

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Sensibilidad *in vitro* de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* frente a anfotericina B, ketoconazol, itraconazol y fluconazol

Lic. Carlos Manuel Fernández Andreu,¹ Lic. Agner Martínez León,² Lic. Yamilé Echemendía Medina,² Dr. Gerardo Martínez Machín,³ Lic. Mayda R. Perurena Lancha⁴ y Dra. María Teresa Illnait Zaragoza³

RESUMEN

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante un micrométodo de dilución en caldo RPMI-1640, con el objetivo de conocer la sensibilidad a la anfotericina B, el itraconazol, el ketoconazol y el fluconazol de 29 cepas de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* aisladas en Cuba. La histoplasmosis es una de las principales micosis sistémicas al nivel mundial, cuya incidencia se ha incrementado en los últimos años, asociada principalmente a la infección por el VIH y a la aparición de nuevos brotes epidémicos en diferentes regiones. Los resultados obtenidos permitieron concluir que frente al fluconazol se encontraron valores altos de CMI, con una media geométrica de 55,5 µg/mL. Para la anfotericina B, el ketoconazol y el itraconazol todas las cepas fueron inhibidas a concentraciones bajas, con medias geométricas de 0,26, 0,17 y 0,125 µg/mL, respectivamente. El desarrollo por primera vez en Cuba de un método para la determinación de CMI de las principales drogas antifúngicas frente a *H. capsulatum* var. *capsulatum*, permitirá establecer los patrones de sensibilidad y detectar la aparición de resistencia, lo que contribuirá a un mejor conocimiento de esta importante micosis.

DeCS: HISTOPLASMOSIS/ QUIMIOTERAPIA; TEST DE SENSIBILIDAD MICROBIANA/ métodos; AGENTES ANTIFUNGICOS; HISTOPLASMA.

La histoplasmosis, infección causada por el hongo *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, se ha convertido en una de las micosis más estudiadas al nivel mundial y su incidencia ha aumentado en los últimos años, asociada fundamentalmente a la extensión de la pandemia de SIDA. En Cuba, su importancia social está dada, no solo por su relación con determinados grupos ocupacionales, sino también por su frecuente presentación en forma de brotes epidémicos.¹

Antes de la aparición de los azoles, la única droga disponible para el tratamiento de la histoplasmosis era la anfotericina B, con sus

conocidos efectos adversos. Sin embargo, en la actualidad, el arsenal terapéutico incluye, además de la anfotericina B (en su forma convencional y en sus nuevas presentaciones lipídicas), al ketoconazol, el itraconazol y el fluconazol.²

Con la disponibilidad de estas nuevas drogas antifúngicas y la aparición de cepas resistentes, las pruebas de sensibilidad *in vitro* se han convertido en una necesidad y han sido objeto de un creciente interés con vistas a lograr su estandarización y la adecuada correspondencia entre los resultados de laboratorio y la evolución clínica de los pacientes sometidos a tratamiento

¹ Licenciado en Microbiología. Investigador Auxiliar.

² Licenciado en Microbiología.

³ Especialista de I Grado en Microbiología

⁴ Licenciada en Microbiología. Investigadora Agregada.

antimicótico.³ Con el objetivo de conocer la sensibilidad *in vitro* de 29 cepas de *H. capsulatum* var. *capsulatum* aisladas en Cuba, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de anfotericina B, itraconazol, ketoconazol y fluconazol, mediante un micrométodo de dilución en caldo.

MÉTODOS

Cepas estudiadas: 15 aislamientos clínicos y 14 ambientales de *H. capsulatum* var. *capsulatum* pertenecientes a la colección de cultivos del Laboratorio de Micología del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK).

Cepas de referencia: *Candida parapsilosis* ATCC 22019 (recomendada en el documento M27-A del Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico de los EE.UU.⁴) y *Paecilomyces variotii* ATCC 22319,⁵ como controles de calidad.

