

Actividad *in vitro* de cuatro triazoles contra agentes causantes de cromoblastomycosis

Manzano-Gayosso P¹, Hernández-Hernández F¹, Méndez-Tovar LJ², Zabicky J¹, Bazán-Mora E¹, López-Martínez R¹

Resumen

ANTECEDENTES: la cromoblastomycosis es una infección subcutánea, de evolución crónica, causada principalmente por *Fonsecaea pedrosoi*. En general, la respuesta de los pacientes al tratamiento con antifúngicos ha sido escasa. La actividad antifúngica *in vitro* contra los hongos causantes de esta micosis reportada en la bibliografía ha sido variable.

OBJETIVO: evaluar la sensibilidad antifúngica *in vitro* de diferentes hongos dematiáceos de una colección a fluconazol, itraconazol, voriconazol y posaconazol.

MATERIAL Y MÉTODO: estudio observacional y experimental realizado en 14 aislamientos de hongos causantes de cromoblastomycosis conservados en la colección del Laboratorio de Micología Médica. La sensibilidad antifúngica *in vitro* se determinó por el método E-test. Se evaluaron cuatro triazoles de primera generación (fluconazol e itraconazol) y segunda generación (voriconazol y posaconazol) y se comparó su actividad antifúngica contra las diferentes especies fúngicas.

RESULTADOS: la concentración mínima inhibitoria para itraconazol varió de 0.017 a 1.0 µg/mL; de 0.52 a 6.0 µg/mL para voriconazol; de 0.009 a 0.25 µg/mL para posaconazol y ≥ 256 µg/mL para fluconazol. Por tanto, la mayor actividad observada fue con posaconazol e itraconazol, principalmente contra los aislamientos de *Phialophora verrucosa*, seguidos de *Cladophialophora carrionii*.

CONCLUSIÓN: en este estudio se observó la efectividad del itraconazol y posaconazol contra agentes de cromoblastomycosis. El método E-test es una herramienta que podría ser útil para determinar el patrón de sensibilidad antifúngica *in vitro* en hongos causantes de cromoblastomycosis y así contribuir a establecer el tratamiento oportuno y disminuir la baja respuesta o recaídas de los pacientes con esta micosis.

PALABRAS CLAVE: *Fonsecaea pedrosoi*, *Phialophora verrucosa*, itraconazol, posaconazol.

¹ Unidad de Micología, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.

² Unidad de Investigación en Dermatología y Micología, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México.

Recibido: junio 2016

Aceptado: agosto 2016

Correspondencia

Dra. Patricia Manzano Gayosso
angelesmg@liceaga.facmed.unam.mx

Este artículo debe citarse como

Manzano-Gayosso P, Hernández-Hernández F, Méndez-Tovar LJ, Zabicky J y col. Actividad *in vitro* de cuatro triazoles contra agentes causantes de cromoblastomycosis. Dermatol Rev Mex. 2016 nov;60(6):481-487.

Dermatol Rev Mex 2016 November;60(6):481-487.

In vitro activity of four triazole against agents causing of chromoblastomycosis.

Manzano-Gayosso P¹, Hernández-Hernández F¹, Méndez-Tovar LJ², Zabicky J¹, Bazán-Mora E¹, López-Martínez R¹

Abstract

BACKGROUND: Chromoblastomycosis is a subcutaneous infection, with chronic evolution mainly caused by *Fonsecaea pedrosoi*. In general patients' response to treatment with antifungal drugs has been poor. The in vitro antifungal activity on fungi causing of this mycosis reported in literature has been variable.

OBJECTIVE: To evaluate the in vitro antifungal susceptibility of different dematiaceous fungi from a collection, to fluconazole, itraconazole, voriconazole and posaconazole.

MATERIAL AND METHOD: An observational and experimental study performed on fourteen fungal isolates causing of chromoblastomycosis conserved in the Medical Mycology Laboratory' Collection. The in vitro antifungal susceptibility was determined by the E-test method. Four triazole compounds of first- (fluconazole and itraconazole) and second-generation (voriconazole and posaconazole) were evaluated, and their antifungal activity against the fungal species was compared.

