreo incompleto actual y la naturaleza parasitaria de muchos de ellos (24).

La morfología de los hongos zoospóricos varía según el grado de desarrollo de su talo, el número y la posición de las estructuras reproductivas y su posición en el sustrato (43).

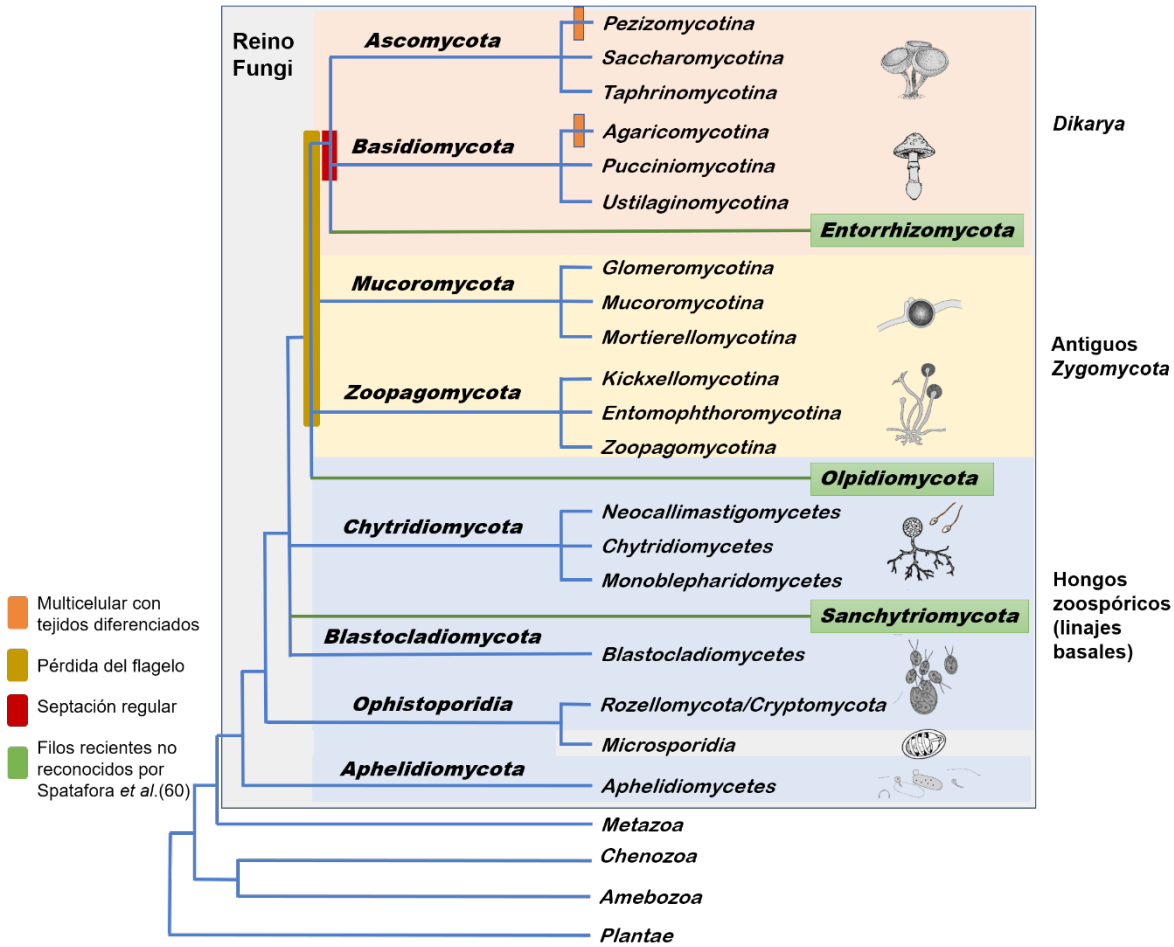
Cuadro 1. Número de especies de hongos con genomas secuenciados, organizados por linajes superiores (https://mycocosm.jgi.doe.gov/mycocosm, revisado a mayo 23 de 2023)

Grupo taxonómicos	Especies con genomas completos secuenciados
Pucciniomycotina	64
Ustilaginomycotina	39
Agaricomycetes	491
Dacrymycetes	9
Tremellomycetes	33
Wallemiomycetes	2
Pezizomycetes	74
Orbiliomycetes	3
Eurotiomycetes	414
Dothideomycetes	219
Lecanoromycetes	12
Leotiomycetes	84
Sordariomycetes	530
Xylonomycetes	2
Saccharomycotina	156
Taphrinomycotina	14
Glomeromycotina	13
Mortierellomycotina	85
Mucoromycotina	77
Entomophthoromycotina	5
Kickxellomycotina	13
Blastocladiomycota	4
Chytridiomycetes	24
Monoblepheridomycetes	2
Neocallimastigomycetes	12
Microsporidia	23
Cryptomycota	3
Total	2.420

1.1. Opisthosporidia. También conocido como clado ARM, consiste en un superfilo propuesto por Karpov *et al.* (65) en el 2014, para incluir a tres filos de hongos zoospóricos: Aphelidiomycota, Rozellomycota-Cryptomycota y Microsporidia. Este superfilo se considera un brazo profundo del linaje Holomycota y todas las especies conocidas de este clado son parásitos intracelulares o parasitoides de una amplia gama de eucariotas.

1.1.1. Microsporidia. Incluye 1.440 especies y comprende un grupo diverso de parásitos intracelulares obligados de 16 filos de metazoos y 4 de protozoos. Fuera de este rango de huéspedes están poco descritos y algunos estudios ambientales sugieren una gran diversidad del grupo basada en su rango de huéspedes y su endemicidad (66).

Como consecuencia de su estilo de vida, presentan genomas muy reducidos (~2,000 genes que codifican para proteínas), hasta el punto de tener algunas características propias de los genomas procariotas, como el solapamiento de genes (67). A diferencia de los demás Opisthosporidia, los Microsporidia carecen de estructuras móviles y de verdaderas mitocondrias (con excepción de *Mitosporidium daphniae*) (66); en su lugar, poseen unos orgánulos llamados mitosomas, sin genoma, y cuya función principal parece ser el ensamblaje de grupos de hierro y azufre. Muchos miembros de este clado han perdido la capacidad de realizar la glucólisis y el ciclo del ácido tricarboxílico, y dependen de la captación de ATP directamente de la célula huésped por medio de una serie de genes adquiridos horizontalmente. Presentan una estructura de penetración muy especializada en forma de arpón, denominada tubo polar, que es un aparato de Golgi modificado (68).



Adaptado de Spatafora *et al.* (43), Bauer *et al.* (59), James *et al.* (62), Li *et al.* (72), Davis *et al.* (86) y Galindo *et al.* (114). Las ramas del árbol representan la historia evolutiva de las especies, pero su longitud en esta gráfica no coincide con su cantidad de cambios. Se señalan los eventos más representativos en la evolución de los filos, como la pérdida del flagelo, septos regulares de las hifas y la formación de estructuras multicelulares con tejidos diferenciados. En los recuadros verdes, se presentan los tres filos no incluidos en la clasificación de Spatafora *et al.* (43), pero aceptados por un gran número de taxónomos de hongos.

Figura 1. Árbol de la vida del reino Fungi

Ya que por mucho tiempo Microsporidia se consideraban protistas, las reglas de su nomenclatura siguen las convenciones para estos organismos. No obstante, desde el 2012, este grupo hace parte del reino Fungi (56). Dentro del filo, se han descrito cuatro géneros asociados con infección en humanos: *Encephalitozoon*, *Enterocytozoon*, *Nosema* y *Pleistophora*, que afectan más frecuentemente a pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), en quienes generan cuadros de diarrea crónica intermitente, colangiopatía, sinusitis, queratoconjuntivitis, nefritis y hepatitis (69).

1.1.2. Rozellomycota-Cryptomycota. El término Cryptomycota se propuso para describir una serie de organismos acuáticos cosmopolitas relacionados con Rozella. Debido a que *Cryptomyces* es un género de Ascomycota y no puede utilizarse para tipificar Cryptomycota, se sugiere abandonar este nombre y adoptar el de Rozellomycota. Rozella es un género de parasitoides flagelados de hongos zoospóricos (Chytridiomycota y Blastocladiomycota), oomicetos y algunas algas verdes (70).

A diferencia de Microsporidia, Rozella presenta un genoma no reducido y mitocondrias verdaderas con un metabolismo mitocondrial reducido.

Rozellomycota incluye cinco géneros: *Rozella*, *Paramicrosporidium*, *Nucleophaga*, *Morellospora* y *Mitosporidium* (71). Se han encontrado secuencias ambientales filogenéticamente relacionadas con Rozella en casi todos los ambientes acuáticos, lo que comprende una divergencia de secuencias muy elevada (70,71).

1.1.3. Aphelidiomycota (Aphelidea). Este clado incluye hongos zoospóricos parasitoides intracelulares de algas (24). Los datos del transcriptoma muestran que los Aphelidiomycota tienen una composición genómica muy similar a la de los hongos de vida libre (71). Rozellomycota y Aphelidiomycota son morfológicamente similares entre sí, pero la distancia genética entre ellos es muy grande. El filo incluye una sola clase, Aphelidea, y tres géneros: *Aphelidium*, *Amoeboaphelidium* y *Pseudaphelidium* (65,71).

1.2. Blastocladiomycota. Los dos filos restantes de hongos zoospóricos son Blastocladiomycota y Chytridiomycota. El orden de ramificación de estos dos linajes no está resuelto y ambos han sido propuestos en grandes análisis filogenéticos multigénicos y a escala genómica como linajes hermanos de los hongos terrestres no flagelados (72-74). Los Blastocladiomycota presentan una amplia gama de morfologías de crecimiento, desde monocéntricas con un desarrollo limitado del talo, hasta policéntricas con la producción de hifas robustas y coenocíticas. La mayoría de las especies conocidas presenta una verdadera alternancia generacional con fases de vida libre haploide y diploide (43).

Este filo tiene características más similares a las de los hongos terrestres, como hifas bien desarrolladas, mitosis cerrada, paredes celulares con β-1-3-glucano y Spitzenkörper (75). Contiene una única clase y un orden, Blastocladiomycetes y Blastocladiales, respectivamente. Los géneros más estudiados dentro de los Blastocladiales incluyen *Allomyces, Blastocladiella, Coelomomyces* y *Physoderma*, que presentan ecologías sapróbicas y parasitarias asociadas con animales y plantas (43).

1.3. Chytridiomycota (Chytridiomyceta). El filo Chytridiomycota para algunos autores está incluido dentro del subreino Chitridiomyceta, ya que en sus análisis el subfilo Neocallimastigomycota y la clase Monoblepharidiomycetes alcanzan el estatus de filo como clados hermanos de Chytridiomycota (73,76,77). No obstante, las filogenias de Spatafora *et al.* (43) y Naranjo-Ortiz y Gabaldón (24), incluyen a Chytridiomycota dentro de sus tres clases Chytridiomycetes, Monoblepharidomycetes y Neocallimastigomycetes, que conforman colectivamente un clado monofilético bien sustentado en análisis a escala genómica, aunque la relación entre sí aún es incierta (78).

Los Chytridiomycota pudieron ser los primeros hongos en ambientes terrestres, pero no está claro si ciertos microfósiles precámbricos representan realmente especies del filo. Los Chytridiomycota son hongos que habitan en el agua, a menudo parásitos de algas y oomicetos, o habitantes del suelo, algunos de los cuales son parásitos de plantas vasculares. Unos pocos hongos quítridos parasitan huevos de animales y protozoos, mientras que otros son saprobios de restos vegetales en descomposición. Chytridiomycetes es, por mucho, la clase más grande de hongos zoospóricos, con alrededor de 1.000 especies descritas (79,80). Actualmente, *Batrachochytrium dendrobatidis* es el Chitridiomycete más conocido por su asociación con la extinción de algunos anfibios (81).

Monoblepharidomycetes, con sólo 30 especies en seis géneros (43), comprende un grupo de hongos zoospóricos, saprobios que crecen en agua dulce sobre ramitas y frutos sumergidos (82). Los Neocallimastigomycetes eran considerados como protozoos flagelados, pero ahora están situados en un grupo distinto de los quítridos centrales por sus secuencias de ADN (73); son los degradadores más potentes de celulosa y los únicos anaerobios obligados del reino fúngico que residen en el rumen y el tubo digestivo de los mamíferos más grandes, y de algunos reptiles, marsupiales y herbívoros aviares (83). Todas las especies producen celulasas y xilanasas que ayudan a degradar las fibras dietéticas de las paredes celulares de las plantas. Muchas de estas enzimas son de origen bacteriano y representan una transferencia horizontal de genes desde bacterias que presumiblemente coexisten con Neocallimastigales*,* en el tubo digestivo de los herbívoros (84). Carecen de mitocondrias verdaderas y albergan hidrogenosomas derivados de mitocondrias. Las especies de esta clase presentan genomas grandes (101 Mb en *Orpinomyces*) con gran contenido de elementos repetitivos y un contenido muy escaso de guaninas y citosinas (tan poco como 17 % en *Orpinomyces*), y un repertorio muy amplio y rico de enzimas que degradan carbohidratos (84).