Agentes antifúngicos: las drogas utilizadas fueron la anfotericina B (Fungizone, Squibb), el itraconazol (Sporanox, Janssen), el ketoconazol (Nizoral, Janssen) y el fluconazol (Diflucan, Pfizer).

Solventes: se utilizó el dimetilsulfóxido (DMSO) a 100 % para el ketoconazol, el itraconazol y la anfotericina B; para el fluconazol se utilizó como solvente el agua destilada estéril.

Medios de cultivo: los medios empleados fueron el agar papa dextrosa (APD, Oxoid) para el cultivo de la fase filamentosa y el RPMI-1640 (Sigma) (en solución amortiguadora de ácido morfolinopropanosulfónico, MOPS, Sigma, 0,165 M, pH 7,0) para las pruebas de sensibilidad *in vitro*. Se utilizó además, el agar Sabouraud glucosado (ASG) para la determinación de las unidades formadoras de colonias (UFC).

Soporte: para la determinación de las CMI se emplearon placas estériles de poliestireno para microtitulación, de 96 pocillos con fondo en U.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria

Preparación del inóculo: se prepararon suspensiones en solución salina fisiológica estéril de cada una de las cepas de *H. capsulatum* var. *capsulatum* y de *P. variotii* a partir de cultivos de

7-10 d de incubación a 28 °C en APD y la densidad óptica fue ajustada a 0,2 (530 nm); de cada una de ellas se tomaron 100 µL y se adicionaron a 5 mL de medio RPMI-1640. Para la determinación de las UFC se tomaron otros 100 µL de cada suspensión y se sembraron en placas de ASG.⁵

La suspensión de la cepa control de *C. parapsilosis* se preparó a partir de un cultivo de 24 h en ASG incubado a 30 °C y se ajustó su turbidez en correspondencia con el tubo 0,5 de la escala de McFarland. Se tomaron 50 µL de esta suspensión y se adicionaron a 5 mL de RPMI-1640, obteniéndose una concentración de $9,0 \times 10^3$ UFC/mL, lo cual fue comprobado mediante el conteo de colonias en ASG.⁴

Diluciones del antifúngico: se prepararon soluciones “madre” de anfotericina B, ketoconazol e itraconazol en DMSO y de fluconazol en agua destilada estéril, cada una con concentración de 2 mg/mL y a partir de estas se preparó una segunda solución de 1 280 µg/mL con agua destilada estéril. Después de repartir 20 µL de agua destilada estéril en cada pocillo, se tomaron 20 µL de esta solución y a partir de la columna 2 se realizaron diluciones dobles hasta la columna 11.

Inoculación: de las suspensiones de inóculos, se distribuyeron 180 µL por pocillo desde la columna 12 hasta la 2, realizándose por duplicado para cada cepa. Las concentraciones finales del antifúngico después de añadido el inóculo estuvieron entre 64 µg/mL (columna 2) y 0,125 µg/mL (columna 11). En la columna 1 se distribuyeron 180 µL del medio de cultivo sin inocular, quedando como control negativo de crecimiento. En la columna 12 no se adicionó antifúngico quedando como control positivo de reproducibilidad interna. El volumen total de cada pocillo fue de 200 µL.⁶

Determinación del punto final: las placas se incubaron en cámara húmeda hasta 7 d a 30 °C. Las lecturas se realizaron cuando se detectó crecimiento visible en los pocillos correspondientes al control sin drogas (columna 12). Para las drogas azólicas, la CMI se consideró como la menor concentración de antifúngico que mostró una marcada inhibición del crecimiento (³ 50 %) en comparación con el control sin droga, mientras que para la anfotericina B la CMI se definió como la menor concentración que fue capaz de producir 100 % de inhibición del crecimiento.⁵

Análisis estadístico: se calcularon las medias geométricas de los valores de CMI de las cepas frente a cada una de las drogas, así como los rangos, los porcentajes acumulativos y las CMI_{50} y CMI_{90} (las menores concentraciones que inhiben a 50 y 90 % de las cepas, respectivamente). Cuando la lectura de CMI fue superior a 64 $\mu\text{g/mL}$, se tomó el valor de 128 $\mu\text{g/mL}$ para el cálculo de la media geométrica.

