

ARTÍCULO ORIGINAL

Sensibilidad *in vitro* de cepas cubanas de *Aspergillus* spp. de origen clínico y ambiental

Javier L. San Juan¹, Carlos M. Fernández¹, Michel Almaguer², Mayda R. Perurena¹, Gerardo F. Martínez¹, Rosario E. Velar¹, María T. Illnait¹

¹ Laboratorio Nacional de Referencia de Micología, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri", La Habana, Cuba

² Facultad de Biología, Universidad de La Habana, La Habana, Cuba

Introducción. En Cuba se desconoce el comportamiento de la sensibilidad de *Aspergillus* spp. a los antifúngicos recomendados para el tratamiento de la aspergilosis: la anfotericina B, el itraconazol, el voriconazol y las equinocandinas. La influencia del ambiente puede condicionar la aparición de resistencia en estos microorganismos.

Objetivo. Evaluar la sensibilidad *in vitro* de cepas de *Aspergillus* spp. a la anfotericina B, el itraconazol y el voriconazol, y la relación de los patrones de sensibilidad con su origen.

Materiales y métodos. Se determinaron las concentraciones inhibitorias mínimas de la anfotericina B, el itraconazol y el voriconazol para 60 cepas de *Aspergillus* spp. de origen clínico y ambiental mediante el método M38-A2 del *Clinical and Laboratory Standard Institute*.

Resultados. Se encontraron 21 cepas resistentes a la anfotericina B (principalmente en muestras clínicas y ambientes hospitalarios) y tres cepas resistentes al itraconazol (en ambientes interiores y exteriores no hospitalarios). No se hallaron cepas resistentes al voriconazol. No se encontró relación entre el origen de las cepas y su sensibilidad.

Conclusiones. Se sugiere la posible existencia de factores ambientales o interacciones con genotipos resistentes que pueden dar origen a fenotipos resistentes en Cuba. Este es el primer reporte del país de cepas de *Aspergillus* spp. resistentes *in vitro*. Los resultados ameritan ampliar el estudio para incluir análisis moleculares y filogenéticos.

Palabras clave: *Aspergillus*; farmacorresistencia fúngica; anfotericina B; itraconazol; voriconazol.

doi: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3447>

***In vitro* susceptibility of Cuban *Aspergillus* spp. strains of clinical and environmental origin**

Introduction: The behavior of antifungal susceptibility of *Aspergillus* spp. in Cuba remains unknown. The antifungals recommended to treat aspergillosis are amphotericin B, itraconazole, voriconazole and echinocandins. The influence of the environment may set off the emergence of drug-resistance in these microorganisms.

Objective: To evaluate *in vitro* susceptibility of *Aspergillus* spp. strains to amphotericin B, itraconazole and voriconazole, and the relationship between susceptibility patterns and their origin.

Materials and methods: Minimum inhibitory concentrations of amphotericin B, itraconazole and voriconazole were determined for 60 *Aspergillus* spp. strains of clinical and environmental origin using the M38-A2 method of the Clinical and Laboratory Standards Institute.

Results: We found 21 amphotericin B resistant strains (mainly from clinical samples and hospital environments), as well as three itraconazole resistant strains (from non-hospital outdoor and indoor environments). No voriconazole resistance was found. No relationship was found between strain origin and susceptibility.

Conclusions: Results suggest the possible existence of environmental factors or interactions with resistant genotypes which may give rise to resistant phenotypes in our country. This is the first report of *in vitro* *Aspergillus* spp. resistant strains in Cuba. These studies should be broadened and include molecular and phylogenetic analyses.

Key words: *Aspergillus*; drug resistance, fungal; amphotericin B; itraconazole; voriconazole.

doi: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3447>

Contribución de los autores:

Javier L. San Juan y Carlos M. Fernández: desarrollo experimental de la investigación, análisis e interpretación de los datos y redacción del manuscrito

Michel Almaguer: desarrollo experimental de la investigación y proveedor de las cepas evaluadas

Mayda R. Perurena y Gerardo F. Martínez: interpretación de los datos y asesoría en la redacción del manuscrito

Rosario E. Velar: desarrollo experimental de la investigación

María T. Illnait: asesoría en el diseño experimental y en la redacción del manuscrito

El género *Aspergillus* es probablemente el taxón fúngico de mayor distribución en el mundo por la fácil diseminación de sus esporas y por la amplia gama de sustratos que puede degradar (1).

La interacción con estos microorganismos puede representar un riesgo para la salud humana por la potencial patogenicidad y la toxicidad que presentan algunas especies. Las infecciones causadas por *Aspergillus* spp. se manifiestan de muchas maneras, desde formas no invasivas, como la otomicosis, las queratitis fúngicas, la aspergilosis broncopulmonar alérgica y los aspergilomas, hasta infecciones invasivas con posible diseminación a diferentes sistemas de órganos (2).

Entre los principales antifúngicos que se utilizan para el tratamiento contra la infección por *Aspergillus* spp., están los triazoles (fundamentalmente, el itraconazol y el voriconazol), la anfotericina B y las equinocandinas (3). En las últimas décadas, se ha observado un incremento en la aparición de cepas resistentes a los antifúngicos, fundamentalmente de *A. fumigatus* (4). Sobre *Aspergillus* spp. se han realizado múltiples investigaciones para determinar la sensibilidad *in vitro* de sus especies y los factores ambientales que influyen sobre este patrón (5,6). En Cuba no existe información sobre el tema en el ámbito clínico ni en estudios de microbiota ambiental.