A diferencia de cualquiera de los otros hongos verdaderos zoospóricos, los miembros de este filo pueden tener múltiples flagelos en una sola espora. De manera similar a Chytridiomycota, las formas pluricelulares de los Neocallimastigomycetes parecen carecer de una verdadera organización de hifas. La clase consta de unas 36 especies distribuidas en 20 géneros (83).

2. Zigomicetos (mohos con septos)

El abandono del filo Zygomycota se formalizó por Hibbett *et al.* en el 2007 (80), porque las filogenias a escala genómica no apoyaban su monofilia y rechazan la zigospora como sinapomorfía (74). Los resultados de los estudios filogenéticos moleculares de ADNr y multilocus, resolvieron estos taxones en dos grandes grupos denominados zygomycetes I, que incluyó a Mucoromycotina, Mortierellomycotina y Glomeromycota (73); y zygomycetes II, que incorporó a Entomophthoromycota, Kickxellomycotina y Zoopagomycotina (72,73,85). La mayoría de los zigomicetos se caracterizan por tener hifas coenocíticas y reproducción asexual por esporangios, pero existen linajes caracterizados por hifas tabicadas o compartimentadas y reproducción asexual por formación de conidios.

La aparición de los zigomicetos marcó la pérdida del flagelo fúngico y el surgimiento de los hongos terrestres filamentosos. En las taxonomías más recientes, lo conforman dos linajes principales: uno compuesto por parásitos de opistocetos (Zoopagomycota) y otro que incluye simbiontes de plantas y saprótrofos (Mucoromycota) (43,72).

2.1. Zoopagomycota. Este clado, hermano de Mucoromycota y Dikarya, es el primer grupo divergente de hongos no flagelados y comprende tres subfilos: Zoopagomycotina, Kickxellomycotina y Entomophthoromycotina (74,80). Las ecologías primarias de los miembros del filo incluyen hongos patógenos y comensales de animales, parásitos de otros hongos y amebas, y otros raramente asociados con plantas. Los tres linajes tienen la capacidad de formar micelios verdaderos. No obstante, su agrupación es solo por afinidad filogenética y su estilo de vida asociado a metazoos, pues morfológicamente no comparten características.

El filo Zoopagomycotina contiene un único orden, Zoopagales, un clado monofilético que incluye cinco familias y alrededor de 20 géneros (80,86), caracterizados por hifas delgadas, coenocíticas y que forman haustorios sobre sus huéspedes o dentro de ellos. Los análisis moleculares de miembros de este subfilo sugieren altas tasas evolutivas (86).

Kickxellomycotina unifica varios grupos fúngicos poco estudiados, unidos por la presencia de micelios con septos que presentan poros únicos con un tapón lenticular y esporangios característicos, con cuatro órdenes, más varios géneros de ubicación filogenética aún no resuelta (87). Entomophthoromycotina comprende tres clases principales: Basidiobolomycetes, Neozygitomycetes y Entomophthoromycetes, cada una con un solo orden. Todos los grupos de Entomophthoromycotina presentan 24-metilcolesterol como el principal esterol de membrana (88).

Basidiobolomycetes es el linaje más antiguo y comprende el género *Basidiobolus*, un comensal intestinal saprótrofo de anfibios y reptiles, y patógeno oportunista humano (89). Entomophthoromycetes es la clase más rica en especies y la mejor caracterizada del subfilo con varias familias de parásitos de insectos, en su mayoría especializados, que forman un grupo monofilético bien definido, y algunos géneros pequeños compuestos por parásitos de algas desmídeas, nematodos, tardígrados y helechos. Comprende principalmente el género *Conidiobolus*, entidad saprobia, parásito facultativo de insectos y patógeno humano ocasional (88,90).

2.2. Mucoromycota. Es el grupo hermano de Dikarya*,* con estilos de vida dominantes asociados a plantas, lo que sugiere que el *Most Recent Common Ancestor* (MRCA) de Mucoromycota y Dikarya corresponde al origen de las asociaciones modernas hongo-planta. Comprende el grupo más grande y mejor estudiado de hongos zigomicetos y está formado por los subfilos: Glomeromycotina, Mortierellomycotina y Mucoromycotina (74,91).

A diferencia de Zoopagomycota, Mucoromycota se caracteriza por asociaciones vegetales y ecologías basadas en plantas (por ejemplo, micorrizas, endófitos radiculares, descomponedores, etc.). Algunos existen como parásitos de animales y otros hongos, pero todos ellos causan infecciones oportunistas en huéspedes con sistemas inmunológicos comprometidos o representan derivaciones relativamente recientes de ecologías sapróbicas (92).

Evidencia previa ubicaba al subfilo Glomeromycotina en un clado con Dikarya (82), por lo que llegó a considerarse un filo aparte (93). No obstante, las filogenias a escala genómica y los análisis del contenido de ADN apoyan firmemente a las micorrizas arbusculares como miembros de Mucoromycota y los relacionan con Mucoromycotina y Mortierellomycotina (74).

Los Mortierellomycotina son endófitos de las raíces de las plantas, pero se desconoce su efecto sobre la salud del huésped. El subfilo incluye una familia, 13 géneros y más de 100 especies reconocidas actualmente (94). Mortierellomycotina se diferencia de Mucoromycotina por la morfología de la zigospora y la ausencia de columela. Mucoromycotina contiene el resto de las especies conocidas de zigomicetos y se clasifica en tres órdenes: Mucorales, Umbelopsidales y Endogonales, y 17 familias (76,92,95).

Mucorales es uno de los grupos de hongos más comúnmente aislados porque muchos son colonizadores tempranos, de rápido crecimiento, de

sustratos ricos en carbono. En comparación con la mayoría de los hongos, las paredes celulares de Mucoromycotina contienen quitosano, una forma desacetilada de la quitina, como principal componente estructural (92). También, presentan una extrusión del esporangióforo, denominada columela, que es sinapomórfica para el subfilo. La mayoría de las especies son saprótrofas y, ocasionalmente, pueden ser parásitos facultativos de animales, plantas y otros hongos. Incluyen especies de importancia clínica en humanos, donde son agentes patógenos oportunistas causantes de infecciones de rápida progresión y gran mortalidad (96).

2.3. Dikarya. Es el único subdominio descrito de los hongos y el grupo más rico en especies y mejor estudiado. Comprende los filos Ascomycota y Basidiomycota, aunque recientemente se ha propuesto un tercer grupo de endófitos radiculares: Entorrhizomycota (59).

El nombre Dikarya se refiere a la condición de poseer dos núcleos genotípicamente distintos dentro del talo en algún momento del ciclo de vida. Las hifas de Dikarya están regularmente tabicadas, el ergosterol es el principal esterol de la membrana y varios linajes son capaces de formar estructuras reproductivas o vegetativas multicelulares. Se han secuenciado más genomas de especies de Ascomycota y Basidiomycota que de otros filos del reino Fungi (http://genome.jgi.doe.gov/fungi/), lo que ha contribuido a una mayor resolución de las relaciones filogenéticas y a los procesos evolutivos que han dado forma a la diversidad filogenética y ecológica de Dikarya.

2.4. Ascomycota. Es el filo fúngico más grande y comprende, aproximadamente, dos tercios de todas las especies descritas (97). Incluye descomponedores de múltiples sustratos (por ejemplo, estiércol, madera, suelo), simbiontes y asociados de plantas y animales, habitantes de ecosistemas marinos y terrestres, y la mayoría de las especies patógenas para humanos (98). Ascomycota consta de tres subfilos: Taphrinomycotina, y los linajes hermanos Saccharomycotina y Pezizomycotina.

Durante la reproducción sexual, se induce la formación de hifas dicariontes de vida muy corta, que conducen a la formación del asca, una estructura en forma de saco que contiene las ascosporas (normalmente ocho) derivadas de la meiosis. Las esporas asexuales (conidias) u otros medios de propagación asexual son muy comunes, y los estadios sexuales son desconocidos para muchos miembros del filo. El filo incluye desde simples levaduras a hongos con cuerpos fructíferos macroscópicos muy complejos (43). Taphrinomycotina (antes conocida como Archiascomycota) forma el primer clado divergente de Ascomycota reconocido por la gran diversidad morfológica entre sus géneros, con formas de crecimiento tanto levaduriformes como filamentosas, y la monotípica de sus clases (un solo género por clase) (99).

El subfilo Saccharomycotina (anteriormente conocido como Hemiascomycota) incluye una sola clase y un orden (Saccharomycetes, Saccharomycetales), que abarca 14 familias y alrededor de 1.500 especies (100). Es el linaje eucariota mejor representado en términos de información genómica con *Saccharomyces cerevisiae* como el primer eucariota secuenciado y 156 especies con secuencia genómica completa (cuadro 1).

Los Saccharomycetales incluyen la mayoría de las levaduras de ascomicetos y se caracterizan por la gemación en la reproducción asexual (100). Aunque son relativamente similares en morfología, los datos genómicos de las últimas décadas han permitido abordar la problemática

filogenia y taxonomía de las levaduras (101). Se ha demostrado la parafilia de ciertos géneros importantes –por ejemplo, *Candida*– reflejado en el desplazamiento de varias especies de *Candida,* de importancia clínica, a otros como *Pichia*, *Meyerozyma* y *Nakaseomyces*, entre otros (102).

Los miembros del subfilo Pezizomycotina (anteriormente conocido como Euascomycota) son en su mayoría filamentosos y anastomosados, con septos que presentan el cuerpo de Woronin, aunque muchos tienen crecimiento dimorfo, y otros son unicelulares. En comparación con otros hongos, tienden a contener abundantes enzimas para el metabolismo secundario (103). El subfilo contiene aproximadamente 63.000 especies que se clasifican en 13 clases y 67 órdenes (43,80). No obstante, una fracción importante permanece sin clasificar, tal y como se describe en el catálogo de la vida (104). Contiene más de 5.000 especies, cuya afiliación a cualquiera de estas clases es desconocida y muchas ni siquiera están clasificadas a nivel de familia.

2.5. Basidiomycota**.** Es el segundo filo más rico en especies de hongos, con cerca de 32.000 descritas (80,105), las cuales presentan una amplia gama de estilos de vida y estrategias de organización celular.

Este filo incluye los hongos más complejos en términos de ciclo celular y multicelularidad, y su principal característica es la producción de células especializadas en forma de clava, llamadas basidias, que suelen producir cuatro esporas sexuales, característica que es compartida con Entorrhizomycota (106). El apareamiento suele implicar la anastomosis entre las hifas de cada hongo (somatogamia) y la formación de un dicarión, condición mantenida gracias a la formación de fíbulas. Los núcleos del dicarión permanecen asociados antes de sufrir la cariogamia y la meiosis para producir las basidiosporas. Las hifas, cuando están presentes, son tabicadas y en algunos grupos los septos presentan doliporos (un retículo endoplasmático modificado en forma de paréntesis).

El filo contiene cuatro linajes bien definidos: Pucciniomycotina, Ustilagomycotina, Agaricomycotina, y el recientemente descrito, Wallemiomycotina *(*107*).* Pucciniomycotina incluye más de 8.400 especies descritas, clasificadas en 10 clases, 20 órdenes y 35 familias, en las que son comunes las levaduras y las formas de crecimiento dimorfo (108). Este subfilo contiene un clado muy diverso de agentes patógenos vegetales llamados royas (clase Pucciniomycetes), así como algunas especies de vida libre que suelen crecer como levaduras saprótrofas. También, se describen micoparásitos, patógenos de insectos y micorrizas (106). Algunos miembros del grupo, en particular en Pucciniomycetes, tienen genomas muy grandes (109), y varios tienen ciclos de vida muy complejos que implican varios huéspedes y etapas de vida libre. La pared celular contiene manosa, pero carece de xilosa.

El subfilo Ustilaginomycotina comprende unas 1.700 especies de levaduras, casi todas anamorfas o dimorfas. La mayoría de las especies descritas son agentes patógenos vegetales, normalmente biotróficos (tizones), mientras que otras viven como levaduras saprótrofas de vida libre o patógenos animales (por ejemplo, *Malassezia*). Los hongos patógenos de plantas suelen tener estados asexuales de levadura, a menudo con capacidad sapróbica, y un estado micelial dicarionte infectante (106).