RESULTADOS

Las concentraciones de los inóculos obtenidos a partir de la fase filamentosa de las cepas en estudio oscilaron entre $3,1 \times 10^4$ y $6,6 \times 10^4$ UFC/mL.

Los resultados de los valores de CMI, para las cepas de origen ambiental así como los rangos y las medias geométricas para cada una de las drogas se muestran en la tabla 1. Los valores de CMI de anfotericina B y ketoconazol estuvieron en un rango de 0,125-0,5 $\mu\text{g/mL}$, mientras que el fluconazol presentó un rango de valores de CMI de 32 a >64 $\mu\text{g/mL}$; todas las cepas fueron inhibidas con 0,125 $\mu\text{g/mL}$ de itraconazol. Para las cepas de origen clínico, los valores obtenidos fueron muy similares a los de las cepas ambientales (tabla 2): el rango de CMI de anfotericina B fue de 0,125-1,0 $\mu\text{g/mL}$,

mientras que el de ketoconazol fue de 0,125-0,25 $\mu\text{g/mL}$. El fluconazol mostró igualmente los valores más altos de CMI, con un rango de 16 a >64 $\mu\text{g/mL}$; la menor concentración utilizada de itraconazol fue suficiente para inhibir el crecimiento de todas las cepas estudiadas. No se encontraron diferencias entre las medias geométricas de los valores de CMI entre las cepas de origen clínico y las de origen ambiental.

En la tabla 3 se muestra el número total de cepas inhibidas y sus porcentajes acumulativos frente a cada una de las concentraciones de las drogas utilizadas, así como los valores de CMI_{50} y CMI_{90} .

Para la anfotericina B se encontró que con 0,25 $\mu\text{g/mL}$ se podía inhibir más de 50 % de las cepas (CMI_{50}), mientras que la siguiente dilución (0,5 $\mu\text{g/mL}$) fue capaz de eliminar a 93 % (CMI_{90}) (tabla 3).

Los resultados obtenidos en el presente estudio mostraron una marcada inhibición de *H. capsulatum* var. *capsulatum* frente al ketoconazol, con un rango de CMI entre 0,125-0,5 $\mu\text{g/mL}$ y una media geométrica de 0,17 $\mu\text{g/mL}$ (tabla 3). Fueron inhibidas 20 cepas por la menor concentración de la droga, lo cual representa un valor de CMI_{50} de 0,125 $\mu\text{g/mL}$, mientras que 93 % mostró inhibición con la dilución siguiente, correspondiéndose con una CMI_{90} de 0,25 $\mu\text{g/mL}$.

TABLA 1. Valores de concentración mínima inhibitoria ($\mu\text{g/mL}$) de anfotericina B, itraconazol, ketoconazol y fluconazol en las cepas de *H. capsulatum* var. *capsulatum* de origen ambiental

Cepas	Anfotericina B	Itraconazol	Ketoconazol	Fluconazol
001	0,25	0,125	0,125	> 64
002	0,5	0,125	0,125	32
003	0,25	0,125	0,125	32
006	0,25	0,125	0,125	64
011	0,5	0,125	0,125	64
0262	0,125	0,125	0,5	64
0263	0,5	0,125	0,125	64
0264	0,125	0,125	0,25	32
0265	0,125	0,125	0,5	> 64
0266	0,25	0,125	0,25	32
0268	0,25	0,125	0,125	32
0269	0,25	0,125	0,25	64
0270	0,125	0,125	0,125	64
0271	0,25	0,125	0,125	64
Rango	0,125-0,5	0,125	0,125 - 0,5	32 - >64
Media geométrica	0,24	0,125	0,18	55,2