Esta es la primera investigación cubana que pretende evaluar la reacción frente a tres de los principales antifúngicos empleados para tratar la aspergilosis en grupos de especies de *Aspergillus* con origen clínico y ambiental.

Materiales y métodos

Cepas

Se evaluaron 60 cepas pertenecientes al género *Aspergillus* organizadas en tres grupos, según su origen: grupo 1 (G1), formado por 20 cepas aisladas de ambientes exteriores e interiores no hospitalarios, proporcionadas por la Colección de Cultivos Microbianos de la Facultad de Biología (CCMFB) del Departamento de Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana; grupo 2 (G2), formado por 20 cepas aisladas de ambientes

hospitalarios del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK) y del Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigaciones Médico-Quirúrgicas (CIMEQ), y grupo 3 (G3), constituido por 20 cepas aisladas de muestras clínicas provistas por el Laboratorio de Microbiología del Hospital Militar "Luis Díaz Soto", el Laboratorio de Microbiología del CIMEQ y la Colección de Hongos Patógenos del IPK.

Todas las cepas estaban clasificadas según los criterios de identificación de Barnet, *et al.* (7), Klich, *et al.* (8), y de Hoog, *et al.* (9). La distribución según especie fue la siguiente: 19 de *A. fumigatus*, 20 de *A. flavus*, 20 de *A. niger* y una de *A. terreus*. A todas las cepas se les asignó un código específico, diferente a su original, en aras de homogenizar la nomenclatura.

Cepas de control

Como cepas de control se utilizaron *Candida krusei* ATCC® 6258 y *C. parapsilosis* ATCC® 22019. Los valores de sensibilidad se determinaron dentro de los límites establecidos por el método M38-A2 del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (10).

Sensibilidad a los antifúngicos

La determinación de la sensibilidad a la anfotericina B y al itraconazol se hizo con el método de microdilución M38-A2 del CLSI (10). Las soluciones "madre" de cada antifúngico se prepararon con dimetilsulfóxido (DMSO). Las diluciones finales (1:50) se hicieron en el medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich; USA) usando ácido 3- [N-morfolino] propanosulfónico (MOPS) (Sigma-Aldrich; USA) como solución tampón; el pH se ajustó a un valor de 7,0 ± 0,1. Posteriormente, se distribuyeron 100 µl de las soluciones de los antifúngicos en placas de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano (Cellstar®). Los inóculos se ajustaron a una concentración de 0,4-5 x 10⁴ conidios por ml mediante conteo en cámara de Neubauer, y se dispensaron 100 µl en los pocillos con los antifúngicos. En cada placa se tuvieron en cuenta un control negativo (medio de cultivo sin antifúngico ni inóculo) y un control de crecimiento (medio con disolvente e inóculo).

Las placas se incubaron a 35 °C durante 48 horas. Los valores de concentración inhibitoria mínima (CIM) para la anfotericina B y para el itraconazol, se establecieron como el menor valor de concentración en el que se observó el 100 % de inhibición del crecimiento y no se observó efecto de arrastre (10). Se determinó la CIM del voriconazol frente a

Correspondencia:

Carlos M. Fernández, Laboratorio Nacional de Referencia de Micología, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", km 6 ½, Autopista "Novia del Mediodía", La Lisa, La Habana, Cuba
Teléfono: (537) 255 3524
cfandreu@ipk.sld.cu

Recibido: 10/08/16; aceptado: 05/12/16

las cepas que mostraron resistencia a la anfotericina B o al itraconazol y, para ello, se emplearon tiras de Etest® (bioMérieux; Francia) según la metodología descrita por el fabricante. La preparación y la estandarización del inóculo fueron las mismas que las utilizadas en el procedimiento de microdilución. Se empleó el medio RPMI-1640 con agar como medio de cultivo. Las placas se incubaron durante 48 horas a 37 °C (11).

La lectura de los datos se hizo siguiendo las indicaciones del fabricante. Los valores de sensibilidad del Etest® diferentes de los intervalos establecidos en el método de referencia, se aproximaron a la concentración inmediatamente superior empleada por el método del CLSI para facilitar su correcta interpretación categórica. Todos los antifúngicos empleados fueron suministrados por la casa comercial Sigma-Aldrich.

Interpretación de los datos y análisis estadístico

Para los tres antifúngicos, se consideraron sensibles las cepas con valores de CIM de 1 µg/ml o menores, con sensibilidad intermedia, aquellas con una CIM de 2 µg/ml, y como resistentes, aquellas con una CIM de 4 µg/ml o menos (10).

Los datos de concentración de la anfotericina B y el itraconazol se transformaron a escala para su análisis estadístico (transformación logarítmica). Se calcularon las medias geométricas de los tres antifúngicos para cada grupo según su origen, y para las especies *A. fumigatus*, *A. flavus* y *A. niger* frente a la anfotericina B y el itraconazol.