Agaricomycotina es el grupo más grande de Basidiomycota, que contiene alrededor de dos tercios de todos los *Basidiomycota* descritos. El subfilo tiene tres clases: Tremellomycetes, Dacrymycetes y Agaricomycetes (80).

Los Tremellomycetes incluyen especies de levaduras como *Cryptococcus* y *Tremella* (110). Muchas especies son micoparásitas, viven dentro de los cuerpos fructíferos de otros hongos y los infectan por medio de un tipo particular de haustorio; mientras otras son levaduras de vida libre o patógenos animales (111). Dacrymycetes incluye un pequeño grupo de hongos descomponedores de la madera (112), mientras que Agaricomycetes son los hongos predominantes en los bosques con 22 órdenes y más de 21.000 especies (106). Son principalmente simbiontes ectomicorrícicos, hongos patógenos de los árboles y agentes de la descomposición de la madera y la hojarasca, que provocan podredumbres pardas o blancas.

3. Filos recientes no incluidos por Spatafora *et al.* (43)

Es importante anotar que constantemente se proponen nuevos grupos taxonómicos, inclusive en niveles superiores de filo o subfilo, dada la evidencia derivada de los análisis filogenéticos, algunos con datos que dan peso a los hallazgos. No obstante, muchos de estos no tienen eco en los taxónomos de hongos y terminan en el olvido o a la espera de nuevos estudios que refuercen los datos originales. Tres nuevos filos, recientemente propuestos, aparecen con frecuencia en los árboles filogenéticos: Entorrhizomycota, Sanchytriomycota y Olpidiomycota.

3.1. Entorrhizomycota**.** Una de las clasificaciones más controvertidas en el árbol de la vida de los hongos es la elevación de Entorrhiza, un parásito de la raíz formador de agallas en Poales, al nivel de filo. Este taxón ha pertenecido clásicamente, junto con Ustilaginomycotina, a Basidiomycota por sus grandes similitudes en la ultraestructura del poro del septo y la germinación de teliosporas.

El filo Entorrhizomycota se erigió después de que una filogenia de cinco genes colocara a Entorrhiza como hermana de los otros Dikarya, aunque otros análisis posteriores lo propusieran dentro o como hermana de Basidiomycota (59). Debido a las similitudes morfológicas con los tizones, el bajo número de genes empleados en la filogenia y el escaso apoyo estadístico, esta ubicación es controvertida. En el 2017, un análisis de seis genes publicado por Zhao *et al.* (105), y que recibió gran apoyo, erigió el nuevo filo Entorrizhamycota, luego consolidado por análisis posteriores (113). El filo incluye dos órdenes, Entorrhizales (con 16 especies) y Talbotiomycetales (con una sola especie), pero estudios ambientales sugieren la carencia de diversidad en este filo (113).

3.2. Nuevos filos zoospóricos. El avance en las técnicas de secuenciación a partir de una sola célula está permitiendo estudiar hongos poco conocidos, principalmente de los clados basales. Con los recientes hallazgos obtenidos por estas metodologías, se ha propuesto la existencia de dos nuevos filos dentro de los hongos zoospóricos: Sanchytriomycota y Olpidiomycota (114).

3.2.1. Sanchytriomycota. El análisis filogenético de dos conjuntos de datos independientes de proteínas conservadas demostró que Sanchytriomycota forma un nuevo filo fúngico de rápida evolución, hermano de Blastocladiomycota. Este filo solo comprende dos especies de hongos atípicos, parásitos de algas (*Amoeboradix gromovi* y *Sanchytrium tribonematis*), con un ciclo vital complejo que incluye una fase flagelada (zoosporas) con flagelos inmóviles que participan en un proceso reductor continuo (114).

3.2.2. Olpidiomycota. Los análisis filogenéticos confirmaron la posición del flagelado *Olpidium* como hermano del principal grupo de hongos no flagelados (Zoopagomycota, Mucoromycota y Dikarya) (115), lo que sugiere que, de forma análoga a los sanquítridos, los Olpidiomycota representan un estadio intermedio entre los hongos zoospóricos que poseen flagelos completamente funcionales y los hongos que carecen de ellos. El filo incluye una sola clase, un solo orden (Olpidiales) y una sola familia, cuatro géneros y alrededor de 30 especies (116). El género más reconocido es *Olpidium*, compuesto por hongos zoospóricos, endoparásitos morfológicamente simples con una pared celular (presumiblemente quitinosa) presente en todas las fases del crecimiento parasitario. Se encuentra como endoparásito obligado de algas, plantas, hongos y pequeños animales (114).

Conclusiones

La organización taxonómica de los hongos continúa siendo una asignatura pendiente. Son muchos los esfuerzos llevados a cabo desde siglos atrás para conseguir un árbol de la vida del reino Fungi coherente, pero, a pesar de la plétora de datos morfológicos, bioquímicos, fisiológicos, ecológicos, y más recientemente, moleculares, el camino por recorrer es largo, y con toda seguridad, lleno de tropiezos, retrocesos, y por qué no, algunos atajos gracias a los nuevos desarrollos que puedan producirse en los próximos años en cuanto a la obtención, manipulación y organización de la información.

Sin duda, si los investigadores de la taxonomía y la filogenia de los hongos no llegan a un acuerdo sobre cómo trabajar mancomunadamente, la tarea será más difícil. Es necesaria la creación de unas pocas bases de datos curadas para los genomas y secuencias incluidas en los diferentes estudios filogenéticos (un número extenso continuaría con la disgregación y la confusión). Además, deben depurarse las bases de datos existentes para eliminar o completar aquellas secuencias que generan conflicto cuando son incluidas en los análisis filogenéticos. El acceso a la información en el área debería ser libre para que los científicos de países con escasos recursos, con zonas muy endémicas de hongos no descubiertos y que son piezas clave en el rompecabezas del árbol de la vida fúngico, puedan generar datos filogenéticos de gran calidad.

Uno de los mayores problemas para los que desean aportar en el estudio de la taxonomía fúngica, es encontrarse con los desacuerdos entre los grupos más reconocidos que trabajan en el área. Estas disputas solo generan desasosiego en los investigadores y perpetúan las publicaciones redundantes o que poco aportan a la organización taxonómica de los organismos vivos. Las metodologías basadas en las ciencias ómicas facilitan la identificación de nuevos taxones y permiten trabajar con un número muy grande de secuencias. Estas herramientas, sumadas a las nuevas técnicas o los métodos de análisis que se propongan en los años venideros, ayudarán para la creación de reglas claras sobre cómo abordar la taxonomía fúngica, definir los alcances y los límites de los análisis, entender cómo delimitar una especie dentro del reino Fungi y decidir hacia dónde se deben dirigir los mayores esfuerzos.

Para los profesionales del área de la salud, la taxonomía de los hongos puede resultar tediosa o poco relevante para su quehacer diario. No obstante, estos análisis son el insumo para identificar a los hongos, entender su biología, comprender su papel en los diferentes ecosistemas y reconocer

su impacto cuando asumen nuevos roles como contaminantes o causantes de procesos infecciosos en humanos, animales y plantas. Son precisamente los estudios metagenómicos, junto con los análisis filogenéticos, los que han permitido reconocer a los hongos del microbioma humano y entender que, más que simples comensales, participan de manera activa en la homeostasis de los tejidos donde se encuentran. También, los análisis del genoma ayudan a indagar sobre la epidemiología de las micosis, los procesos alérgicos y sus agentes causales, y a definir si un brote está asociado a un ambiente hospitalario o extrahospitalario, según la posible fuente de contaminación.

La secuenciación de los genomas de un mayor número de taxones dará las herramientas para:

1. diseñar nuevas técnicas de diagnóstico molecular, con mayor sensibilidad, especificidad y rápida ejecución;
2. facilitar el desarrollo de nuevos fármacos antifúngicos y métodos terapéuticos alternativos, y
3. reconocer los mecanismos que expliquen la disminución o no de la respuesta a la terapia antifúngica asociada a mecanismos de resistencia innatos o adquiridos.

Referencias

1. Purvis A, Hector A. Getting the measure of biodiversity. Nature. 2000;405:2129. https://doi.org/10.1038/35012221
2. Lodge DJ. Nutrient cycling by fungi in wet tropical forests. In: Isaac S, Frankland JC, Watling R and Whalley AJS, editors. Aspects of tropical mycology. Cambridge: Cambridge University Press; 1992. p. 37-57.
3. Goodell B. 15 fungi involved in the biodeterioration and bioconversion of lignocellulose substrates. In: Benz JP, Schipper K, editors. Genetics and biotechnology. 3rd edition. Cham: Springer International Publishing; 2020. p. 36997. https://doi.org/10.1007/978-3-030-49924-2_15
4. El-Baky NA, Amara AA. Recent approaches towards control of fungal diseases in plants: An updated review. J Fungi. 2021;7:900-16. https://doi.org/10.3390/jof7110900
5. Köhler JR, Casadevall A, Perfect J. The spectrum of fungi that infects humans. Cold Spring Harb Perspect Med. 2015;5:1-22. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019273
6. Rokas A. Evolution of the human pathogenic lifestyle in fungi. Nat Microbiol. 2022;7:60719. https://doi.org/10.1038/s41564-022-01112-0
7. Gadre A, Enbiale W, Andersen LK, Coates SJ. The effects of climate change on fungal diseases with cutaneous manifestations: A report from the International Society of Dermatology Climate Change Committee. J Clim Change Health. 2022;6:100156. https://doi.org/10.1016/j.joclim.2022.100156
8. Singh BK, Delgado-Baquerizo M, Egidi E, Guirado E, Leach JE, Liu H, *et al*. Climate change impacts on plant pathogens, food security and paths forward. Nat Rev Microbiol. 2023;117. https://doi.org/10.1038/s41579-023-00900-7
9. Vitiello A, Ferrara F, Boccellino M, Ponzo A, Cimmino C, Comberiati E, *et al*. Antifungal drug resistance: An emergent health threat. Biomedicines. 2023;11:1063. https://doi.org/10.3390/biomedicines11041063
10. Roth MG, Westrick NM, Baldwin TT. Fungal biotechnology: From yesterday to tomorrow. Front Fungal Biol. 2023;4. https://doi.org/10.3389/ffunb.2023.1135263
11. Tedersoo L, Bahram M, Põlme S, Kõljalg U, Yorou NS, Wijesundera R, *et al*. Global diversity and geography of soil fungi. Science. 2014;346:1-10. https://doi.org/10.1126/science.1256688
12. Hawksworth DL, May TW, Redhead SA. Fungal nomenclature evolving: Changes adopted by the 19th International Botanical Congress in Shenzhen 2017, and procedures for the Fungal Nomenclature Session at the 11th International Mycological Congress in Puerto Rico 2018. IMA Fungus. 2017;8:211. https://doi.org/10.5598/imafungus.2017.08.02.01

13. Kidd SE, Abdolrasouli A, Hagen F. Fungal nomenclature: Managing change is the name of the game. Open Forum Infect Dis. 2023;10. https://doi.org/10.1093/ofid/ofac559

14. Zachos FE. Historical development, theoretical foundations and practical relevance. In: Zachos FE: Species concepts in biology. Cham: Springer; 2016. p. 220.