TABLA 2. Valores de concentración mínima inhibitoria ($\mu\text{g/mL}$) de anfotericina B, itraconazol, ketoconazol y fluconazol en las cepas de *H. capsulatum* var. *capsulatum* de origen clínico

Cepas	Anfotericina B	Itraconazol	Ketoconazol	Fluconazol
004	0,5	0,125	0,125	> 64
007	0,5	0,125	0,125	32
013	1,0	0,125	0,125	64
051	1,0	0,125	0,125	32
071	0,5	0,125	0,25	> 64
074	0,125	0,125	0,25	32
079	0,125	0,125	0,25	> 64
080	0,125	0,125	0,25	> 64
081	0,5	0,125	0,125	64
0140	0,25	0,125	0,125	64
0173	0,125	0,125	0,125	16
0174	0,125	0,125	0,125	32
0261	0,5	0,125	0,125	16
0267	0,125	0,125	0,125	64
0272	0,125	0,125	0,125	> 64
Rango	0,125 - 1,0	0,125	0,125 - 0,25	16 - >64
Media geométrica	0,27	0,125	0,15	55,7

TABLA 3. Número de cepas de *H. capsulatum* var. *capsulatum* inhibidas y sus porcentajes acumulativos frente a las concentraciones de las drogas utilizadas, (n=29)

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Anfotericina B		Itraconazol		Ketoconazol		Fluconazol	
	n (%)	PA	n (%)	PA	n (%)	PA	n (%)	PA
0,125	11 (38)	38	29 (100)	100	20 (69)	69	-	-
0,25	8 (26)	66	-	-	7 (24)	93	-	-
0,5	8 (26)	93	-	-	2 (7)	100	-	-
1	2 (7)	100	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	2 (7)	7
32	-	-	-	-	-	-	9 (31)	38
64	-	-	-	-	-	-	11 (38)	76
> 64	-	-	-	-	-	-	7 (24)	100
MG	0,26		0,125		0,17		55,5	
Rango	0,125 - 1,0		0,125		0,125 - 0,5		16 - >64	
CMI ₅₀	0,25		0,125		0,125		64	
CMI ₉₀	0,5		0,125		0,25		> 64	

n: número de cepas, PA: porcentajes acumulativos, MG: media geométrica.

Para el fluconazol, se obtuvo un rango de CMI entre 16 a $>64 \mu\text{g/mL}$, con media geométrica de $55,5 \mu\text{g/mL}$ (tabla 3). La CMI₅₀ se alcanzó con $64 \mu\text{g/mL}$, mientras que la CMI₉₀ fue de $>64 \mu\text{g/mL}$.

Las cepas de *C. parapsilosis* y *P. variottii* utilizadas como control de calidad mostraron valores de CMI que se correspondieron con los de referencia,^{4,5} lo que sirvió para validar la actividad de los antifúngicos empleados.

DISCUSIÓN

La estandarización del inóculo constituye el primer paso crítico en las pruebas de sensibilidad *in vitro* con agentes antifúngicos.⁷ En el presente trabajo se emplearon concentraciones semejantes a las utilizadas por Espinel-Ingroff ($0,9-4,7 \times 10^4 \text{ UFC/mL}$) en un estudio similar donde compara la actividad *in vitro* del voriconazol con la anfotericina B y el itraconazol. En particular,

cuando se trata de hongos filamentosos este paso se hace mucho más difícil, porque la suspensión celular generalmente está formada por fragmentos de hifas de diferentes tamaños y por los distintos tipos de conidios.⁵

Las drogas utilizadas tienen su principal sitio de acción sobre el ergosterol de la membrana fúngica, el cual presenta pocas variaciones en la transición de micelio a levadura, proceso en el cual los cambios fundamentales se registran en la composición de α y β -glucanos al nivel de la pared celular.⁸⁻¹¹