Se hizo un análisis de varianza (ANOVA) para comparar las medias de CIM de los dos antifúngicos en todas las especies evaluadas, y las medias de los valores de CIM de los grupos según el origen. También, se determinó la relación entre el grado de sensibilidad a los dos antifúngicos y el origen de las cepas mediante un test de χ^2 de Fischer. El voriconazol se excluyó de los ANOVA dado que para este se utiliza un método de evaluación diferente al del CLSI. En todos los análisis se empleó un alfa de 0,05. Los datos se analizaron con el programa estadístico GraphPad Prism, versión 6.01.

Resultados

En el cuadro 1 se presentan todas las cepas evaluadas mediante el ensayo de microdilución frente a la anfotericina B y el itraconazol. Se evaluó una cepa de *A. terreus*, pero esta no se tuvo en cuenta en los análisis de varianza por no ser estadísticamente representativa.

La media geométrica de la CIM de la anfotericina B, en el G1, fue de 2,14 µg/ml, en el G2, de 1,80 µg/ml, y en el G3, de 1,19 µg/ml. La media geométrica de la CIM del itraconazol, en el G1, fue de 0,73 µg/ml, en el G2, de 0,52 µg/ml, y en el G3, de 0,13 µg/ml. Para *A. fumigatus*, la media geométrica de la CIM fue de 0,90 para la anfotericina B y de 0,26 para el itraconazol; para *A. flavus*, fue de 2,73 para la anfotericina B y de 0,22 para el itraconazol; y para *A. niger*, fue de 1,62 para la anfotericina B y de 0,84 para el itraconazol.

Se detectaron 21 cepas resistentes a la anfotericina B y tres cepas resistentes al itraconazol. En el G1, 7 (11,67 % del total) cepas mostraron valores de CIM para la anfotericina B correspondientes al criterio de resistencia; en el G2, se detectaron 8 (13,33 % del total) cepas y, en el G3, 6 (10 % del total). Solo se observaron tres (5 % del total) cepas resistentes al itraconazol en el G1. La especie con mayor número de cepas resistentes a la anfotericina B fue *A. flavus* (21,67 %), seguida por *A. niger* (6,67 %) y *A. fumigatus* (5 %). *Aspergillus niger* resultó ser la única especie (5 %) resistente al itraconazol.

En la figura 1 se presenta la distribución de las cepas según especie y patrón de sensibilidad. El ANOVA mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) en las medias de las muestras entre especies para los antifúngicos evaluados mediante microdilución (anfotericina B: $p = 0,0069$; itraconazol: $p = 0,0016$). El ANOVA no arrojó diferencias significativas ($p < 0,05$) en las medias de las muestras entre los grupos frente a la anfotericina B ($p = 0,26$), pero fue estadísticamente significativo frente al itraconazol ($p = 0,0001$).

En la figura 2 se presenta la distribución de las cepas según el patrón de sensibilidad y los grupos definidos según su origen. Mediante el test de χ^2 de Fischer, se estableció la independencia entre las variables del grado de sensibilidad a la anfotericina B y el origen de las cepas. No se pudo hacer el test de χ^2 para el itraconazol debido al tamaño de la muestra y a la ausencia de cepas en las categorías de la variable de grado de sensibilidad.

Los valores de la CIM del voriconazol se presentan en el cuadro 2. La media geométrica de la CIM para este antifúngico fue de 0,54 µg/ml en el G1, de 0,55 µg/ml en el G2, y de 0,14 µg/ml en el G3. La cepa de *A. terreus* no se incluyó en el cálculo de esta media geométrica en el G3. No se hallaron cepas resistentes a este antifúngico.

Cuadro 1. Valores de concentración mínima inhibitoria (CIM) de la anfotericina B (AMB) y del itraconazol (ITZ) para las cepas evaluadas por el método de microdilución. Los grupos corresponden al origen de la cepa. G1: ambientes interiores y exteriores no hospitalarios; G2: ambiente hospitalario; G3: muestras clínicas.