15. Xu J. Fungal species concepts in the genomics era. Genome. 2020;63:45968. https://doi.org/10.1139/gen-2020-0022

16. Chethana KW, Manawasinghe IS, Hurdeal VG, Bhunjun CS, Appadoo MA, Gentekaki E, *et al*. What are fungal species and how to delineate them? Fungal Divers. 2021;109:1-25. https://doi.org/10.1007/s13225-021-00483-9

17. Stengel A, Stanke KM, Quattrone AC, Herr JR. Improving taxonomic delimitation of fungal species in the age of genomics and phenomics. Front Microbiol. 2022;13. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.847067

18. Vellinga EC, Kuyper TW, Ammirati J, Desjardin DE, Halling RE, Justo A, *et al*. Six simple guidelines for introducing new *genera* of fungi. IMA Fungus. 2015;6:658. https://doi.org/10.1007/BF03449356

19. Wu B, Hussain M, Zhang W, Stadler M, Liu X, Xiang M. Current insights into fungal species diversity and perspective on naming the environmental DNA sequences of fungi. Mycology. 2019;10:12740. https://doi.org/10.1080/21501203.2019.1614106

20. Wang F, Wang K, Cai L, Zhao M, Kirk PM, Fan G, *et al*. Fungal names: A comprehensive nomenclatural repository and knowledge base for fungal taxonomy. Nucleic Acids Res. 2023;51:D70816. https://doi.org/10.1093/nar/gkac926

21. Rossman AY. Lessons learned from moving to one scientific name for fungi. IMA Fungus. 2014;5:819. https://doi.org/10.5598/imafungus.2014.05.01.10

22. Hyde KD, Abd-Elsalam K, Cai L. Morphology: Still essential in a molecular world. Mycotaxon. 2011;114:43951. https://doi.org/10.5248/114.439

23. Singer R. The Agaricales in modern taxonomy. Koenigstein: Koeltz Scientific Books; 1986. p. 981.

24. Naranjo-Ortiz MA, Gabaldón T. Fungal evolution: Diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. Biol Rev. 2019;94:210137. https://doi.org/10.1111/brv.12550

25. Brandt ME, Warnock DW. Taxonomy and classification of the Fungi. Taxonomy, classification, and nomenclature of Fungi. In: Jonhson EM, Pritt BS, editors. Manual of clinical microbiology. 12th edition. Washington, D.C.: ASM Press; p. 200811. https://doi.org/10.1128/9781683670438.MCM.ch116_3

26. Wang Z, Nilsson RH, James TY, Dai Y, Townsend JP. Future perspectives and challenges of fungal systematics in the age of big data. In: Li D, editor. Biology of microfungi. Cham: Springer; 2016. p. 2546.

27. Gautam AK, Verma RK, Avasthi S, Sushma, Bohra Y, Devadatha B, *et al*. Current insight into traditional and modern methods in fungal diversity estimates. J Fungi. 2022;8:226. https://doi.org/10.3390/jof8030226

28. Hibbett DS, Taylor JW. Fungal systematics: Is a new age of enlightenment at hand? Nat Rev Microbiol. 2013;11:12933. https://doi.org/10.1038/nrmicro2963

29. Antil S, Abraham JS, Sripoorna S, Maurya S, Dagar J, Makhija S, *et al*. DNA barcoding, an effective tool for species identification: A review. Mol Biol Rep. 2023;50:76175. https://doi.org/10.1007/s11033-022-08015-7

30. Bruns TD, White TJ, Taylor JW. Fungal molecular systematics. Annu Rev Ecol Syst. 1991;22:52564. https://doi.org/10.1146/annurev.es.22.110191.002521

31. Hawksworth DL, Crous PW, Redhead SA, Reynolds DR, Samson RA, Seifert KA, *et al*. The Amsterdam declaration on fungal nomenclature. IMA Fungus. 2011;2:10512. https://doi.org/10.5598/imafungus.2011.02.01.14

32. Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, *et al*. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109:62416. https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109

33. Pervez MT, Hasnain MJU, Abbas SH, Moustafa MF, Aslam N, Shah SSM. A comprehensive review of performance of next-generation sequencing platforms. Biomed Res Int. 2022;2022. https://doi.org/10.1155/2022/3457806

34. Salem-Bango Z, Price TK, Chan JL, Chandrasekaran S, Garner OB, Yang S. Fungal whole-genome sequencing for species identification: From test development to clinical utilization. J Fungi. 2023;9. https://doi.org/10.3390/jof9020183

35. Das R, Rai A, Mishra DC. CNN FunBar: Advanced learning technique for fungi ITS region classification. Genes. 2023;14:634. https://doi.org/10.3390/genes14030634

36. Yahr R, Schoch CL, Dentinger BTM. Scaling up discovery of hidden diversity in fungi: Impacts of barcoding approaches. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2016;371. https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0336

37. Raja HA, Miller AN, Pearce CJ, Oberlies NH. Fungal identification using molecular tools: A primer for the natural products research community. J Nat Prod. 2017;80:75670. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085

38. Garnica S, Schön ME, Abarenkov K, Riess K, Liimatainen K, Niskanen T, *et al*. Determining threshold values for barcoding fungi: Lessons from Cortinarius (Basidiomycota), a highly diverse and widespread ectomycorrhizal genus. FEMS Microbiol Ecol. 2016;92. https://doi.org/10.1093/femsec/fiw045

39. Balasundaram SV, Engh IB, Skrede I, Kauserud H. How many DNA markers are needed to reveal cryptic fungal species? Fungal Biol. 2015;119:9405. https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.07.006

40. Chen J, Moinard M, Xu J, Wang S, Foulongne-Oriol M, Zhao R, *et al*. Genetic analyses of the internal transcribed spacer sequences suggest introgression and duplication in the medicinal mushroom *Agaricus subrufescens*. PLoS ONE. 2016;11:e0156250. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156250

41. Stielow JB, Lévesque CA, Seifert KA, Meyer W, Irinyi L, Smits D, *et al*. One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes. Pers Mol Phylogeny Evol Fungi. 2015;35:24263. https://doi.org/10.3767/003158515X689135

42. Porras-Alfaro A, Liu KL, Kuske CR, Xiec G. From genus to phylum: Large-subunit and internal transcribed spacer rRNA operon regions show similar classification accuracies influenced by database composition. Appl Environ Microbiol. 2014;80:82940. https://doi.org/10.1128/AEM.02894-13

43. Spatafora JW, Aime MC, Grigoriev IV, Martin F, Stajich JE, Blackwell M. The fungal tree of life: From molecular systematics to genome-scale phylogenies. Microbiol Spectr. 2017;5. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0053-2016

44. Lücking R, Aime MC, Robbertse B, Miller AN, Ariyawansa HA, Aoki T, *et al*. Unambiguous identification of fungi: Where do we stand and how accurate and precise is fungal DNA barcoding? IMA Fungus. 2020;11:132. https://doi.org/10.1186/s43008-020-00033-z

45. Xu J. Fungal DNA barcoding. Genome. 2016;59:91332. https://doi.org/10.1139/gen-2016-0046

46. Oliveira M, Azevedo L. Molecular markers: An overview of data published for fungi over the last ten years. J Fungi. 2022;8:803. https://doi.org/10.3390/jof8080803

47. Bradshaw MJ, Guan GX, Nokes L, Braun U, Liu SY, Pfister DH. Secondary DNA barcodes (CAM, GAPDH, GS, and RpB2) to characterize species complexes and strengthen the powdery mildew phylogeny. Front Ecol Evol. 2022;10. https://doi.org/10.3389/fevo.2022.918908

48. Tekpinar AD, Kalmer A. Utility of various molecular markers in fungal identification and phylogeny. Nova Hedwigia. 2019;109:187224. https://doi.org/10.1127/nova_hedwigia/2019/0528

49. Bisby GR, Ainsworth GC. The numbers of fungi. TBMS. 1943;26:169. https://doi.org/10.1016/S0007-1536(43)80005-X

50. Hawksworth DL. The fungal dimension of biodiversity: Magnitude, significance, and conservation. Mycol Res. 1991;95:64155. https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80810-1

51. Blackwell M. The fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species? Am J Bot. 2011;98:42638. https://doi.org/10.3732/ajb.1000298

52. Hawksworth DL, Lücking R. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. Microbiol Spectr. 2017;5. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016

53. Baldrian P, Větrovský T, Lepinay C, Kohout P. High-throughput sequencing view on the magnitude of global fungal diversity. Fungal Divers. 2021;114:53947. https://doi.org/10.1007/s13225-021-00472-y

54. Hawksworth DL, Rossman AY. Where are all the undescribed fungi? Phytopathology. 1997;87:88891. https://doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.9.888

55. Fierer N, Jackson RB. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. Proc Natl Acad Sci USA. 2006;103:62631. https://doi.org/10.1073/pnas.050753510

56. May TW, Redhead SA, Bensch K, Hawksworth DL, Lendemer J, Lombard L, *et al*. Chapter F of the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants as approved by the 11th International Mycological Congress, San Juan, Puerto Rico, July 2018. IMA Fungus. 2019;10. https://doi.org/10.1186/s43008-019-0019-1

57. Grossart HP, Wurzbacher C, James TY, Kagami M. Discovery of dark matter fungi in aquatic ecosystems demands a reappraisal of the phylogeny and ecology of zoosporic fungi. Fungal Ecol. 2016;19:2838. https://doi.org/10.1016/j.funeco.2015.06.004

58. Tedersoo L, Bahram M, Puusepp R, Nilsson RH, James TY. Novel soil-inhabiting clades fill gaps in the fungal tree of life. Microbiome. 2017;5:110. https://doi.org/10.1186/s40168-017-0259-5

59. Bauer R, Garnica S, Oberwinkler F, Riess K, Weiß M, Begerow D. Entorrhizomycota: A new fungal phylum reveals new perspectives on the evolution of fungi. PLoS ONE. 2015;10. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128183

60. Jayasiri SC, Hyde KD, Ariyawansa HA, Bhat J, Buyck B, Cai L, *et al*. The faces of fungi database: Fungal names linked with morphology, phylogeny and human impacts. Fungal Divers. 2015;74:318. https://doi.org/10.1007/s13225-015-0351-8

61. Prakash PY, Irinyi L, Halliday C, Chen S, Robert V, Meyer W. Online databases for taxonomy and identification of pathogenic fungi and proposal for a cloud-based dynamic data network platform. J Clin Microbiol. 2017;55:101124. https://doi.org/10.1128/JCM.02084-16

62. James TY, Stajich JE, Hittinger CT, Rokas A. Toward a fully resolved fungal tree of life. Annu Rev Microbiol. 2020;74:291313. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-022020-051835

63. Grigoriev I V., Nikitin R, Haridas S, Kuo A, Ohm R, Otillar R, *et al*. MycoCosm portal: Gearing up for 1000 fungal genomes. Nucleic Acids Res. 2014;42. https://doi.org/10.1093/nar/gkt1183

64. Gleason FH, Scholz B, Jephcott TG, van Ogtrop FF, Henderson L, Lilje O, *et al*. Key ecological roles for zoosporic true fungi in aquatic habitats. Microbiol Spectr. 2017;5:1-18. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0038-2016

65. Karpov SA, Mamkaeva MA, Aleoshin VV, Nassonova E, Lilje O, Gleason FH. Morphology, phylogeny, and ecology of the aphelids (Aphelidea, Opisthokonta) and proposal for the new superphylum Opisthosporidia. Front Microbiol. 2014;5:112. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00112

66. Murareanu BM, Sukhdeo R, Qu R, Jiang J, Reinke AW. Generation of a Microsporidia species attribute database and analysis of the extensive ecological and phenotypic diversity of Microsporidia. mBio. 2021;12. https://doi.org/10.1128/mbio.01490-21

67. Pombert JF, Selman M, Burki F, Bardell FT, Farinelli L, Solter LF, *et al*. Gain and loss of multiple functionally related, horizontally transferred genes in the reduced genomes of two microsporidian parasites. Proc Natl Acad Sci USA. 2012;109:1263843. https://doi.org/10.1073/pnas.1205020109

68. Cuomo CA, Desjardins CA, Bakowski MA, Goldberg J, Ma AT, Becnel JJ, *et al*. Microsporidian genome analysis reveals evolutionary strategies for obligate intracellular growth. Genome Res. 2012;22:247888. https://doi.org/10.1101/gr.142802.112

69. van Gool T, Dankert J. Human microsporidiosis: Clinical, diagnostic and therapeutic aspects of an increasing infection. Clin Microbiol Infect. 1995;1:7585. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.1995.tb00450.x

70. Gleason FH, Carney LT, Lilje O, Glockling SL. Ecological potentials of species of Rozella (Cryptomycota). Fungal Ecol. 2012;5:6516. https://doi.org/10.1016/j.funeco.2012.05.003

71. Glotova A, Nassonova E. Rozellids and aphelids: Cryptic diversity and distribution in the environment. Protistology. 2022;16:25165. https://doi.org/10.21685/1680-0826-2022-16-4-1

72. Li Y, Steenwyk JL, Chang Y, Wang Y, James TY, Stajich JE, *et al*. A genome-scale phylogeny of the kingdom Fungi. Curr Biol. 2021;31:1653-65. https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.01.074

73. James TY, Kauff F, Schoch CL, Matheny PB, Hofstetter V, Cox CJ, *et al*. Reconstructing the early evolution of fungi using a six-gene phylogeny. Nature. 2006;443:81822. https://doi.org/10.1038/nature05110

74. Spatafora JW, Chang Y, Benny GL, Lazarus K, Smith ME, Berbee ML, *et al*. A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. Mycologia. 2016;108:1028. https://doi.org/10.3852/16-042