Al nivel mundial se han reportado pocos trabajos relacionados con la sensibilidad *in vitro* de los hongos filamentosos o dimórficos, fundamentalmente por la falta de estandarización en los métodos empleados.^{3,5} Para *H. capsulatum* var. *capsulatum*, por su naturaleza dimórfica, el problema de la estandarización del inóculo es mayor, porque los valores de CMI pudieran ser distintos para la fase filamentosa y la levaduriforme. En este caso, algunos autores recomiendan preparar la suspensión de células a partir de la fase levaduriforme, lo cual proporcionaría un inóculo más homogéneo. Sin embargo, las levaduras de *H. capsulatum* var. *capsulatum* son mucho más difíciles de cultivar en el laboratorio que las formas filamentosas y requieren no solo una temperatura de 37 °C sino también medios de cultivo enriquecidos y complejos, los cuales no son recomendados para los estudios de drogosen-sibilidad *in vitro*.^{7,12}

De las drogas mencionadas, la anfotericina B es la más efectiva *in vivo* y continúa siendo el antimicótico de elección para el tratamiento de las micosis sistémicas, asociadas o no con el VIH.^{13,14} Los resultados *in vitro* también confirman su alta eficacia, en particular frente a *H. capsulatum* var. *capsulatum*. En este caso, para el total de cepas, se obtuvo un rango de CMI y una media geométrica de 0,125-1,0 $\mu\text{g/mL}$ y 0,26 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente; lo cual se corresponde con los resultados obtenidos por *Espinel-Ingroff* en un estudio similar, donde encontró un rango de 0,25-0,5 $\mu\text{g/mL}$ y una media geométrica de 0,42 $\mu\text{g/mL}$, partiendo de la fase filamentosa.⁵ Valores similares (0,05-1,0 $\mu\text{g/mL}$) fueron encontrados por *Shadomy* y *Pfeller* en 1991;¹⁵ *Connolly* y otros por su parte, obtuvieron valores más bajos, con una media y una CMI₉₀ de 0,019 $\mu\text{g/mL}$.¹⁶

Polak y *Dixon*¹⁷ y *Kobayashi* y otros¹⁸ al estudiar la sensibilidad de diferentes cepas de *H. capsulatum* var. *capsulatum* en fase levaduriforme frente a la anfotericina B, encontraron rangos de CMI de 0,07-0,15 $\mu\text{g/mL}$ y de 0,3-1,04 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, los cuales se pueden considerar bastante cercanos a los obtenidos en el presente trabajo.

Los resultados obtenidos frente al itraconazol se corresponden con los informados por *Espinel-Ingroff* quien obtuvo un valor de CMI y media geométrica de 0,06 $\mu\text{g/mL}$,⁵ que representa solo una dilución inferior con respecto al obtenido en este trabajo. Otros autores han encontrado valores homogéneos de CMI y media geométrica de 0,019 $\mu\text{g/mL}$, los cuales son ligeramente inferiores en comparación con los encontrados en este estudio para la fase filamentosa.¹⁶ Todo esto sugiere el empleo, en estudios futuros, de concentraciones más bajas de esta droga para determinar con mayor exactitud el valor de CMI.

El itraconazol es más activo frente a *H. capsulatum* var. *capsulatum* que los otros azoles, porque además del blanco principal de estos (la enzima 14- α -demetilasa del lanosterol, dependiente del citocromo P450) tiene acción inhibitoria sobre otra enzima que también participa en la biosíntesis del ergosterol, la 3-ketosterol reductasa.¹⁹ Esta droga ofrece una alternativa efectiva para el tratamiento de pacientes con manifestaciones de histoplasmosis ligeras o moderadamente severas y para la complementación de la terapia en aquellos que hayan evolucionado después de un tratamiento corto con anfotericina B.^{16,20} Por su alta efectividad *in vitro* y los resultados obtenidos en el tratamiento de la histoplasmosis, algunos autores lo consideran el fármaco de elección en pacientes con SIDA.²¹