RESULTS: The minimum inhibitory concentration for itraconazole was from 0.017 to 1.0 µg/mL; from 0.52 to 6.0 µg/mL for voriconazole; from 0.009 to 0.25 µg/mL for posaconazole; and ≥ 256 µg/mL for fluconazole. Therefore, the highest antifungal activity was observed with posaconazole and itraconazole, mainly against isolates of *Phialophora verrucosa*, followed by *Cladophialophora carrionii*.

CONCLUSION: In this study the effectiveness of itraconazole and posaconazole against chromoblastomycosis agents was observed. The E-test method could be a useful tool to determine the in vitro antifungal susceptibility pattern on fungi causing of chromoblastomycosis and contribute to establish a timely treatment and reduce the low response and relapses of patients with this mycosis.

KEYWORDS: *Fonsecaea pedrosoi*; *Phialophora verrucosa*; itraconazole; posaconazole

¹ Unidad de Micología, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.

² Unidad de Investigación en Dermatología y Micología, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México.

Correspondence

Dra. Patricia Manzano Gayosso
angelesmg@liceaga.facmed.unam.mx

ANTECEDENTES

La cromoblastomycosis es una infección micótica de localización subcutánea y de evolución

crónica. La mayoría de los casos reportados en la bibliografía padecen lesiones cutáneas extensas, caracterizadas por placas de aspecto verrugoso, asintomáticas. Los principales hongos causales

son *Fonsecaea pedrosoi*, *Phialophora verrucosa* y *Cladophialophora carrionii*.¹

Los primeros casos reportados de la enfermedad se trataron con una amplia diversidad de medicamentos (calciferol, tiabendazol, 5-flucitosina, anfotericina B), con respuesta generalmente escasa.¹

Con la disponibilidad en el mercado de los antifúngicos azólicos, particularmente de ketoconazol, fluconazol e itraconazol, éstos se han prescrito para el tratamiento de esta micosis, con respuesta variable.²

En 1992, Queiroz-Telles y colaboradores reportaron la administración de itraconazol en 19 casos de cromoblastomycosis causados por *F. pedrosoi* y comprobaron su utilidad en este padecimiento.³

En los últimos 15 años, el antifúngico más comúnmente indicado ha sido itraconazol por tiempo prolongado (200 mg/día durante cinco meses).^{4,5} Algunos autores han reportado recaídas posteriores a la aparente curación clínica y micológica.⁶ Debido a que muchos de los casos han sido resistentes al tratamiento, algunos médicos clínicos han prescrito la combinación de dos fármacos o dos tipos de procedimientos (termoterapia o criocirugía más la administración de un antifúngico), con mejores resultados.^{1,7-9}

Los estudios de la actividad antifúngica *in vitro* iniciaron en 1987, cuando Van Cutsem y colaboradores ensayaron el itraconazol contra diversos hongos, incluidos algunos agentes de la cromoblastomycosis.¹⁰ En este estudio, itraconazol tuvo cuatro veces más actividad que ketoconazol contra algunos hongos. En otro estudio, itraconazol mostró mayor actividad que fluconazol contra diversos hongos dematiáceos.¹¹ De Bedout y colaboradores encontraron que los aislamientos de *F. pedrosoi* mostraban resistencia a anfotericina

B (33%), a 5-flucitosina (58%) y a fluconazol (67%) y ninguno a itraconazol.¹² Hace poco, Deng y colaboradores demostraron actividad baja de posaconazol, seguido de itraconazol y de terbinafina contra aislamientos de *C. carrionii*.¹³

En la actualidad esta infección sigue siendo un desafío para el médico tratante debido a la mala respuesta de los pacientes con esta enfermedad a los diversos recursos terapéuticos utilizados. Una de las posibles causas de falla terapéutica en esta micosis podría ser la resistencia del agente causal (primaria o secundaria) a los diversos antifúngicos.

El objetivo de este estudio es determinar el patrón de sensibilidad *in vitro* de diferentes agentes causantes de cromoblastomycosis frente a cuatro compuestos triazólicos (fluconazol, itraconazol, voriconazol y posaconazol), disponibles en el tratamiento de esta micosis.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio observacional y transversal en hongos dematiáceos de la colección del Laboratorio de Micología Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Aislamientos fúngicos

En este estudio se incluyeron 14 aislamientos de la colección obtenidos de pacientes y conservados en solución salina estéril a 4°C. Los aislamientos correspondieron a las siguientes especies: *Fonsecaea pedrosoi*, 7; *Phialophora verrucosa*, 2; *Cladophialophora carrionii*, 4; *Rhinochlamydia aquaspersa*, 1.