75. Dee JM, Mollicone M, Longcore JE, Roberson RW, Berbee ML. Cytology and molecular phylogenetics of Monoblepharidomycetes provide evidence for multiple independent origins of the hyphal habit in the Fungi. Mycologia. 2015;107:71028. https://doi.org/10.3852/14-275

76. Dai DQ, Wijayawardene NN, Zhang GQ, Gao Y, Wijayawardene NN, Hyde KD, *et al*. Outline of fungi and fungus-like taxa 2021. Mycosphere. 2022;13:53453. https://doi.org/10.5943/mycosphere/13/1/2

77. Tedersoo L, Sánchez-Ramírez S, Kõljalg U, Bahram M, Döring M, Schigel D, *et al*. High-level classification of the fungi and a tool for evolutionary ecological analyses. Fungal Divers. 2018;90:13559. https://doi.org/10.1007/s13225-018-0401-0

78. Chang Y, Wang S, Sekimoto S, Aerts AL, Choi C, Clum A, *et al*. Phylogenomic analyses indicate that early fungi evolved digesting cell walls of algal ancestors of land plants. Genome Biol Evol. 2015;7:1590601. https://doi.org/10.1093/gbe/evv090

79. Wu B, Hao W, Cox MP. Reconstruction of gene innovation associated with major evolutionary transitions in the kingdom Fungi. BMC Biol. 2022;20:111. https://doi.org/10.1186/s12915-022-01346-8

80. Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, *et al*. A higher-level phylogenetic classification of the fungi. Mycol Res. 2007;111:50947. https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.03.004

81. Berger L, Speare R, Daszak P, Green DE, Cunningham AA, Goggin CL, *et al*. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. Proc Natl Acad Sci USA. 1998;95:90316. https://doi.org/10.1073/pnas.95.15.9031

82. James TY, Letcher PM, Longcore JE, Mozley-Standridge SE, Porter D, Powell MJ, *et al*. A molecular phylogeny of the flagellated fungi (Chytridiomycota) and description of a new phylum (Blastocladiomycota). Mycologia. 2017;98:86071. https://doi.org/10.1080/15572536.2006.11832616

83. Hanafy RA, Dagar SS, Griffith GW, Pratt CJ, Youssef NH, Elshahed MS. Taxonomy of the anaerobic gut fungi (Neocallimastigomycota): A review of classification criteria and description of current taxa. Int J Syst Evol Microbiol. 2022;72:005322. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005322

84. Youssef NH, Couger MB, Struchtemeyer CG, Liggenstoffer AS, Prade RA, Najar FZ, *et al*. The genome of the anaerobic fungus *Orpinomyces* sp. strain c1a reveals the unique evolutionary history of a remarkable plant biomass degrader. Appl Environ Microbiol. 2013;79:462034. https://doi.org/10.1128/AEM.00821-13

85. Strullu-Derrien C, Selosse MA, Kenrick P, Martin FM. The origin and evolution of mycorrhizal symbioses: From palaeomycology to phylogenomics. New Phytologist. 2018;220:101230. https://doi.org/10.1111/nph.15076

86. Davis WJ, Amses KR, Benny GL, Carter-House D, Chang Y, Grigoriev I, *et al*. Genome-scale phylogenetics reveals a monophyletic Zoopagales (Zoopagomycota, Fungi). Mol Phylogenet Evol. 2019;133:15263. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.01.006

87. Tretter ED, Johnson EM, Benny GL, Lichtwardt RW, Wang Y, Kandel P, *et al*. An eight-gene molecular phylogeny of the Kickxellomycotina, including the first phylogenetic placement of Asellariales. Mycologia. 2017;106:91235. https://doi.org/10.3852/13-253

88. Humber RA. Entomophthoromycota: A new phylum and reclassification for entomophthoroid fungi. Mycotaxon. 2012;120:47792. https://doi.org/10.5248/120.477

89. Manning RJ, Callaghan AA. Pathogenicity of *Conidiobolus* spp. and Basidiobolus ranarum to arthropods co-occurring in leaf litter. Fungal Ecol. 2008;1:339. https://doi.org/10.1016/j.funeco.2007.12.003

90. Gryganskyi AP, Humber RA, Smith ME, Hodge K, Huang B, Voigt K, *et al*. Phylogenetic lineages in Entomophthoromycota. Pers Mol Phylogeny Evol Fungi. 2013;30:94-105. https://doi.org/10.3767/003158513X666330

91. Hoffmann K, Voigt K, Kirk PM. Mortierellomycotina subphyl. nov., based on multi-gene genealogies. Mycotaxon. 2011;115:35363. https://doi.org/10.5248/115.353

92. Hoffmann K, Pawłowska J, Walther G, Wrzosek M, de Hoog GS, Benny GL, *et al.* The family structure of the Mucorales: A synoptic revision based on comprehensive multigenegenealogies. Pers Mol Phylogeny Evol Fungi. 2013;30:5776. https://doi.org/10.3767/003158513X666259

93. Oehl F, Sieverding E, Palenzuela J, Ineichen K, da Silva GA. Advances in Glomeromycota taxonomy and classification. IMA Fungus. 2011;2:1919. https://doi.org/10.5598/imafungus.2011.02.02.10

94. Wagner L, Stielow B, Hoffmann K, Petkovits T, Papp T, Vágvölgyi C, *et al.* A comprehensive molecular phylogeny of the Mortierellales (Mortierellomycotina) based on nuclear ribosomal DNA. Pers Mol Phylogeny Evol Fungi. 2013;30:7793. https://doi.org/10.3767/003158513X666268

95. Desirò A, Rimington WR, Jacob A, Vande-Pol N, Smith ME, Trappe JM, *et al.* Multigene phylogeny of Endogonales, an early diverging lineage of fungi associated with plants. IMA Fungus. 2017;8:24557. https://doi.org/10.5598/imafungus.2017.08.02.03

96. Tahiri G, Lax C, Cánovas-Márquez JT, Carrillo-Marín P, Sanchis M, Navarro E, *et al.* Mucorales and mucormycosis: Recent insights and future prospects. J Fungi. 2023;9:335. https://doi.org/10.3390/jof9030335

97. Schoch CL, Sung GH, López-Giráldez F, Townsend JP, Miadlikowska J, Hofstetter V, *et al.* The Ascomycota tree of life: A phylum-wide phylogeny clarifies the origin and evolution of fundamental reproductive and ecological traits. Syst Biol. 2009;58:22439. https://doi.org/10.1093/sysbio/syp020

98. Rokas A. Evolution of the human pathogenic lifestyle in fungi. Nat Microbiol. 2022;7:60719. https://doi.org/10.1038/s41564-022-01112-0

99. Nguyen TA, Cissé OH, Yun Wong J, Zheng P, Hewitt D, Nowrousian M, *et al.* Innovation and constraint leading to complex multicellularity in the Ascomycota. Nat Commun. 2017;8:113. https://doi.org/10.1038/ncomms14444

100. Kurtzman C, Fell JW. Boekhout T. The yeasts. A taxonomic study. 5th edition. Amsterdam: Elsevier Science; 2011. p. 2354.

101. Dujon BA, Louis EJ. Genome diversity and evolution in the budding yeasts (Saccharomycotina). Genetics. 2017;206:71750. https://doi.org/10.1534/genetics.116.199216

102. Borman AM, Johnson EM. Name changes for fungi of medical importance, 2018 to 2019. J Clin Microbiol. 2021;59. https://doi.org/10.1128/JCM.01811-20

103. Sarikaya-Bayram Ö, Palmer JM, Keller N, Braus GH, Bayram Ö. One Juliet and four Romeos: VeA and its methyltransferases. Front Microbiol. 2015;6. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00001

104. Bisby FA, Roskov YR, Orrell TM, Nicolson D, Paglinawan LE, Bailly N. Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, Annual Checklist. Species 2000/ ITIS; 2006. Accessed: June 2, 2023. Available from: http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2006

105. Zhao RL, Li GJ, Sánchez-Ramírez S, Stata M, Yang ZL, Wu G, *et al.* A six-gene phylogenetic overview of Basidiomycota and allied *phyla* with estimated divergence times of higher taxa and a phyloproteomics perspective. Fungal Divers. 2017;84:4374. https://doi.org/10.1007/s13225-017-0381-5

106. McLaughlin DJ, Spatafora JW. Systematics and evolution: Part A. Second edition. Berlin: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p.1461.

107. Prasanna AN, Gerber D, Kijpornyongpan T, Aime MC, Doyle VP, Nagy LG. Model choice, missing data, and taxon sampling impact phylogenomic inference of deep Basidiomycota relationships. Syst Biol. 2020;69:1737. https://doi.org/10.1093/sysbio/syz029

108. Schell WA, Lee AG, Aime MC. A new lineage in Pucciniomycotina: Class Tritirachiomycetes, order Tritirachiales, family Tritirachiaceae. Mycologia. 2017;103:133140. https://doi.org/10.3852/10-333

109. Tavares S, Ramos AP, Pires AS, Azinheira HG, Caldeirinha P, Link T, *et al.* Genome size analyses of Pucciniales reveal the largest fungal genomes. Front Plant Sci. 2014;5:422. https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00422

110. Hibbett DS. A phylogenetic overview of the Agaricomycotina. Mycologia. 2017;98:91725. https://doi.org/10.3852/mycologia.98.6.917

111. Liu XZ, Wang QM, Göker M, Groenewald M, Kachalkin AV, Lumbsch HT, *et al*. Towards an integrated phylogenetic classification of the Tremellomycetes. Stud Mycol. 2015;81:85147. https://doi.org/10.1016/j.simyco.2015.12.001

112. Shirouzu T, Hirose D, Oberwinkler F, Shimomura N, Maekawa N, Tokumasu S. Combined molecular and morphological data for improving phylogenetic hypothesis in Dacrymycetes. Mycologia. 2017;105:111025. https://doi.org/10.3852/12-147

113. Riess K, Schön ME, Ziegler R, Lutz M, Shivas RG, Piątek M, *et al*. The origin and diversification of the Entorrhizales: Deep evolutionary roots but recent speciation with a phylogenetic and phenotypic split between associates of the Cyperaceae and Juncaceae. Org Divers Evol. 2019;19:1330. https://doi.org/10.1007/s13127-018-0384-4

114. Galindo LJ, López-García P, Torruella G, Karpov S, Moreira D. Phylogenomics of a new fungal phylum reveals multiple waves of reductive evolution across Holomycota. Nat Commun. 2021;12:114. https://doi.org/10.1038/s41467-021-25308-w

115. Chang Y, Rochon DA, Sekimoto S, Wang Y, Chovatia M, Sandor L, *et al*. Genome-scale phylogenetic analyses confirm Olpidium as the closest living zoosporic fungus to the non-flagellated, terrestrial fungi. Scient Rep. 2021;11:112. https://doi.org/10.1038/s41598-021-82607-4

116. Wijayawardene NN, Pawłowska J, Letcher PM, Kirk PM, Humber RA, Schüßler A, *et al*. Notes for *genera*: basal clades of Fungi. Fungal Divers. 2018;92:43129. https://doi.org/10.1007/s13225-018-0409-5

Biomédica 2023;43(Supl.1):312-22
doi: https://doi.org/10.7705/biomedica.7219

Educación continua

Haga usted el diagnóstico
Segunda parte

Yenny Ariza[1], Cristian Leonardo Cubides[1,2], Daniel Alejandro Cubillos[2,3], Carmen Lucía Roa[1], José Camilo Álvarez[1,2], Sonia Isabel Cuervo-Maldonado[1,2,3]

[1] Grupo de Medicina Interna e Infectología, Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá, D.C., Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá, D.C., Colombia
[2] Grupo de Investigación en Enfermedades Infecciosas en Cáncer y Alteraciones Hematológicas, Colombia
[3] Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

En la segunda biopsia de ganglio axilar, no se informaron hallazgos de neoplasia maligna. Se observaron numerosos granulomas de diferentes tamaños, algunos con extensa necrosis central rodeada por histiocitos y algunas células gigantes multinucleadas; en el material necrótico, se apreciaron estructuras redondeadas rosadas. La coloración para bacilos ácido-alcohol resistentes (Ziehl-Neelsen) fue negativa; las coloraciones para hongos y la de PAS fueron negativas. La coloración de Gomori fue positiva para numerosas estructuras micóticas redondas, algunas en “timón de barco”. Los hallazgos se interpretaron como la presencia de numerosas estructuras micóticas sugestivas de *Paracoccidioides* spp. (figura 1). Los cultivos para gérmenes comunes, micobacterias y hongos fueron negativos.

Se planteó el diagnóstico de paracoccidioidomicosis ganglionar. Se inicio tratamiento con deoxicolato de anfotericina B durante 14 días, y se observó mejoría de las adenopatías cervicales y axilares en su tamaño y características.