Frente al ketoconazol, los valores obtenidos en el presente trabajo coinciden con los de *Shadomy* y otros quienes obtuvieron una media geométrica entre 0,07 y 0,12 $\mu\text{g/mL}$, con una CMI₉₀ de 0,1-0,2 $\mu\text{g/mL}$ al comparar la sensibilidad *in vitro* de *H. capsulatum* var. *capsulatum* (fase filamentosa) en 3 medios de cultivo diferentes.²² Al comparar estos resultados con los de *Heel*²³ y los de *Polak* y *Dixon*¹⁷ a partir de la fase levaduriforme, se observa que el rango encontrado por *Heel* estuvo

entre 0,1-0,5 µg/mL, mientras que los segundos obtuvieron un rango entre 0,03-0,07 µg/mL. En ambos casos los resultados demuestran una alta efectividad *in vitro* del ketoconazol, esto se corresponde en gran medida con lo obtenido aquí, aunque con valores ligeramente superiores.

El ketoconazol fue el primer antifúngico imidazólico disponible por vía oral, y rápidamente se convirtió en una alternativa para el tratamiento de la histoplasmosis en pacientes inmunocompetentes. Sin embargo, hoy día se considera que no debe ser utilizado en la enfermedad diseminada progresiva o en pacientes infectados por el VIH con histoplasmosis diseminada, porque la respuesta al tratamiento es más lenta y no es tan efectivo como la anfotericina B o el itraconazol.^{14,20}

La elevada disponibilidad oral y los reducidos efectos adversos del fluconazol, entre otros, son factores que han contribuido a su amplia utilización en el tratamiento de numerosas infecciones fúngicas.²⁰ En el caso de la histoplasmosis, un tratamiento con dosis elevadas de fluconazol induce la remisión en la mayoría de los pacientes, sin embargo, muchos presentan episodios de recurrencia frente a la terapia sostenida con esta droga.²⁴ En este sentido existen ciertas contradicciones, porque algunos autores como *George y Penn*¹⁴ afirman categóricamente que el fluconazol no debe usarse en el tratamiento de la histoplasmosis. Sin embargo, *Bradsher* plantea que este fármaco pudiera ser adecuado en pacientes que no toleren el itraconazol y en infecciones del sistema nervioso central por *H. capsulatum* var. *capsulatum*.²⁵ En la actualidad se reconoce a este antimicótico como una de las 4 drogas disponibles para el tratamiento de la histoplasmosis.^{2,21}

La razón de la pobre respuesta del fluconazol frente a la histoplasmosis parece ser su reducida actividad antifúngica *in vitro*.²⁴ En trabajos realizados por *Polak y Dixon* frente a la fase levaduriforme, los valores de CMI se encontraron en un rango de 0,25-5,0 µg/mL, con una media geométrica de 3,3 µg/mL,¹⁷ mientras que *Kobayashi* y otros obtienen valores mucho más elevados, que oscilan entre 16 a >64 µg/mL y 2,95-1 000 µg/mL.¹⁸ *Wheat* y otros reportaron la emergencia de resistencia al fluconazol como causa del fallo terapéutico en pacientes inmunodeprimidos,

cuyas cepas de *H. capsulatum* mostraron valores de CMI ≥ 5 µg/mL.²⁶ Todos estos resultados sugieren la necesidad de emplear elevadas concentraciones de fluconazol *in vitro* para lograr la inhibición de *H. capsulatum* var. *capsulatum*, lo cual coincide con lo obtenido en el presente trabajo, donde los valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ fueron de 64 y >64 µg/mL, respectivamente (tabla 3). Sin embargo, también se puede observar que, en los diferentes estudios realizados, existe una gran variabilidad entre cepas frente a este fármaco, por lo que sería conveniente continuar profundizando en la evaluación de los factores que influyen en este comportamiento.