Preparación del inóculo

De todos los aislamientos se obtuvo un cultivo monospórico en agar dextrosa Sabouraud, de siete días de crecimiento a 28°C. Estos aisla-

mientos se cultivaron en agar avena-sales para estimular la conidiación y se incubaron a 35°C durante siete días;¹⁴ a partir de este cultivo se preparó un inóculo que contenía 1×10^5 conidios/mL en solución salina a 0.85%. Por cada aislamiento se inocularon cuatro placas de agar Rowell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, siguiendo las instrucciones del fabricante de E-test® (AB Biodisk). En cada una de las placas de RPMI 1640 inoculadas con el aislamiento problema se colocaron las tiras E-test® impregnadas con dosis decrecientes de fluconazol, itraconazol, voriconazol y posaconazol. Las placas se incubaron a 35°C durante siete días, con revisión cada 24 horas. La concentración mínima inhibitoria se determinó de acuerdo con el punto de intersección entre el crecimiento fúngico y la línea que indica la concentración del antifúngico.

El análisis de variancia se utilizó para conocer la diferencia en la actividad de los antifúngicos estudiados. El valor de $p < 0.05$ se consideró significativo. El análisis estadístico y la gráfica se realizaron con el paquete estadístico Prism 7.0 (GraphPad Inc., CA, Estados Unidos).

RESULTADOS

Las concentraciones mínimas inhibitorias obtenidas con los cuatro compuestos triazólicos probados contra los 14 aislamientos dematiáceos causantes de cromoblastomycosis se muestran en el Cuadro 1. En términos generales, todos los aislamientos tuvieron un comportamiento similar frente a cada antifúngico. El fluconazol no tuvo ninguna actividad contra los 14 aislamientos estudiados. Los límites de la concentración mínima inhibitoria frente a itraconazol fueron 0.023 a 1.75 µg/mL; para voriconazol fueron 0.008 a ≥ 32.0 µg/mL; para posaconazol fueron 0.006 a 0.25 µg/mL. Respecto a las diferentes especies, en dos aislamientos de *F. pedrosoi* estudiados se observó que la concentración

mínima inhibitoria a voriconazol e itraconazol fue alta (32 y 1.75 µg/mL, respectivamente) y en baja concentración a itraconazol (6/7) y en 7/7 frente a posaconazol. *Cladophialophora carrionii* y *P. verrucosa* fueron sensibles a itraconazol, voriconazol y posaconazol. El aislamiento de *R. aquaspersa* mostró resistencia a itraconazol y voriconazol. Por tanto, posaconazol mostró la mayor actividad antifúngica contra todos los aislamientos fúngicos.

El crecimiento de un aislamiento de *F. pedrosoi* y de *C. carrionii* en sendas placas de agar RPMI 1640 frente a los cuatro triazoles estudiados se muestra en la Figura 1, en la que se evidencia un halo de inhibición correspondiente a la concentración mínima inhibitoria del antifúngico; en el primer caso la mayor actividad corresponde a voriconazol (0.008 µg/mL) y en el segundo a posaconazol (0.006 µg/mL).