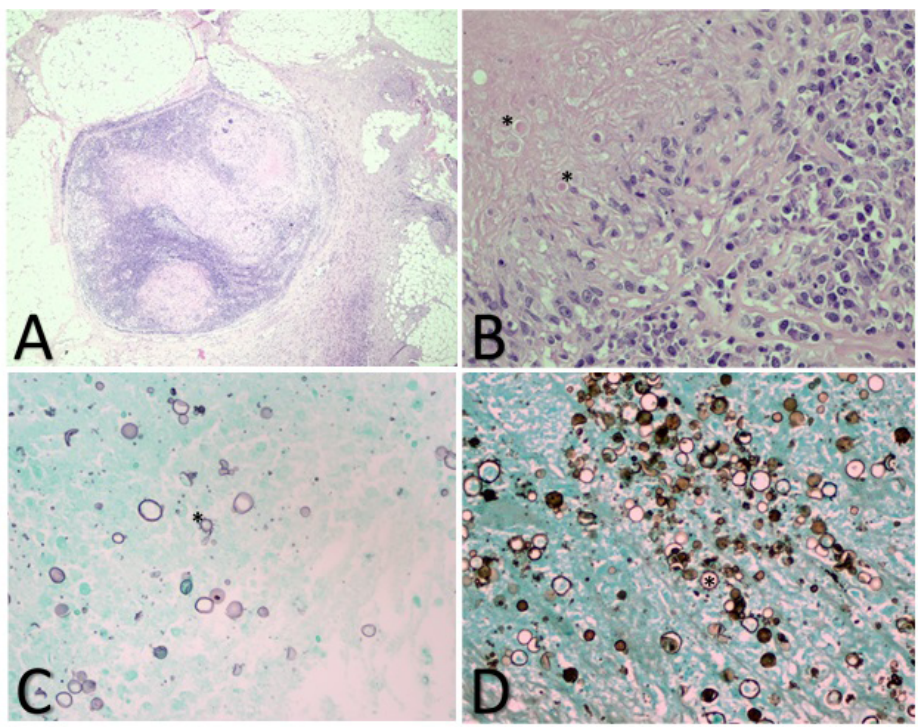


Figura 1. Biopsia de ganglio linfático izquierdo. A. Se observa ganglio linfático con numerosos granulomas de diferentes tamaños, algunos con extensa necrosis central rodeada por histiocitos y algunas células gigantes multinucleadas; en el material necrótico se aprecian estructuras redondeadas rosadas. B. Se observan levaduras esféricas de doble pared, de 30 a 60 µm de diámetro. Hematoxilina y eosina, 20X. C y D. Se aprecian numerosas estructuras micóticas redondas, alguna en "timón de barco". Gomori, 20X.

Recibido: 10/04/2023
Aceptado: 07/07/2023
Publicado: 11/07/2023

Citación:
Ariza Y, Cubides CL,Cubillos DA, Roa CL, Álvarez JC, Cuervo-Maldonado SI. Paracoccidioidomicosis ganglionar juvenil. Biomédica. 2023;43(Supl.1):312-22
https://doi.org/10.7705/biomedica.7219

Correspondencia:
Sonia Isabel Cuervo-Maldonado, Carrera 30 N° 45-03, edificio 471, oficina 510, Bogotá, D. C, Colombia
Teléfono: (0571) 316 5000, extensión 15012
sicuervom@unal.edu.co; scuervo@cancer.gov.co

Contribución de los autores:
Yenny Ariza y Sonia Isabel Cuervo-Maldonado: diagnóstico clínico, tratamiento del paciente y escritura del documento
Cristian Leonardo Cubides y José Camilo Álvarez: revisión crítica y escritura del documento
Daniel Alejandro Cubillos: revisión bibliográfica, revisión crítica y escritura del documento
Carmen Lucía Roa: diagnóstico histológico, figuras complementarias y revisión crítica

Financiación:
Este caso clínico no contó con financiación.

Conflicto de intereses:
Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Se dio de alta al paciente, para continuar el tratamiento antimicrobiano por doce meses y con las alternativas terapéuticas disponibles, itraconazol versus trimetoprim-sulfametoxazol. Dada la condición social del paciente, se decidió formularle trimetoprim-sulfametoxazol y hacer control médico por consulta externa de infectología.



Paracoccidioidomicosis ganglionar juvenil

Resumen

La paracoccidioidomicosis es una enfermedad endémica del continente latinoamericano, específicamente en zonas tropicales, y afecta con mayor frecuencia y de manera crónica a individuos inmunocompetentes; sin embargo, existen formas agudas y de presentación diseminada. El agente patógeno responsable es *Paracoccidioides brasiliensis*, un hongo dimorfo que se transmite por inhalación y cuya progresión depende del control y la vulnerabilidad del sistema inmunológico.

En este caso clínico, se expone la historia de un hombre de 23 años procedente de Venezuela, sin antecedentes de importancia, que consultó por dolor lumbosacro crónico, múltiples linfadenopatías y hepatoesplenomegalia. Inicialmente, se sospechó una linfadenitis bacteriana o un posible linfoma no Hodgkin, por lo cual se remitió a un centro de referencia en cáncer.

Los estudios de extensión y la histopatología demostraron levaduras en disposición de "timón de barco", lo cual confirmó el diagnóstico de paracoccidioidomicosis. Finalmente, se observó mejoría de las lesiones con el tratamiento antifúngico dirigido y se continuó con tratamiento oral ambulatorio.

Este caso permite demostrar la complejidad del diagnóstico de la paracoccidioidomicosis por sus múltiples diagnósticos diferenciales y por las diferentes manifestaciones que puede presentar según el huésped. El objetivo de presentar este caso fue recordar al lector que las micosis endémicas en población migrante son un diagnóstico diferencial que se debe considerar en el abordaje de las linfadenitis periféricas.

Palabras clave: paracoccidioidomicosis; linfadenitis; micosis; adulto joven; inmunocompetencia; emigrantes e inmigrantes.

Juvenile node paracoccidioidomicosys

Abstract

Paracocciodiodomycosis is an endemic disease of the Latin American continent, specifically in tropical areas, and it most frequently affects chronically immunocompetent individuals; however, there are acute and disseminated forms. The responsible pathogen is *Paracoccidioides brasiliensis*, a dimorphic fungus transmited by inhalation and whose progression depends on the control and susceptibility of the immune system.

The following clinical case presents the history of a 23-year-old man from Venezuela, with no significant medical history, who consulted for chronic lumbosacral pain, multiple lymphadenopathies, and hepatosplenomegaly. Bacterial lymphadenitis or a possible non-Hodgkin lymphoma were initially suspected. He was referred to a cancer center, where extension studies and histopathology showed the presence of yeast in a "captain's wheel" formation, confirming the diagnosis of paracoccidioidomycosis. Finally, a targeted antifungal treatment was performed, observing improvement of the lesions and he continued as an outpatient with oral treatment.

This case allows to demonstrate the complexity of the diagnosis of paracoccidioidomycosis due to its multiple differential diagnoses and the different manifestations that it can present depending on the host. The purpose of reporting this was to remind the reader that endemic mycoses in the migrant population are a differential diagnosis that should be considered in the approach to peripheral lymphadenitis.

Key words: Paracoccidioidomycosis; lymphadenitis; mycoses; young adult; immunocompetence; emigrants and immigrants.

Introducción

La paracoccidioidomicosis es una micosis sistémica endémica en Latinoamérica, más frecuente en Brasil, Argentina, Colombia y Venezuela, causada por un hongo dimorfo, *Paracoccidioides brasiliensis*, el cual incluye cuatro grupos genéticos *S1, PS2, PS3, PS4* y una nueva especie, *Paracoccidioides lutzii*; esta última fue descrita en la región medio-occidental de Brasil, principalmente en el Estado de Mato Grosso, con datos clínicos y de laboratorio muy limitados que, comparados con los del perfil clínico-epidemiológico propio de *P. brasiliensis*, no muestran diferencias particulares (1).

Turissini *et al.* (2), en un estudio de 65 aislamientos de *P. brasiliensis*, compararon los polimorfismos del ADN nuclear y mitocondrial y, con estos datos, establecieron una nueva clasificación del complejo *P. brasiliensis* compuesto por cuatro nuevas especies: *P. brasiliensis sensu stricto* (clados S1a y S1b), *P. americana* (PS2), *P. restrepiensis* (PS3) y *P. venezuelensis* (PS4). *Paracoccidioides brasiliensis sensu stricto* está ampliamente disperso en el sudeste de Brasil, Argentina y Paraguay; *P. americana* (PS2) ha sido reportado en el sureste de Brasil y raramente en Venezuela; *P. restrepiensis* (PS3) se encuentra predominantemente en Colombia y en otros países latinoamericanos, y *P. venezuelensis* (PS4) parece ser dominante en Venezuela (3).

El hongo está presente en la naturaleza como filamentos que contienen propágulos infecciosos llamados conidios. En áreas endémicas de Latinoamérica, la infección se adquiere por inhalación de los conidios presentes en suelos contaminados con el hongo, los cuales dan lugar a levaduras, que es la forma parasitaria en los tejidos del huésped (4). El principal factor de riesgo para adquirir la infección son las profesiones o actividades relacionadas con el manejo de suelos contaminados con el hongo, tales como actividades agrícolas, movimiento de tierras, preparación del suelo, jardinería y transporte de productos vegetales.

En las zonas endémicas, la infección se adquiere principalmente en las primeras dos décadas de la vida, pero las manifestaciones clínicas ocurren con mayor frecuencia en adultos entre los 30 y los 50 años, después de la reactivación del foco endógeno latente (5). Según el estado inmunológico del huésped, la infección se puede resolver espontáneamente o puede progresar en forma aguda, subaguda o crónica. La presentación linfática corresponde a la paracoccidioidomicosis ganglionar juvenil, la cual es más frecuente en personas jóvenes, como el caso que se presenta.

Epidemiología

La epidemiología de la paracoccidioidomicosis está bien establecida. Brasil es uno de los muchos países con un gran número de pacientes y se sabe que esta enfermedad es particularmente endémica en el estado de Minas Gerais, hecho que habla de la amplia variación ambiental entre las diferentes áreas dentro de este estado (6). Restrepo *et al.* revisaron varios estudios sobre la ecología de *P. brasiliensis*; a pesar de algunas incertidumbres sobre su ecología específica, se sabe que la paracoccidioidomicosis florece en regiones de temperatura y alturas moderadas, clima húmedo con copiosas precipitaciones y zonas con abundantes recursos hídricos (7). Estas condiciones se cumplen en varias regiones con zonas de bosques tropicales y subtropicales, que son predominantes en el continente suramericano. En el contexto de la

globalización, se espera que la paracoccidioidomicosis sea más frecuente en otros países como una enfermedad importada, lo que representa un nuevo problema de salud emergente para los países con frecuentes viajeros internacionales e inmigrantes.

El hábitat que permite el desarrollo de la forma infectante corresponde a áreas en un rango de temperatura entre los 10 y los 28 °C, con una precipitación entre 500 y 2.500 mm por año y una altitud de 47 a 1.300 msnm (8). Estas características las cumple el país de procedencia del paciente, Venezuela, el cual es el tercero más afectado por la paracoccidioidomicosis en Latinoamérica, a pesar de que se estima que existen un importante subdiagnóstico y una escasa notificación.

Primavera *et al.,* en un estudio de 745 casos registrados en Venezuela durante 65 años, entre 1954 y 2019, informan casos de paracoccidioidomicosis en varios estados, siendo el Estado de Miranda el que más casos aporta, seguido de Guárico, Aragua, Carabobo y Anzoátegui (1 a 3 casos); este último, era el lugar de procedencia del paciente (8). En las formas de presentación agudas o subagudas, se informa compromiso ganglionar hasta en el 82 % de los casos. Entre 1930 y 2012, la mediana de casos por año en Venezuela fue de 25,9 casos (9); la mortalidad varía entre el 6,1 y el 7,6 % (10).

Por otra parte, se encontró que el 32,48 % de los pacientes afectados con paracoccidioidomicosis eran trabajadores rurales, trabajadores de mantenimiento general o del área de la construcción (7).

En toda Colombia, se ha reportado una incidencia entre 0,5 y 2,2 por 100.000 habitantes y, en los seis municipios con mayor incidencia, una entre 0,8 y 3,1 por 100.000 habitantes. La mediana de casos por año en Colombia fue de 32,4 entre 1930 y 2012 (9).