Teniendo en cuenta la comparación de los resultados obtenidos para las 4 drogas a partir de la fase filamentosa de *H. capsulatum* var. *capsulatum*, con los encontrados por otros autores que parten de la fase levaduriforme, es importante señalar que estos últimos no difieren en gran medida de los aquí hallados. Este es un aspecto interesante y que debe tenerse en cuenta en los futuros trabajos relacionados con las pruebas de sensibilidad *in vitro* con hongos dimórficos.

El presente trabajo ha permitido determinar, por primera vez en Cuba, la sensibilidad de cepas autóctonas de *H. capsulatum* var. *capsulatum* frente a los 4 agentes antifúngicos más utilizados en la terapéutica actual de la histoplasmosis.

SUMMARY

The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by a micromethod of dilution in RPMI-1640 broth in order to know the sensitivity to amphotericin B, itraconazole, ketoconazole and fluconazole of 29 strains of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* isolated in Cuba. Histoplasmosis is one of the main systemic mycosis at the world level and its incidence has increased during the last years, associated mainly with HIV infection and to the appearance of new epidemic outbreaks in different regions. The results obtained allowed to conclude that high values of IMC against fluconazole were found with a geometric mean of 55.5 µg/mL. For amphotericin B, ketoconazole and itraconazole, all the strains were inhibited at low concentrations with geometric means of 0.26, 0.17 and 0.125 µg/mL, respectively. The development for the first time in Cuba of a method to determine the IMC of the main antifungal drugs against *H. capsulatum* var. *capsulatum* will make possible to establish the sensitivity patterns and to detect the appearance of resistance, which will contribute to know this important mycosis better.