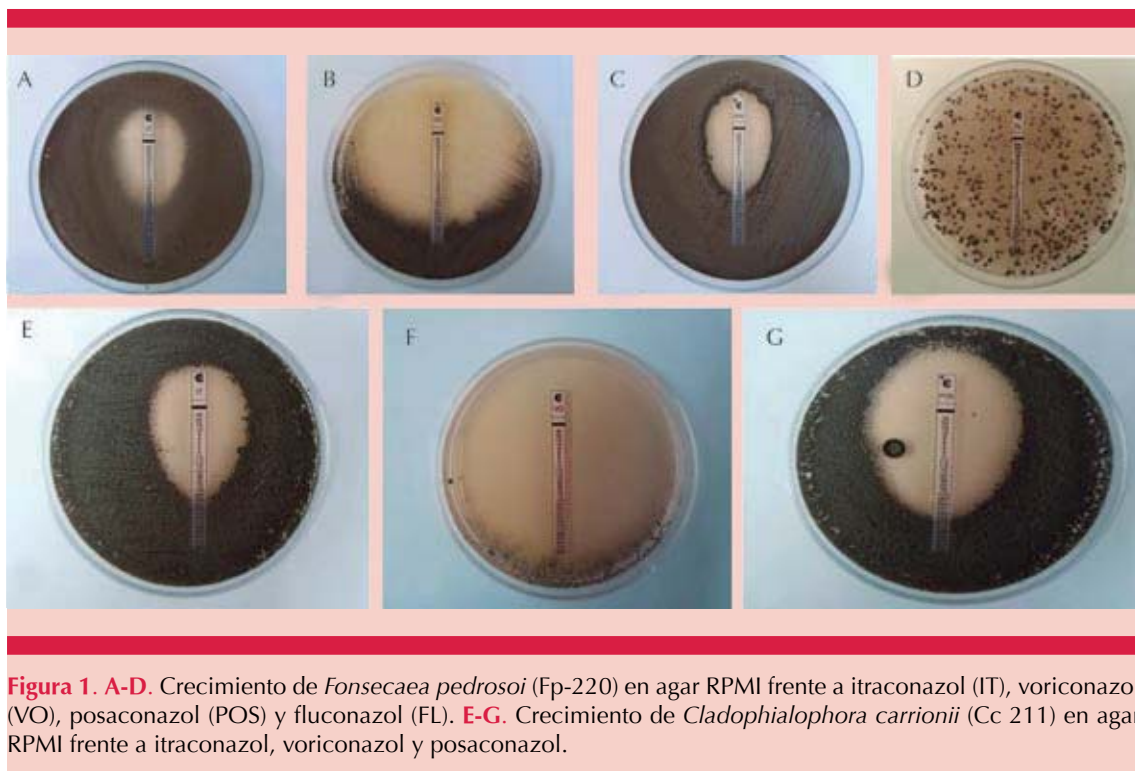
El promedio de la concentración mínima inhibitoria obtenida para los cuatro antifúngicos ensayados en este estudio se muestra en la Figura 2. La mejor actividad antifúngica *in vitro* contra los agentes causantes de cromoblastomycosis la tuvieron itraconazol y posaconazol. Este último mostró los valores más bajos con significación estadística, determinada por análisis de variancia ($p < 0.05$).

DISCUSIÓN

En general, la actividad *in vitro* que muestran los antifúngicos contra los agentes de la cromoblastomycosis ha sido variable y dependiente del método y de los antifúngicos estudiados. Cermeño y colaboradores demostraron la mayor actividad de ketoconazol, itraconazol y terbinafina contra dos aislamientos de *F. pedrosoi* y ninguna actividad con fluconazol y anfotericina B. Estos autores sugieren que ketoconazol e itraconazol serían los fármacos de elección para controlar las infecciones causadas por los

Cuadro 1. Concentración mínima inhibitoria de cuatro azoles contra 14 aislamientos causantes de cromoblastomycosis

Especie	Clave	Fluconazol (µg/mL)	Itraconazol (µg/mL)	Voriconazol (µg/mL)	Posaconazol (µg/mL)
<i>F. pedrosoi</i>	Fp-12	≥256	0.125	0.012	0.047
<i>F. pedrosoi</i>	Fp-85	≥256	0.094	0.016	0.008
<i>F. pedrosoi</i>	Fp-220	≥256	0.25	0.008	0.125
<i>F. pedrosoi</i>	Fp-362	≥256	0.25	0.047	0.032
<i>F. pedrosoi</i>	Fp-363	≥256	0.25	0.047	0.032
<i>F. pedrosoi</i>	Fp-489	≥256	0.064	≥32	0.016
<i>F. pedrosoi</i>	Fp-84	≥256	1.75	4.0	0.25
<i>P. verrucosa</i>	Pv-35	≥256	0.032	0.047	0.012
<i>P. verrucosa</i>	Pv-110	≥256	0.19	1.0	0.006
<i>C. carrionii</i>	Cc-210	≥256	0.023	0.5	0.006
<i>C. carrionii</i>	Cc-211	≥256	0.023	0.5	0.006
<i>C. carrionii</i>	Cc-238	≥256	0.64	1.5	0.064
<i>C. carrionii</i>	Cc-239	≥256	0.64	1.5	0.023
<i>R. aquaspersa</i>	Ra-634	≥256	1.0	4.0	0.032

**Figura 1.** A-D. Crecimiento de *Fonsecaea pedrosoi* (Fp-220) en agar RPMI frente a itraconazol (IT), voriconazol (VO), posaconazol (POS) y fluconazol (FL). E-G. Crecimiento de *Cladophialophora carrionii* (Cc 211) en agar RPMI frente a itraconazol, voriconazol y posaconazol.