De igual manera, Torrado *et al.* estudiaron 1.191 casos en un estudio retrospectivo entre 1949 y 1999. Nueve departamentos se clasificaron como endémicos, ya que informaron más de 32 casos por año; ocho corresponden a la región andina (Antioquia, Santander, Cundinamarca, Meta, Norte de Santander, Caldas, Boyacá y Tolima) y el otro es el departamento del Magdalena (Sierra Nevada de Santa Marta) (11). Dieciocho departamentos se catalogaron como regiones de baja endemicidad (2 a 27 casos) y, los 5 restantes, como no endémicos (1 caso). Entre los departamentos de baja endemicidad, se encuentra el de Casanare, sitio de procedencia del paciente.

Por otra parte, entre 1980 y 1998, y con base en el diagnóstico anual de casos, se encontraron ocho departamentos donde se había diagnosticado la enfermedad por periodos de 13 a 19 años, lo que permitió clasificarlos como endémicos. Además, 15 se consideraron de baja endemicidad, con base en un período de diagnóstico de 2 a 12 años. Los restantes 10 fueron clasificados como no endémicos, por haber informado la entidad solamente en un año. La mayor incidencia nacional, 2,4 pacientes por 1’000.000 habitantes, se obtuvo en 1980. Debido a que esta no es una enfermedad de reporte obligatorio, no se tienen datos precisos de la incidencia y la mortalidad (12,13).

Según Martínez y el mapa de endemicidad de la paracoccidioidomicosis en Latinoamérica, la zona central de Colombia y la zona centro-oriental de Venezuela son aquellas con mayor número de casos informados (9). El

paciente es natural del estado de Anzoátegui, en el que se han informado pocos casos de la enfermedad; además, durante su estancia en Colombia, ha permanecido en un municipio con muy pocos casos. Según nuestro conocimiento, este es el tercer caso de paracoccidioidomicosis ganglionar juvenil informado en Colombia. (11,14,15).

Según la endemicidad de la paracoccidioidomicosis en Venezuela y en Colombia, y la forma de presentación de la enfermedad (ganglionar juvenil), se considera que el paciente adquirió la infección en Venezuela y la desarrolló en Colombia.

Fisiopatología

La paracoccidioidomicosis es causada, en gran medida, por la composición antigénica y los mecanismos de virulencia del hongo; por ende, la reacción inmunológica del huésped juega un papel determinante, en el que las variantes genéticas facilitan la presentación o el control de la enfermedad (16).

El agente patógeno se transmite por inhalación. Por esto, la reacción inmunológica se inicia en el alvéolo pulmonar, en donde el hongo se fija a proteínas de la matriz extracelular e interactúa con las células epiteliales. Estas activan la reacción inmunológica innata, en la que los macrófagos alveolares son la principal defensa contra este agente patógeno, al fagocitar y eliminar las conidias y las levaduras, mediante mecanismos asociados con el metabolismo oxidativo. La reacción que generan es inespecífica y se acompaña de la formación de granulomas (17).

Posteriormente, la reacción inmunológica adaptativa juega un papel fundamental en el control del agente patógeno, el cual va a depender de la reacción de hipersensibilidad tardía contra el hongo y sus antígenos, ya que, por sus mecanismos de virulencia, este puede estimular la apoptosis de linfocitos y aumentar la expresión de citocinas antiinflamatorias y, con ello, de linfocitos reguladores.

En pacientes afectados por la enfermedad, se ha identificado una reacción de linfocitos Th2 (T helper 2) asociados con una reacción humoral. En pacientes con la infección, que habitan en zonas endémicas, se presentan reacciones y perfiles celulares asociados con linfocitos Th1 (T helper 1); estos conllevan una reacción mediada por células, especialmente macrófagos y células T citotóxicas, lo que demuestra una mejor reacción contra el hongo (1,16).

En individuos propensos que tengan una infección primaria, el curso clínico de la enfermedad puede tomar diferentes rutas. Una de ellas ocurre especialmente en niños, adolescentes y pacientes inmunocomprometidos, en quienes el sistema inmunológico es incapaz de controlar el agente patógeno y la infección se disemina. Esta se denomina una infección sistémica rápidamente progresiva o una forma aguda o subaguda. La otra forma de la enfermedad se presenta en adultos en quienes el control es parcial, y la diseminación del agente patógeno se produce de manera crónica por medio del sistema linfático y el venoso (16).

Clasificación

De acuerdo con el Coloquio Internacional de 1986, la paracoccidioidomicosis se clasifica según las manifestaciones clínicas y la historia natural de la enfermedad, en las siguientes categorías: infección

asintomática; enfermedad con manifestaciones clínicas; forma aguda en niños y subaguda en adolescentes; forma crónica en adultos (unifocal o multifocal), y forma residual (18).

Formas clínicas

Aguda o subaguda en niños y adolescentes

Esta forma clínica de la paracoccidioidomicosis afecta niños, adolescentes y adultos hasta los 35 años de edad, y corresponde del 3 al 5 % de todos los casos (18). Representa la evolución directa del foco primario pulmonar y puede progresar con un curso clínico agudo o subagudo de la fungemia.

Aunque todos los sistemas y órganos se pueden comprometer, el sistema reticuloendotelial es el más afectado. El cuadro clínico predominante se caracteriza por linfadenopatía generalizada (superficial y profunda) y hepatoesplenomegalia, por lo que esta presentación se puede confundir con enfermedad linfoproliferativa sistémica, como ocurrió con el caso que se presenta; según el grado de diseminación, se puede subtipificar como forma moderada o grave. Se pueden identificar varios cuadros clínicos, como: 1) síntomas gastrointestinales (diarrea, dolor abdominal), masas o ambos; 2) signos y síntomas de afectación osteoarticular, que simulan osteomielitis o artritis; 3) síndrome abdominal agudo. La afectación de mucosas y pulmón es infrecuente, aunque la enfermedad puede comenzar como una infección respiratoria o con lesiones cutáneas (5,14,15).

Forma crónica focal o multifocal en adultos

Es la forma más común de la paracoccidioidomicosis (90 %) y afecta con más frecuencia a los hombres. La forma unifocal se caracteriza porque la evolución es crónica, con síntomas respiratorios e infiltrado retículo-nodular pulmonar, generalmente, con afectación de los dos tercios superiores. La forma multifocal incluye el compromiso extrapulmonar de piel, mucosa oral (19), faríngea, laríngea y de la encía (ápices dentales), por lo que los síntomas pueden incluir dolor asociado con la masticación, sialorrea y odinofagia. Otros órganos afectados incluyen glándulas suprarrenales, sistema nervioso central (20), ganglios linfáticos superficiales y profundos, sistema macrófago-monocito (hígado y bazo), sistema osteoarticular y epididimitis.

La paracoccidioidomicosis abdominal se observa en la forma subaguda, con una amplia variedad de manifestaciones clínicas, que van desde náuseas, vómitos, ascitis, ictericia, dolor abdominal variable, hepatoesplenomegalia, malabsorción, masa tumoral, obstrucción intestinal, peritonitis y mesenteritis, hasta abdomen agudo por perforación de víscera hueca. La ictericia suele aparecer en una etapa tardía y está asociada con una enfermedad más grave. Normalmente, es causada por compresión extrínseca del colédoco por ganglios linfáticos. Otras causas descritas son lesión granulomatosa intraluminal del colédoco (lesión intrínseca), lesión hepática y paracoccidioidomicosis pancreática (21).

Diagnósticos diferenciales

El principal diagnóstico diferencial de la paracoccidioidomicosis es la tuberculosis pulmonar y están también micobacterias atípicas, sarcoidosis, histoplasmosis, neumonitis intersticial idiopática difusa, silicosis crónica, coccidioidomicosis, cromoblastomicosis, leishmaniasis cutánea y visceral, lepra, y cáncer cutáneo o laríngeo.

En el caso aquí presentado, el diagnóstico diferencial considerado en el primer lugar en donde consultó fue el de linfoma por causa de la linfadenitis cervical y axilar; sin embargo, en la segunda biopsia tomada del ganglio axilar, no se encontraron signos de malignidad. Por otra parte, y aunque la asociación de paracoccidioidomicosis con tuberculosis se describe hasta en el 30 % de los casos (22), el resultado de los cultivos del ganglio axilar fue negativo.

Diagnóstico

El diagnóstico en el laboratorio está dirigido a la visualización del hongo en muestras clínicas o su aislamiento mediante cultivo; la cuantificación de anticuerpos o la detección de antígenos del hongo en el suero, pueden considerarse como criterios diagnósticos indirectos (10).

El examen directo tiene una sensibilidad entre el 85 y el 100 %, la cual depende de la muestra; así, en muestras de las vías respiratorias con técnicas como montaje húmedo en esputo, exudados o el lavado broncoalveolar, se revela el hongo en más del 85 % de los casos. En el examen micológico directo positivo se pueden observar levaduras grandes (5 a 15 µm) que tienen una pared celular gruesa y birrefringente, con brotes únicos o múltiples. Estos brotes múltiples tienen forma de “volante” o “Mickey Mouse” y se consideran hallazgos patognomónicos en el diagnóstico de paracoccidioidomicosis.

Para el estudio histopatológico de la biopsia, se recomienda la coloración de plata con metenamina de Gomori, en la que se puede observar la levadura en gemación múltiple (figura 3). Con la de hematoxilina y eosina, se evidencian granulomas con células multinucleadas gigantes, células epitelioides, mononucleares y neutrófilos (figura 3) (23).

El cultivo en agar Sabouraud dextrosa a temperatura de 37 °C confirma la infección activa. Sin embargo, el resultado tarda entre 20 y 30 días, es positivo únicamente en el 85 % de las muestras y tiene alto riesgo de contaminación, por lo cual deben hacerse múltiples cultivos de repetidas muestras y, además, en diferentes medios de cultivo (24).

Por último, otras técnicas diagnósticas inmunológicas son de utilidad para el seguimiento del paciente; entre estas, se encuentra la prueba de inmunodifusión en agar, que puede demostrar la presencia de anticuerpos en más del 90 % de los casos; además, está la prueba de fijación de antígeno, que puede presentar reacción cruzada con antígenos de *Histoplasma capsulatum.* También se usan otras técnicas como ELISA e inmunotransferencia (*immunoblotting*).

Los cambios taxonómicos impulsados por la secuenciación genómica completa de *Paracoccidioides*, han puesto de relieve la necesidad de reconocer las especies. Actualmente, las técnicas clásicas de laboratorio no tienen un poder discriminatorio significativo y, hasta la fecha, se desconoce la utilidad clínica de identificar la especie. Varios métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) pueden detectar polimorfismos en el ADN e identificar las especies, entre los cuales se puede mencionar; PCR; polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP); reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR); hibridación fluorescente *in situ* (FISH), y amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP). Sin embargo, aún no se dispone de una prueba comercial (23).

Secuelas y complicaciones

Las secuelas de la paracoccidioidomicosis dependen del compromiso orgánico inicial, el estado inmunológico del huésped, la edad, algunas comorbilidades y el tiempo de evolución de la enfermedad. Como en la mayoría de los casos se evidencia compromiso pulmonar, las secuelas que se observan con mayor frecuencia corresponden a fibrosis pulmonar secundaria, alteración en la arquitectura del pulmón y compromiso de la función pulmonar: en orden de frecuencia, se describen fibrosis (32 %), bulas (27 %), signos de hipertensión pulmonar, hipertrofia ventricular derecha y *cor pulmonale* secundario.

En cerca del 85 % de los casos, el compromiso de la glándula suprarrenal encontrado en la autopsia es similar al de la enfermedad de Addison y es potencialmente reversible si se administra el tratamiento antifúngico adecuado.

Cuando hay compromiso de mucosas (a diferencia de la tuberculosis, la cual usualmente no las compromete), las secuelas son pérdidas dentarias, alteraciones de la anatomía propia de la cavidad orofaríngea, el paladar, la lengua y los posibles tejidos circundantes en labios, en nariz o en ambos. También, se pueden comprometer las mucosas de la faringe, la laringe y del tubo digestivo, en el cual se evidencia mayor compromiso en el colon y el íleon terminal (25).

Si hay compromiso en la piel, pueden encontrarse secuelas cicatriciales, y retracciones de la piel y el tejido celular subcutáneo. En ocasiones, pueden encontrarse placas infiltrativas similares a las lesiones producidas por sarcoidosis y, en menor proporción, se pueden evidenciar granulomas residuales.

El compromiso del sistema nervioso central es raro (aproximadamente en el 9 % de los casos), pudiéndose manifestar como un efecto seudotumoral o de masa expansiva, con afectación de los hemisferios cerebrales (el 69 % de las lesiones se ubican allí) o como síndrome de compresión medular o espondilodiscitis. Sin tratamiento adecuado, se puede presentar paraplejia, incontinencia urinaria y estados de postración (26).