Subject headings: HISTOPLASMOSIS/ drug therapy; MICROBIAL SENSITIVITY TEST/ methods; ANTI FUNGAL AGENTS; HISTOPLASMA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fernández Andreu CM. Epidemiología de la histoplasmosis en Cuba. Rev VITAE Acad Biomed Dig 2001 (9). Disponible en: <http://caibco.ucv.vt/vitae/VitaeNueve/Articulos/Micologia/Histoplasmosis/ArchivosHTML/Introduccion.htm>
2. Wheat J, Sarosi G, McKinsey D, Hamill R, Bradsher R, Johnson P, et al. Practice guidelines for the management of patients with histoplasmosis. Clin Infect Dis 2000;30:688-95.
3. Perea S, Patterson TF. The role of antifungal susceptibility testing in the management of patients with invasive mycoses. Rev Iberoam Micol 1999;16: 180-6.
4. NCCLS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; Approved standard. NCCLS document M27-A (ISBN 1-562338-328-0). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087, 1997.
5. Espinel-Ingroff A. *In vitro* activity of the new triazole voriconazole (UK-109,496) against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and common and emerging yeast pathogens. J Clin Microbiol 1998;36(1):198-202.
6. Fernández Andreu CM, González Miranda M, Illnait Zaragoza MT, Martínez Machín G. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de anfotericina B en levaduras de interés médico. Rev Cubana Med Trop 1998;50(1):48-53.
7. Galgiani JN, Rinaldi MG, Polak AM, Pfaller MA. Standardization of antifungal susceptibility testing. J Med Vet Mycol 1992; 30(Suppl 1):213-24.
8. San-Blas G, San-Blas F. Molecular aspects of fungal dimorphism. CRC Crit Rev Microbiol 1983;11:101-27.
9. Kumar BV, Maresca B. Purification of membranes and identification of phase-specific proteins of the dimorphic pathogenic fungi *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. Arch Biochem Bioph 1988;261(1):212-21.
10. San-Blas G. Regulaciones bioquímicas en el dimorfismo y la virulencia de hongos patógenos para humanos. Acta Cient Venez 1992;43:3-10.
11. Eissenberg LG, Moser SA, Goldman WE. Alterations to the cell wall of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* yeast during infection of macrophages or epithelial cells. J Infect Dis 1997;175:1538-44.
12. Espinel-Ingroff A, Barchiesi F, Hazen KC, Martínez-Suárez JV, Scalice G. Standardization of antifungal susceptibility testing and clinical relevance. Med Mycol 1998;36(Suppl 1):68-78.
13. Kobayashi GS, Travis SJ, Rinaldi MG, Medoff G. *In vitro* and *in vivo* activities of Sch 39304, fluconazole, and amphotericin B against *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. Antimicrob Agents Chemother 1990;34(4):524-8.
14. George RB, Penn RL. Histoplasmosis. En: GA Sarosi, SF Davies (ed.) Fungal diseases of the lung. 2nd ed. New York: Raven Press, Ltd; 1993.p.39-50.
15. Shadomy S, Pfaller MA. Laboratory studies with antifungal agents: Susceptibility tests and quantitation in body fluids. En: A Balows (ed.) Manual of Clinical Microbiology. 5th ed. Washington DC :American Society for Microbiology; 1991: 1173-83.
16. Connolly P, Wheat J, Schnitzlein-Bick C, Durkin M, Kohler S, Smedema M, et al. Comparison of a new triazole antifungal agent, Schering 56592, with itraconazole and amphotericin B for treatment of histoplasmosis in immunocompetent mice. Antimicrob Agents Chemother 1999;43(2):322-8.
17. Polak AM, Dixon DM. Fungistatic and fungicidal effects of amphotericin B, ketoconazole and fluconazole (UK 49858) against *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* *in vitro* and *in vivo*. Mykosen 1987;30(4):186-94.
18. Kobayashi GS, Travis SJ, Medoff G. Comparison of fluconazole with amphotericin B in treatment of histoplasmosis in normal and immunosuppressed mice. Rev Infect Dis 1990;12(Suppl 3):291-3.
19. Vanden Bossche H, Warnock DW, Dupont B, Kerridge D, Gupta SS, Improvisi L, et al. Mechanisms and clinical impact of antifungal drug resistance. J Med Vet Mycol 1994;32(Suppl 1):189-202.
20. Kauffman CA, Carver PL. Antifungal agents in the 1990s. Drugs 1997; 53(4): 539-49.
21. Bonifaz A. Micología Médica Básica. 2^a ed. México DF:Méndez Editores, SA de CV, 2000:257-273.
22. Shadomy S, White SC, Yu HP, Dismukes WE. The NIAID Mycoses Study Group. Treatment of systemic mycoses with ketoconazole: *in vitro* susceptibilities of clinical isolates of systemic and pathogenic fungi to ketoconazole. J Infect Dis 1985;152:1249-56.
23. Heel RC. Ketoconazole: Pharmacological profile. *In vitro* and *in vivo* activity. In: Levine HB. Ketoconazole in the management of fungal diseases, New York: ADIS Press,1982:p.55-74.
24. Wheat J, Marichal P, Bossche HV, Le Monte A, Connolly P. Hypothesis on the mechanism of resistance to fluconazole in *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. Antimicrob Agents Chemother 1997;41:404-10.
25. Bradsher RW. Histoplasmosis and blastomycosis. Clin Infect Dis 1996; 22(Suppl 2):S102-S11.
26. Wheat LJ, Connolly P, Smedema M, Brizendine E, Hafner R, AIDS Clinical Trials Group and the Mycotic Study Group of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases. Emergence of resistance to fluconazole as a cause of failure during treatment of histoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency disease syndrome. Clin Infect Dis 2001;33:1910-3.

Recibido: 20 de septiembre de 2002. Aprobado: 28 de marzo de 2003.

Lic. Carlos Manuel Fernández Andreu. Laboratorio de Micología, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Apartado Postal 601. CP 11300, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: cfandreu@ipk.sld.cu