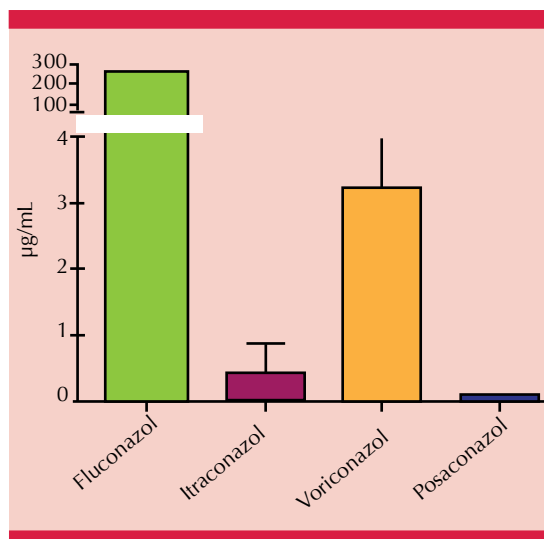


Figura 2. Concentración mínima inhibitoria de la actividad de los cuatro triazoles contra todos los aislamientos estudiados.

hongos dematiáceos.¹⁵ Estos datos son similares a los descritos por otros autores.^{2,16-18}

Los resultados obtenidos con los tratamientos indicados en la cromoblastomycosis han sido variables, independientemente si se administran fármacos solos o combinados con procedimientos físicos.⁷⁻⁹ Queiroz-Telles y colaboradores reportaron que el fármaco que debe indicarse en pacientes con cromoblastomycosis causado por *F. pedrosoi* es itraconazol, porque observaron curación clínica y micológica en un periodo de 18 a 36 meses. Para otros autores el tratamiento con un solo medicamento puede ser ineficaz, porque podría causar la recaída del paciente e incluso resistencia del agente causal al antifúngico.¹ Por esto, algunos autores combinan antimicóticos al iniciar el tratamiento para evitar las recaídas y la resistencia del agente, basados en el mecanismo de acción en dos puntos diferentes, como itraconazol y terbinafina. La terbinafina ha mostrado beneficio adicional, que es su efecto antifibrótico, lo que induce la penetración del antifúngico a la célula.¹⁷ Otra

alternativa terapéutica propuesta por Kumarsinghe es itraconazol administrado en pulsos, esquema al que responden mejor los pacientes infectados con *C. carrionii*.¹⁹

CONCLUSIONES

En este estudio fue evidente la mayor actividad mostrada con itraconazol y posaconazol, principalmente contra *P. verrucosa* y *C. carrionii*, por lo que está fundamentado proponer la administración de posaconazol como tratamiento inicial en los pacientes con cromoblastomycosis.

El método de E-test® puede ser una herramienta útil en los laboratorios clínicos para detectar la concentración mínima inhibitoria de los antifúngicos contra los agentes causales de cromoblastomycosis. Al conocer el patrón de sensibilidad podría iniciarse un tratamiento oportuno y disminuir las recaídas que pudieran tener los pacientes con este padecimiento.

Proyecto registrado en la División de Investigación, clave 074-2011.