Grupos	<i>Aspergillus fumigatus</i> (código de la cepa)	AMB ^{CIM} (µg/ml)	ITZ ^{CIM} (µg/ml)	<i>Aspergillus flavus</i> (código de la cepa)	AMB ^{CIM} (µg/ml)	ITZ ^{CIM} (µg/ml)	<i>Aspergillus niger</i> (código de la cepa)	AMB ^{CIM} (µg/ml)	ITZ ^{CIM} (µg/ml)	<i>Aspergillus terreus</i> (código de la cepa)	AMB ^{CIM} (µg/ml)	ITZ ^{CIM} (µg/ml)	
G1	JF01	1,0	0,5	JF00	4,0	0,5	JF05	1,0	0,25				
	JF02	0,5	0,5	JF04	8,0	0,5	JF07	2,0	2,0				
	JF03	0,5	0,125	JF06	>16,0	0,5	JF08	1,0	0,25				
	JF10	4,0	1,0	JF11	8,0	0,25	JF15	2,0	>16,0				
	JF12	2,0	0,5	JF14	4,0	0,5	JF16	2,0	>16,0				
	JF13	0,5	0,0625	JF18	8,0	1,0	JF17	2,0	>16,0				
	JF19	1,0	0,5										
	JF23	2,0	0,5										
	G2	JJ1	4,0	1,0	JJ11	8,0	0,25	JAI	0,5	1,0			
		JJ10	2,0	0,25	JJ2	0,25	2,0	JAI1	2,0	0,5			
JJ4		1,0	0,125	JJ3	0,25	1,0	JAI11	1,0	1,0				
				JJ8	4,0	0,25	JAIV	1,0	2,0				
				JM10	8,0	0,25	JM01	1,0	1,0				
							JM02	1,0	1,0				
							JM03	4,0	1,0				
							JM05	4,0	0,125				
							JM06	2,0	1,0				
							JM07	4,0	0,25				
G3	JL04	0,5	0,125	JL13	0,25	0,0625	JL01	1,0	0,5	JL16	>16,0	0,25	
	JL05	0,25	0,0625	JL14	2,0	0,0625	JL12	1,0	0,0625				
	JL06	0,125	0,125	JL17	8,0	0,125							
	JL07	0,25	0,25	JL18	0,5	0,0625							
	JL08	4,0	0,5	JL19	4,0	0,125							
	JL09	0,5	0,5	JL23	4,0	0,0625							
	JL05	1,0	0,0625	JL24	0,5	0,0625							
	JL03	1,0	0,25	JL25	1,0	0,0625							
				JL26	>16,0	0,125							

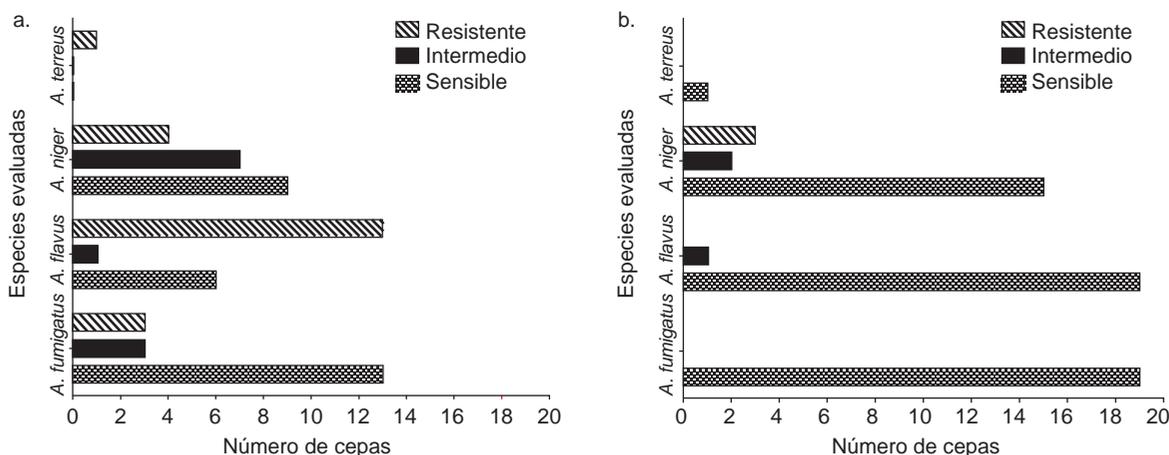


Figura 1. Distribución de las cepas evaluadas mediante el ensayo de microdilución (M38-A2) según la especie y el patrón de sensibilidad a la anfotericina B (AMB) (a) y al itraconazol (ITZ) (b)

Discusión

En el estudio se evidenció un grado variable de reacción a la anfotericina B; sin embargo, en el análisis estadístico de la relación entre el origen

ambiental de las cepas y sus patrones de sensibilidad a este antifúngico, no se pudo confirmar la hipótesis. Este polieno es el antifúngico de primera línea para el tratamiento de las micosis graves y su empleo

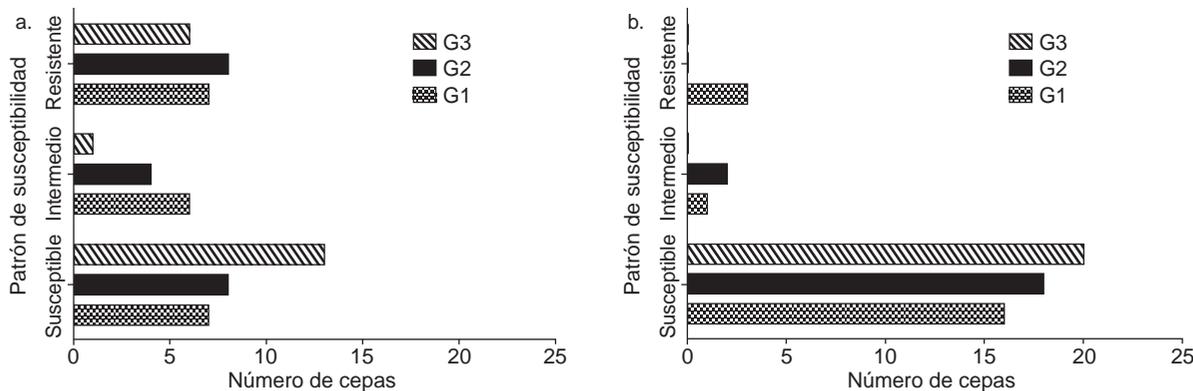


Figura 2. Distribución de las cepas evaluadas mediante el ensayo de microdilución (M38-A2) según su patrón de sensibilidad y el origen del aislamiento. **a)** frente a la anfotericina B (AMB); **b)** frente al itraconazol (ITZ). G1: ambientes interiores y exteriores no hospitalarios; G2: ambientes hospitalarios; G3: muestras clínicas