Tratamiento

El itraconazol es el medicamento usado para tratar las formas leves a moderadas de la infección, el cual ha demostrado ser superior a otros antimicrobianos como el cotrimoxazol, en cuanto a tasa de éxito y menor tiempo de cura serológica. El itraconazol tiene una tasa de éxito del 91 % usado durante seis meses; sin embargo, se recomienda que la duración sea de 9 a 12 meses y, para el caso del cotrimoxazol, de 18 a 24 meses (23). En pacientes inmunocomprometidos y presentaciones graves y diseminadas, se recomienda el deoxicolato de anfotericina B durante 2 a 4 semanas como terapia de inducción. Después de ello, se recomienda un tratamiento de mantenimiento con antifúngicos de la familia de los azoles. Para el tratamiento de la forma aguda o subaguda, se puede usar el cotrimoxazol por su tolerabilidad y su presentación tanto oral como intravenosa (27).

Criterios de curación

Una vez la enfermedad es diagnosticada, el tratamiento requiere un seguimiento periódico, ya que este no erradica al hongo, sino que reduce la carga fúngica en el individuo y permite la recuperación con la reacción inmunológica. Dicho seguimiento se puede hacer de manera ambulatoria.

Teniendo en cuenta esto, la duración del tratamiento también se puede ajustar según los criterios de curación que son clínicos, micológicos, radiológicos e inmunológicos (23).

En cuanto a los criterios clínicos, se requiere la ausencia o regresión de los signos y síntomas de la enfermedad, los cuales indican una respuesta favorable al tratamiento. Entre estos criterios, se pueden encontrar la mejoría de la lesión en piel, la involución de las adenomegalias y la recuperación del peso corporal. Cabe mencionar que es frecuente la persistencia de síntomas residuales o secuelas asociadas con fibrosis y cicatrización en órganos como los pulmones, el sistema linfático y las glándulas suprarrenales, y deben diferenciarse de la presentación clínica de la infección activa.

Los criterios micológicos se refieren a que el examen microscópico directo se torne negativo en muestras clínicas. Este criterio puede ser verificado, especialmente en secreciones respiratorias.

Para cumplir con los criterios radiológicos, se hace un seguimiento semestral de las imágenes torácicas, buscando una estabilización del patrón radiológico, ya que se da una transición de patrones nodulares, micronodulares o, incluso, lesiones cavitadas que se vuelven lineales con el tiempo, lo cual indica cicatrización y fibrosis (28).

En cuanto a los criterios inmunológicos, si es posible, se hace seguimiento serológico cada seis meses. La técnica más frecuentemente usada es la reacción de inmunodifusión en agar, cuyos títulos de anticuerpos se vuelven negativos o se estabilizan en valores bajos con el tratamiento. Otra técnica utilizada es la contrainmunoelectroforesis.

Sin embargo, no se aplica el término de cura definitiva en pacientes con paracoccidioidomicosis, porque *P. brasiliensis* no es erradicado del organismo. Por ello, después del tratamiento y el cumplimiento de estos criterios, los pacientes deben seguir en controles clínicos y serológicos, por lo menos, un año después (23).

Asociación entre paracoccidioidomicosis e inmunosupresión

La asociación potencial entre la paracoccidioidomicosis y el cáncer –la cual fue descrita por primera vez en 1933, debido a que el hongo tiene afinidad por comprometer el pulmón– es de particular interés. Aunque no se ha comprobado que la incidencia de cáncer en pacientes con paracoccidioidomicosis sea mayor que en la población general, la enfermedad se ha asociado con el cáncer de pulmón (29), y con el linfoma Hodgkin y no Hodgkin (30).

De otra parte, la paracoccidioidomicosis abdominal con ictericia más otros síntomas inespecíficos, se puede confundir con el colangiocarcinoma. Por esto, ante la presencia de ictericia obstructiva y sospecha de colangiocarcinoma, en Brasil y otras áreas endémicas de América Latina, se debe considerar la paracoccidioidomicosis como un diagnóstico diferencial (21).

Conclusión

La paracoccidioidomicosis es una enfermedad fúngica endémica en Latinoamérica, cuyas formas de presentación clínica son diversas. Las formas agudas y diseminadas, como la expuesta en el presente caso, son un reto diagnóstico por su baja incidencia y su cuadro clínico, que incluye

múltiples diagnósticos diferenciales como neoplasias hematológicas malignas, por su compromiso linfático y diseminado. Por ende, siempre debe considerarse la forma subaguda o aguda de la paracoccidioidomicosis en pacientes provenientes de zonas endémicas, especialmente, si realizan labores agrícolas en áreas rurales y presentan síntomas asociados con el sistema linfático, el respiratorio o el tegumentario.

El tratamiento es la administración de itraconazol o cotrimoxazol en casos leves a moderados. Si la infección es grave, se considera la administración de deoxicolato de anfotericina B. El tratamiento es prolongado, ya que la erradicación del hongo es imposible de lograr y se requiere un seguimiento médico continuo del paciente.

Referencias

1. Hahn RC, Rodrigues AM, Della Terra PP, Nery AF, Hoffmann-Santos HD, Góis HM, *et al*. Clinical and epidemiological features of paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides lutzii*. PLoS Negl Trop Dis. 2019;13:e0007437. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007437
2. Turissini DA, Gómez OM, Teixeira MM, McEwen JG, Matute DR. Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. Fungal Genet Biol. 2017;106:9-25. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2017.05.007
3. Teixeira M de M, Cattana ME, Matute DR, Muñoz JF, Arechavala A, Isbell K, *et al*. Genomic diversity of the human pathogen *Paracoccidioides* across the South American continent. Fungal Genet Biol. 2020;140:103395. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2020.103395
4. Shikanai-Yasuda MA, Mendes RP, Colombo AL, Telles F de Q, Kono A, Paniago AMM, *et al*. II Consenso Brasileiro em Paracoccidioidomicose - 2017. Epidemiol Serv Saude. 2018;27. https://doi.org/10.5123/s1679-49742018000500001
5. Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho F de Q, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML. Guidelines in paracoccidioidomycosis. Rev Soc Bras Med Trop. 2006;39:297-310. https://doi.org/10.1590/s0037-86822006000300017
6. Hamdan JS, Rocha RL. Epidemiologia da paracoccidioidomicose. An Fac Med Univ Fed Minas Gerais. 1987;36:52-8.
7. Restrepo A, McEwen JG, Castañeda E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: How far from solving the riddle? Med Mycol. 2001;39:233-41. https://doi.org/10.1080/mmy.39.3.233.241
8. Alvarado P, Teixeira M de M, Cavallera E, Paes HC, Guerra G, Santander G, *et al*. Epidemiology of paracoccidioidomycosis in Venezuela: a retrospective study from 1954 to 2019. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2021;116:e210203. https://doi.org/10.1590/0074-02760210203
9. Martínez R. New trends in paracoccidioidomycosis epidemiology. J Fungi (Basel). 2017;1. https://doi.org/10.3390/jof3010001
10. Pinheiro BG, Hahn RC, Camargo ZP de, Rodrigues AM. Molecular tools for detection and identification of *Paracoccidioides* species: Current *status* and future perspectives. J Fungi (Basel). 2020;6:293. https://doi.org/10.3390/jof6040293
11. Torrado E, Castañeda E, De la Hoz F, Restrepo A. Paracoccidioidomicosis: definición de las áreas endémicas de Colombia. Biomédica. 2000;20:327. https://doi.org/10.7705/biomedica.v20i4.1076
12. Arias-Ramos D, Alzate JA, Giraldo-Montoya ÁM, Trujillo YA, Arias-Ramos LY. Thinking in paracoccidioidomycosis: A delayed diagnosis of a neglected tropical disease, case report and review of clinical reports and eco-epidemiologic data from Colombia since the 2000. BMC Infect Dis. 2020;20. https://doi.org/10.1186/s12879-020-4864-8
13. Calle D, Rosero DS, Orozco LC, Camargo D, Castañeda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis in Colombia: An ecological study. Epidemiol Infect. 2001;126:309-15. https://doi.org/10.1017/s0950268801005052
14. Ballesteros A, Beltrán S, Patiño J, Bernal C, Orduz R. Paracoccidioidomicosis juvenil diseminada diagnosticada en una niña en área urbana. Biomédica. 2013;34:21-8. https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i1.1637

15. Beltrán J, Arenas X, Torres L, Hurtado I, López-Medina E, Sierra A, *et al.* Paracoccidioidomicosis subaguda ganglionar presentación de un caso clínico en pediatría. Revista GatrohNup. 2016;17. https://doi.org/10.25100/gnup.v17i3s3.1380

16. de Castro LF, Ferreira MC, da Silva RM, Blotta MH de SL, Longhi LNA, Mamoni RL. Characterization of the immune response in human paracoccidioidomycosis. J Infect. 2013;67:470-85. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2013.07.019

17. Cezar-dos-Santos F, Assolini JP, Okuyama NCM, Viana KF, de Oliveira KB, Itano EN. Unraveling the susceptibility of paracoccidioidomycosis: Insights towards the pathogen-immune interplay and immunogenetics. Infect Genet Evol. 2020;86:104586. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104586

18. Wanke B, Aidê MA. Paracoccidioidomicose. J Bras Pneumol. 2009;35:1245-9. https://doi.org/10.1590/s1806-37132009001200013

19. Brazão-Silva MT, Andrade MF, Franco T, Ribeiro RIMA, Silva W dos S, Faria G, *et al.* Paracoccidioidomycosis: A series of 66 patients with oral lesions from an endemic area: Oral paracoccidioidomycosis. Mycoses. 2011;54:e189-95. https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2010.01873.x

20. Colli BO, Assirati Júnior JA, Machado HR, Figueiredo JF, Chimelli L, Salvarani CP, *et al.* Intramedullary spinal cord paracoccidioidomycosis. Report of two cases. Arq Neuropsiquiatr. 1996;54:466-73. https://doi.org/10.1590/s0004-282x1996000300017

21. Steinbrück K, Fernandes R. Biliary paracoccidioidomycosis: An unusual infection simulating malignant neoplasm. Ann Hepatol. 2019;18:258-62. https://doi.org/10.5604/01.3001.0012.7935

22. Quagliato Júnior R, Grangeia T de AG, Massucio RA de C, De Capitani EM, Rezende S de M, Balthazar AB. Association between paracoccidioidomycosis and tuberculosis: Reality and misdiagnosis. J Bras Pneumol. 2007;33:295-300. https://doi.org/10.1590/s1806-37132007000300011

23. Thompson GR 3rd, Le T, Chindamporn A, Kauffman CA, Alastruey-Izquierdo A, Ampel NM, *et al.* Global guideline for the diagnosis and management of the endemic mycoses: An initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the International Society for Human and Animal Mycology. Lancet Infect Dis. 2021;21:e364-74. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00191-2

24. Shikanai-Yasuda MA, Mendes RP, Colombo AL, Queiroz-Telles F de, Kono ASG, Paniago AMM, *et al.* Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. Rev Soc Bras Med Trop. 2017;50:715-40. https://doi.org/10.1590/0037-8682-0230-2017

25. Mendes RP, Cavalcante R de S, Marques SA, Marques MEA, Venturini J, Sylvestre TF, *et al.* Paracoccidioidomycosis: Current perspectives from Brazil. Open Microbiol J. 2017;11:224-82. https://doi.org/10.2174/1874285801711010224

26. Restrepo A, Tobón AM, Gonzales A. Paracoccidioidomycosis. En: Mandell, Douglas, Bennett, editores. Enfermedades infecciosas. Principios y práctica. Novena edición. Philadelphia: Editorial Elsevier-Health Sciences Division; 2020. p. 3211-21.

27. Shikanai-Yasuda MA. Paracoccidioidomycosis treatment. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2015;57:31-7. https://doi.org/10.1590/s0036-46652015000700007

28. 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;8:1177-91. https://doi.org/10.2217/fmb.13.68

29. Rodrigues G da S, Severo CB, Oliveira F de M, Moreira J da S, Prolla JC, Severo LC. Associação entre paracoccidioidomicose e câncer. J Bras Pneumol. 2010;36:356-62. https://doi.org/10.1590/s1806-37132010000300014

30. Ruiz e Resende LS, Yasuda AG, Mendes RP, Marques SA, Niéro-Melo L, Defaveri J, *et al.* Paracoccidioidomycosis in patients with lymphoma and review of published literature. Mycopathologia. 2015;179:285-91. https://doi.org/10.1007/s11046-014-9851-4