REFERENCIAS

1. Queiroz-Telles F, Esterre P, Pérez-Blanco M, Vitale R, et al. Chromoblastomycosis: an overview of clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Med Mycol* 2009;47:3-15.
2. Andrade TS, Castro LG, Nunes RS, Gimenes VM, Cury AE. Susceptibility of sequential *Fonsecaea pedrosoi* isolates from chromoblastomycosis patients to antifungal agents. *Mycoses* 2004;47:216-221.
3. Queiroz-Telles F, Purim KS, Fillus JN, Bordignon GF, et al. Itraconazole in the treatment of chromoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi*. *Int J Dermatol* 1992;31:805-812.
4. Esterre P, Queiroz-Telles F. Management of chromoblastomycosis: novel perspectives. *Curr Opin Infect Dis* 2006;19:148-152.
5. Daboit TC, Magagnin CM, Heidrich D, Castrillón MR, et al. A case of relapsed chromoblastomycosis due to *Fonsecaea monophora*: antifungal susceptibility and phylogenetic analysis. *Mycopathologia* 2013;176:139-144.
6. Najafzadeh MJ, Rezusta A, Cameo MI, Zubiri ML, et al. Successful treatment of chromoblastomycosis of 36 years

- duration caused by *Fonsecaea monophora*. Med Mycol 2010;48:390-393.
7. Bonifaz A, Marínez-Soto E, Carrasco-Gerard E, Peniche J. Treatment of chromoblastomycosis with itraconazole, cryosurgery, and a combination of both. Int J Dermatol 1997;36:542-547.
 8. Bassas-Vila J, Fuente MJ, Guinovart R, Ferrándiz C. Chromoblastomycosis: response to combination therapy with cryotherapy and terbinafine. Actas Dermosifiliogr 2014;105:196-198.
 9. Tanuma H, Hiramatsu M, Mukai H, Abe M, et al. A case of chromoblastomycosis effectively treated with terbinafine. Characteristics of chromoblastomycosis in the Kitasato region, Japan. Mycoses 2000;43:79-83.
 10. Van Cutsem J, Van Gerven F, Janssen PA. Activity of orally, topically, and parenterally administered itraconazole in treatment of superficial and deep mycoses: animal models. Rev Infect Dis 1987;9(Suppl 1):S15-S32.
 11. Caligiorne RB, Resende MA, Melillo PH, Peluso CP, et al. *In vitro* susceptibility of chromoblastomycosis and phaeo-hyphomycosis agents and antifungal drugs. Med Mycol 1999;37:405-409.
 12. De Bedout C, Gómez BL, Restrepo A. *In vitro* susceptibility testing of *Fonsecaea pedrosoi* to antifungals. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1997;39:145-148.
 13. Deng S, de Hoog GS, Badali H, Yang L, et al. *In vitro* antifungal susceptibility of *Cladophialophora carrionii*, an agent of human chromoblastomycosis. Antimicrob Agents Chemother 2013;57:1974-1977.
 14. Weitzman I, Silva-Hunter M. Non-keratinous agar media as substrates for the ascigerous state in certain members of the Gymnoascaceae pathogenic for man and animal. Sabouraudia 1967;5:335-340.
 15. Cermeño J, González C. Casuística de cromoblastomycosis en el estado de Bolívar (1987-2010) y evaluación de la sensibilidad *in vitro* de dos aislados de *Fonsecaea pedrosoi*. Rev Soc Ven Microbiol 2011;31:149-155.
 16. Cermeño Vivas, Torres-Rodríguez JM. Sensibilidad *in vitro* de hongos dematiáceos a los antifúngicos utilizando E-test*. Rev Esp Quimioter 2001;14:191-197.
 17. Zhang J, Xi L, Lu C, Li X, et al. Successful treatment for chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea monophora*: a report of three cases in Guangdong, China. Mycoses 2009;52:176-181.
 18. Najafzadeh MJ, Badali H, Illnait-Zaragozi MT, De Hoog GS, Meis JF. *In vitro* activities of eight antifungal drugs against 55 clinical isolates of *Fonsecaea* spp. Antimicrob Agents Chemother 2010;54:1636-1638.
 19. Kumarasinghe MP. Itraconazole pulse therapy in chromoblastomycosis. Eur J Dermatol 2000;10:220-222.

Actividades en provincia de la Sociedad Mexicana de Dermatología, 2017

13 de enero

Guadalajara, Jalisco

Sesión conjunta con el Colegio de Dermatólogos de Jalisco

25 de enero

San Miguel de Allende, Guanajuato

Sesión conjunta con el Colegio de Dermatólogos del Estado de Guanajuato

18 de marzo

Yucatán

Sesión conjunta con el Colegio de Dermatólogos de Yucatán

6 de junio

Monterrey, Nuevo León

Sesión conjunta con la Sociedad de Dermatología de Nuevo León