Cuadro 2. Valores de concentración mínima inhibitoria (CIM) del voriconazol (VCZ) para las cepas evaluadas por Etes®. Los grupos corresponden al origen de las cepas. G1: ambientes interiores y exteriores no hospitalarios; G2: ambientes hospitalarios; G3: muestras clínicas

Grupos	<i>Aspergillus fumigatus</i> (código de la cepa)	VCZ ^{CIM} (µg/ml)	<i>Aspergillus flavus</i> (código de la cepa)	VCZ ^{CIM} (µg/ml)	<i>Aspergillus niger</i> (código de la cepa)	VCZ ^{CIM} (µg/ml)	<i>Aspergillus terreus</i> (código de la cepa)	VCZ ^{CIM} (µg/ml)
G1	JF10	0,125	JF00	0,25	JF15	1,0		
			JF04	1,0	JF16	1,0		
			JF06	0,25	JF17	2,0		
			JF11	0,25				
			JF14	0,5				
			JF18	1,0				
G2			JJ11	1,0	JM03	1,0		
			JJ8	0,25	JM05	1,0		
			JM10	0,25	JM07	0,5		
					JM08	0,5		
G3	JL08	0,25	JL17	0,25			JL16	0,75
			JL19	0,125				
			JL23	0,125				
			JL26	0,0625				

está generalizado en la mayoría de los hospitales, lo cual supone una problemática cuya verdadera dimensión no se conoce, pues la presión selectiva en estos ambientes podría contribuir a la aparición de fenotipos resistentes (12).

Afortunadamente, la resistencia a este antifúngico es poco frecuente y posiblemente esté asociada a bajos niveles de ergosterol en la membrana celular, lo que conlleva una menor acción del fármaco (13), o a la presencia de mutaciones en el gen *erg3* que originan la inactivación de la 5,6-esterol desaturasa, una enzima que participa en la ruta de biosíntesis del ergosterol y genera esteroides anormales cuando se ve afectada. Asimismo, existen especies de *Aspergillus* capaces de producir enzimas con actividad reductora, que disminuyen el efecto oxidativo de la anfotericina B en el metabolismo fúngico (14).

Aspergillus terreus es una especie que ha surgido como patógeno oportunista capaz de causar aspergilosis pulmonar, onicomycosis y queratomycosis, entre otras enfermedades, y ha suscitado especial atención por su resistencia natural *in vitro* e *in vivo* (15). En 2009, Lars-Flörl, et al. (16), evaluaron el comportamiento de 79 cepas de *A. terreus* frente a nueve agentes antifúngicos. La media geométrica de los valores de CIM obtenidos para la anfotericina B fue de 1,77 µg/ml (16). Aunque en el presente estudio solo se encontró una cepa perteneciente a esta especie, esta mostró la máxima CIM registrada para este antifúngico (>16 µg/ml), comparable con muchas de las cepas analizadas por Lars-Flörl, et al. Si se supera el número de aislamientos de esta especie, se podría confirmar con mayor certeza que su resistencia natural a la anfotericina B no es un fenotipo poco común.

La distribución de especies pudo influir en los datos de los grupos. El análisis de varianza confirmó la existencia de diferencias significativas entre los valores de CIM para las diferentes especies evaluadas (figura 1). En el estudio, el mayor número de cepas resistentes a la anfotericina B se concentró en *A. flavus*, con 21,67 % (13 cepas) del total, y esta fue la especie con la mayor media geométrica (2,73). Según Krishnan, *et al.*, la resistencia a este antifúngico en *A. flavus* es frecuente (17), y Seo, *et al.*, plantean que dicho fenómeno puede deberse a alteraciones en las concentraciones de beta-1,3 glucano y de los complejos proteicos de la pared celular de esta especie, que disminuyen la interacción de la anfotericina B con la membrana plasmática (18).

Cuatro (6,67 %) cepas de *A. niger* y solo tres (5 %) cepas de *A. fumigatus*, fueron resistentes a la anfotericina B, resultados que coinciden con los de varios estudios (19-21).

En estudios sobre aeromicota en Cuba, se ha evidenciado que la especie *A. flavus* es la de mayor predominio entre las potencialmente patógenas (22,23). Infortunadamente, no se conoce con precisión la situación real de las infecciones causadas por *Aspergillus* spp. en nuestro país, lo que genera incertidumbre sobre la prevalencia de esta especie como causante de infección y el subsecuente problema terapéutico que puede generar.

Es importante tener en cuenta que el proceso de identificación de las especies se hizo mediante los métodos convencionales basados en el análisis de las características culturales y de la micromorfología. Esto constituye un sesgo para la clasificación taxonómica por las diferentes modificaciones que ha sufrido la sistemática de hongos en las últimas décadas con el apoyo de las técnicas de identificación molecular. Existe la posibilidad de que algunas de estas cepas pertenezcan a otras especies clasificadas en las diversas secciones establecidas para el género *Aspergillus*, las cuales son imposibles de determinar mediante la metodología convencional. Estas especies 'crípticas', como se denominan, tienen patrones de sensibilidad categorizados como resistentes a la mayoría de los antifúngicos empleados en el ámbito clínico (24) y podrían ser la causa de los perfiles de sensibilidad registrados en este trabajo.

Solo se encontraron tres cepas resistentes al itraconazol (>16 µg/ml) de la especie *A. niger* en el grupo de ambientes interiores y exteriores no hospitalarios. En diversos estudios a nivel internacional,

se comenta sobre la resistencia de esta especie al antifúngico (15,25,26). Tokarzewski, *et al.*, en un grupo de 10 cepas de *A. niger*, obtuvieron valores de CIM₉₀ frente a este antifúngico de hasta 8 µg/ml mediante el método M38-A, y cinco cepas clasificadas como resistentes, según lo establecido por el CLSI (27). Asimismo, Gheith, *et al.*, hallaron valores elevados (2 mg/l) de la CIM₉₀ del itraconazol, en 17 cepas de *A. niger* aisladas de pacientes con enfermedades hematológicas en Túnez (21).

La evaluación del voriconazol no reveló cepas resistentes; sin embargo, una de ellas se clasificó como de sensibilidad intermedia, y ocho sensibles presentaron el valor extremo de su categoría. Los valores de la CIM del voriconazol fueron similares a los reportados por Pfaller, *et al.* (28). Este antifúngico actúa, no solo sobre la 14 α -esterol demetilasa, enzima diana de la mayoría de los azoles, sino también, sobre la 24-metileno dihidro-lanosteroldemetilasa, otra enzima de la ruta biosintética del ergosterol (29), lo cual podría explicar su mejor efecto en comparación con otros antifúngicos de su misma familia farmacológica, y constituye otra prueba de su potencial terapéutico.

Uno de los nuevos grupos farmacológicos en el tratamiento de la aspergilosis es el de las equinocandinas, moléculas que actúan como inhibidores de la beta-1,3-D-glucano sintasa y afectan indirectamente la incorporación de los beta-1,3-D-glucanos a la pared celular de los hongos.

En el género *Aspergillus*, estos polisacáridos se concentran fundamentalmente en la pared de la región apical de la hifa y no en el resto del micelio y, por lo tanto, la actividad del fármaco influye sobre la velocidad del crecimiento fúngico, pero no sobre otros aspectos fisiológicos (30). La evaluación de la sensibilidad *in vitro* de estos antifúngicos es compleja debido al llamado efecto de arrastre (*trailing effect*) que impide establecer de forma precisa la CIM, por lo que en su lugar se utiliza la concentración efectiva mínima (CEM) como un concepto más adecuado para la interpretación de su actividad antifúngica (10,31).

Por falta de disponibilidad, en este trabajo no se pudieron evaluar la caspofungina, la anidulafungina ni la micafungina; sin embargo, existen diversos estudios a nivel internacional con interesantes resultados. En 2011, Lockhart, *et al.*, publicaron un estudio en el que evaluaron la sensibilidad de 288 aislamientos de *Aspergillus* spp. a estas tres

equinocandinas y ninguna de las CEM₉₀ para *A. fumigatus*, *A. flavus* y *A. niger* sobrepasaron el valor de 0,06 µg/ml, en tanto que solamente *A. terreus* mostró un valor de 0,5 µg/ml para la caspofungina (32). En un estudio anterior, Messer, *et al.*, también encontraron una buena actividad de la caspofungina y la anidulafungina frente a 49 aislamientos de *A. fumigatus*, con valores de CEM₉₀ de 0,12 y 0,008 µg/ml, respectivamente (33).

En el presente estudio, no se comprobó la existencia de una relación entre el origen ambiental de las cepas y su patrón de sensibilidad al itraconazol (figura 2). Sin embargo, las cepas resistentes a este antifúngico se concentraron en el G1 (5 %) con la mayor media geométrica (0,84), un hecho interesante dado que son cepas que provienen de ambientes en los cuales los azoles no tienen uso clínico.

En países europeos y asiáticos, se ha observado que muchas de las cepas de *A. fumigatus* resistente a azoles son frecuentes en campos de cultivo o zonas donde el uso agrícola de triazoles es habitual, o en pacientes que nunca han sido tratados con antifúngicos pero tienen un vínculo estrecho con este tipo de ambientes. El tebuconazol, el propiconazol, el protioconazol, el tetraconazol, el metconazol y el epoxiconazol, son algunos de los fungicidas inhibidores de la desmetilación que a menudo se emplean para la protección contra agentes fitopatógenos (34).

Pham, *et al.*, señalaron que estos compuestos tienen una naturaleza homóloga con los triazoles de uso clínico, y que los microorganismos están expuestos con mayor frecuencia a ellos, lo cual facilita que ocurran mutaciones y que estas se propaguen (4). En los estudios de Faria-Ramos, *et al.*, se emplearon tres cepas de *A. fumigatus* sometidas a incrementos de procloraz, un azol usado ampliamente en la agricultura; posteriormente, analizaron su sensibilidad al itraconazol, el voriconazol, el posaconazol y el fluconazol, registrando un incremento en los valores de la CIM para los triazoles de uso clínico, lo cual aportó evidencias sobre este tipo de resistencia adquirida en el entorno natural (35).

En Cuba, se ha descrito la influencia de fenómenos meteorológicos en la diseminación de algunas especies de hongos. En 2006, Lopetegui, *et al.*, propusieron modelos predictivos de la trayectoria de conidios transportados por los vientos de diferentes huracanes (36). Asimismo, en reportes meteorológicos anuales de la región del Caribe, se han registrado tormentas de polvo provenientes de la región del

Sahara, entre los meses de marzo y agosto (37), casualmente, la época en la que se aislaron muchas de estas cepas. Estos datos sugieren la posibilidad de que los microorganismos no sean autóctonos y hayan sido importados de forma natural desde áreas con predominio de fenotipos resistentes, o que sean cepas recombinantes de genotipos endémicos con cepas foráneas resistentes.

Este estudio es una investigación preliminar sobre el comportamiento de los patrones de sensibilidad en cepas cubanas de las especies de *Aspergillus* de mayor interés clínico. Se encontró que la resistencia a los azoles era poco frecuente, lo cual es favorable desde el punto de vista epidemiológico y terapéutico. La resistencia a la anfotericina B, en cambio, fue considerable y ello constituye una alerta. Como parte de futuros proyectos, se pretende aumentar el tamaño de la muestra poblacional para confirmar con mayor precisión estos resultados.

Agradecimientos

A los doctores Edel García e Ileana Paneque, por sus contribuciones al desarrollo de este estudio.

Conflicto de intereses

No existe conflicto de intereses.

Financiación

Se obtuvo del Ministerio de Salud Pública de la República de Cuba.

Referencias

1. **Bennett JW.** *Aspergillus: A primer for the novice.* Med Mycol. 2009;47:5-12. <https://doi.org/10.1080/13693780802712515>
2. **Stevens DA.** Clinical aspergillosis for basic scientists. Med Mycol. 2009;47:1-4. <https://doi.org/10.1080/13693780802322232>
3. **Patterson TF, Thompson III GR, Denning DW, Fishman JA, Hadley S, Herbercht R, et al.** Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2016;63:1-60. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw326>
4. **Pham CD, Reiss E, Hagen F, Meis JF, Lockhart SR.** Passive surveillance for azole-resistant *Aspergillus fumigatus*, United States, 2011-2013. Emerg Infect Dis. 2014;20:1498-503. <https://doi.org/10.3201/eid2009.140142>
5. **Badiee P, Alborzi A, Moeini M, Haddadi P, Farshad S, Japoni A, et al.** Antifungal susceptibility of the *Aspergillus* species by Etest and CLSI reference methods. Arch Iran Med. 2012;15:429-32.
6. **Lass-Flörl C, Perkhof S.** *In vitro* susceptibility-testing in *Aspergillus* species. Mycoses. 2008;51:437-46. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2008.01510.x>
7. **Barnet HL, Hunter BB.** Illustrated genera of imperfect fungi. Portland: MacMillan Publisher Co.; 1997. p. 218.

8. **Klich MA, Pitt JI.** A laboratory guide to the common *Aspergillus* species and their 19 teleomorphs. Canberra: CSIRO - Division of Food Processing; 2002. p. 116.
9. **De Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ.** Atlas of Clinical Fungi. Segunda edición. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht: Universitat Rovira i Virgili, Reus; 2000. p. 442-519.
10. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Document M38-A2; Approved Standard. Second edition. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008. p. 52.
11. **Guinea J, Peláez T, Alcalá L, Bouza E.** Correlation between the ETest and the CLSI M38-A microdilution method to determine the activity of amphotericin B, voriconazole, and itraconazole against clinical isolates of *Aspergillus fumigatus*. *Diagn Microb Infec Dis.* 2007;57:273-6. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2006.09.003>
12. **Chakrabarti A.** Drug resistance in fungi: An emerging problem. *Regional Health Forum.* 2011;15:97-103.
13. **Ellis D.** Amphotericin B: Spectrum and resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2002;49:7-10. https://doi.org/10.1093/jac/49.suppl_1.7
14. **Knechtel SA, Klepser ME.** Amphotericin B resistance: Epidemiology, mechanisms, and clinical relevance. *J Invasive Fungal Infect.* 2007;1:93-8.
15. **Guarro J, Xavier MO, Severo LC.** Differences and similarities amongst pathogenic *Aspergillus* species. En: Pasqualotto AC, editor. *Aspergillosis: From diagnosis to prevention.* Dordrecht: Springer; 2010. p. 7-32.
16. **Lass-Flörl C, Izquierdo AA, Cuenca-Estrella M, Perkhofers S, Tudela JLR.** *In vitro* activities of various antifungal drugs against *Aspergillus terreus*: Global assessment using the methodology of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53:794-5. <https://doi.org/10.1128/AAC.00335-08>
17. **Krishnan S, Manavathu EK, Chandrasekar PH.** *Aspergillus flavus*: An emerging non- *fumigatus Aspergillus* species of significance. *Mycoses.* 2009;52:206-22. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2008.01642.x>
18. **Seo K, Akiyoshi H, Ohnishi Y.** Alteration of cell wall composition leads to amphotericin B resistance in *Aspergillus flavus*. *Microbiol Immunol.* 1999;43:1017-25. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1999.tb01231.x>
19. **Howard SJ, Harrison E, Bowyer P, Varga J, Denning DW.** Cryptic species and azole resistance in the *Aspergillus niger* complex. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:4802-9. <https://doi.org/10.1128/AAC.00304-11>
20. **Kaya AD, Kiraz N.** *In vitro* susceptibilities of *Aspergillus* spp. causing otomycosis to amphotericin B, voriconazole and itraconazole. *Mycoses.* 2007;50:447-50. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2007.01409.x>
21. **Gheith S, Saghrouni F, Bannour W, Ben Youssef Y, Khelif A, Normand AC, et al.** *In vitro* susceptibility to amphotericin B, itraconazole, voriconazole, posaconazole and caspofungin of *Aspergillus* spp. isolated from patients with haematological malignancies in Tunisia. *Springerplus.* 2014;3:1-8. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-19>
22. **Almaguer M, Rojas-Flores TI.** Aeromicota viable de la atmósfera de La Habana, Cuba. *Nova Acta Cient Compostel Biol.* 2013;20:35-45.
23. **Rojas TI, Martínez E, Aira MJ, Almaguer M.** Aeromicota de ambientes internos: comparación de métodos de muestreo. *Boletín Micológico.* 2008;23:67-73.
24. **Bernal-Martínez L, Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M.** Diagnostics and susceptibility testing in *Aspergillus*. *Future Microbiol.* 2016;11:315-28. <https://doi.org/10.2217/fmb.15.140>
25. **Vadlapudi V.** Antifungal resistance of few *Aspergillus* species. *Pharmacophore.* 2011;2:163-7.
26. **van der Linden JW, Warris A, Verweij PE.** *Aspergillus* species intrinsically resistant to antifungal agents. *Med Mycol.* 2011;49:82-9. <https://doi.org/10.3109/13693786.2010.499916>
27. **Tokarzowski S, Ziółkowska G, Nowakiewicz A.** Susceptibility testing of *Aspergillus niger* strains isolated from poultry to antifungal drugs – a comparative study of the disk diffusion, broth microdilution (M 38-A) and Etest® methods. *Pol J Vet Sci.* 2012;15:125-33. <https://doi.org/10.2478/v10181-011-0123-7>
28. **Pfaller M, Messer SA, Boyken L, Rice C, Tendolkar S, Hollis RJ, et al.** *In vitro* survey of triazole cross-resistance among more than 700 clinical isolates of *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol.* 2008;46:2568-72. <https://doi.org/10.1128/JCM.00535-08>
29. **Pemán J, Salavert M, Cantón E, Jarque I, Romá E, Zaragoza R, et al.** Voriconazole in the management of nosocomial invasive fungal infections. *Ther Clin Risk Manag.* 2006;2:129-58.
30. **Mayr A, Aigner M, Lass-Flörl C.** Caspofungin: When and how? The microbiologist's view. *Mycoses.* 2011;55:27-35. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2011.02039.x>
31. **Chen SCA, Slavin MA, Sorrell TC.** Echinocandin antifungal drugs in fungal infections: A comparison. *Drugs.* 2011;71:11-41. <https://doi.org/10.2165/11585270-000000000-00000>
32. **Lockhart SR, Zimbeck AJ, Baddley JW, Marr KA, Andes DR, Walsh TJ, et al.** *In vitro* echinocandin susceptibility of *Aspergillus* isolates from patients enrolled in the transplant-associated infection surveillance network. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:3944-6.
33. **Messer SA, Jones RN, Moet GJ, Kirby JT, Castanheira M.** Potency of anidulafungin compared to nine other antifungal agents tested against *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., and *Aspergillus* spp.: Results from the global sentry antimicrobial surveillance program (2008). *J Clin Microbiol.* 2010;48:2984-7. <https://doi.org/10.1128/JCM.00328-10>
34. **Badali H, Vaezi A, Haghani I, Yazdanparast SA, Hedayati MT, Mousavi B, et al.** Environmental study of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* with TR34 /L98H mutations in the *cyp51A* gene in Iran. *Mycoses.* 2013;56:659-63. <https://doi.org/10.1111/myc.12089>
35. **Faria-Ramos I, Farinha S, Neves-Maia J, Tavares PR, Miranda IM, Estevinho LM, et al.** Development of cross-resistance by *Aspergillus fumigatus* to clinical azoles following exposure to prochloraz, an agricultural azole. *BMC Microbiol.* 2014;14:1-5. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-155>
36. **Lopetegui CM, Menéndez GMM, Pérez YT, López ME, Castillo EM.** Aplicaciones de la aerobiología en el sistema de predicción y vigilancia de la enfermedad moho azul del tabaco en la provincia Pinar del Río, Cuba. *Avances.* 2006;8:1-11.
37. **Monteil MA.** Saharan dust clouds and human health in the English-speaking Caribbean: What we know and don't know. *Environ Geochem Health.* 2008;30:339-43.