



Universidad Nacional del Nordeste

Facultad de Medicina

Maestría en Micología Médica

2015

**EVALUACIÓN *in vitro* DE CUATRO QUIMIOTIPOS DEL ACEITE
ESENCIAL DE *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown COMO ANTIFÚNGICO
FRENTE A *Fusarium* spp. RECUPERADOS DE MUESTRAS CLÍNICAS**

Bioq. Karina Daniela Ardizzoli

Directora: Ing. Agr. Gladys Albina Lori

Codirectora: Bioq. María Gabriela Santiso

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis Gladys Lori, por haberme dado la oportunidad de realizarla dentro de su equipo de trabajo, por su disponibilidad y atención para resolver cualquier duda, y por el esfuerzo y dedicación en las correcciones.

A Maria Gabriela Santiso, por la codirección de esta tesis y por su valiosa ayuda.

A Ismael Malbran por su ayuda en resolver mis dudas en relación a conceptos estadísticos, pero por sobre todo por su dedicación y cordialidad.

A Susana Sallaber por haberme acompañado en mi crecimiento profesional, por su apoyo y por compartir generosamente sus conocimientos y experiencias.

A Alicia Arechavala, Maria de las Mercedes Romero y Jorge Ringuelet por su generoso aporte con material de trabajo.

Y por sobre todo a mi hermosa familia que sin su comprensión, su apoyo y su colaboración esto no hubiera sido posible....

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	5
2. INTRODUCCIÓN.....	7
2.1. INFECCIONES FÚNGICAS INVASORAS. GENERALIDADES.....	7
2.2. FUSARIOSIS HUMANA.....	9
2.2.1. Biología del Género <i>Fusarium</i>	9
2.2.2. Epidemiología.....	10
2.2.3. Factores de riesgo para la Fusariosis.....	11
2.2.4. Espectro clínico de la Fusariosis.....	12
2.2.5. Colonización ambiental por <i>Fusarium</i> spp.....	16
2.2.6. Diagnóstico.....	18
2.2.7. Tratamiento.....	19
2.3. NUEVAS ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS.....	20
2.3.1. Generalidades.....	20
2.3.2. <i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E. Brown.....	21
3. JUSTIFICACIÓN.....	25
4. HIPÓTESIS.....	27
5. OBJETIVOS.....	28
5.1. OBJETIVO GENERAL.....	28
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28

6. MATERIALES Y MÉTODOS	29
6.1. Identificación de una colección de <i>Fusarium</i> spp.....	29
6.2. Ensayo de Inhibición del crecimiento micelial con aceites esenciales.....	30
6.2.1. Ensayos preliminares de ajuste de la concentración de cuatro quimiotipos de <i>L. alba</i>	31
6.2.2. Ensayo inhibición del crecimiento micelial de cuatro quimiotipos de <i>L. alba</i> para aislamientos de <i>F. solani</i> y <i>F. oxysporum</i>	32
6.3. Pruebas de susceptibilidad <i>in vitro</i> a Anfotericina B y Voriconazol.....	33
7. RESULTADOS	35
7.1. IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS.....	35
7.2. ENSAYOS DE INHIBICIÓN.....	45
7.2.1. Ensayos preliminares de ajuste de la concentración para cuatro quimiotipos de <i>L. alba</i>	45
7.2.2. Ensayos de inhibición con aceites esenciales de <i>L. alba</i> sobre cepas de <i>F. solani</i> y <i>F. oxysporum</i>	50
7.3. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD <i>IN VITRO</i>	59
8. DISCUSIÓN	61
9. CONCLUSIONES	66
10. BIBLIOGRAFÍA	67

1. RESUMEN:

Fusarium Link ex Fries es un género anamórfico, cosmopolita, que está conformado por 70 especies. Pueden actuar como saprófitos, ser agentes fitopatógenos, o patógenos para el hombre y los animales. Algunas especies de este género pueden producir micotoxicosis y micosis en el hombre.

Las micosis pueden ser superficiales, localizadas o diseminadas según la forma de infección y el estado inmunitario del hospedero. En los últimos años ha aumentado el número pacientes inmunodeprimidos gracias al avance de la medicina y con ellos han surgido nuevas enfermedades micóticas, a las que llamamos micosis emergentes, producidas por hongos ambientales oportunistas tales como *Fusarium* spp.

Para la identificación de las especies del género *Fusarium* se tuvieron en cuenta la morfología de sus macroconidios; la morfología y disposición de los microconidios; el tamaño de las fiálides y la presencia de clamidosporas. La especie más frecuentemente identificada fue *F. solani* seguida por *F. oxysporum* y en tercer lugar *F. verticillioides*. Una característica de este género es la elevada tasa de resistencia a los antifúngicos convencionales.

Las plantas medicinales son utilizadas desde hace muchos años como tratamiento para diferentes afecciones. Dentro de las varias clases de compuestos aislados de plantas con propiedades antimicrobianas, los aceites esenciales son un grupo reconocido por presentar actividad contra un gran número de microorganismos, incluyendo especies resistentes a los antibióticos y antifúngicos.

Lippia alba Mill N.E. Brown ex Britton & Wills. (familia *Verbenaceae*), es una planta medicinal autóctona de América, conocida en la Argentina con el nombre popular de "Salvia morada", cuyo aceite esencial contiene compuestos antimicrobianos. Una característica de *L. alba* es que la composición de su aceite varía según las

condiciones climáticas y ambientales de la región donde se originó la planta, lo que permite diferenciar varios quimiotipos.

Los quimiotipos Citral y Carvona de *L. alba* demostraron poseer efecto inhibitor del crecimiento micelial mayor al 90% en los aislados de *F. solani* y *F. oxysporum* provenientes de muestras clínicas. En cambio los quimiotipos Dihidrocarvona y Linalol a las concentraciones ensayadas produjeron inhibiciones del orden del 70%. Los cuatro quimiotipos provocaron un retardo en el crecimiento de aislados de *F. solani* y *F. oxysporum*.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. INFECCIONES FÚNGICAS EMERGENTES- GENERALIDADES:

Los hongos son un grupo heterogéneo de microorganismos eucariotas que existen desde hace millones de años y que interaccionan con el hombre de manera constante. Los resultados de dicha interacción son variados y comprenden una gama de situaciones que incluyen la colonización del hospedadero sin causar enfermedad hasta infecciones severas que conducen a la muerte de las personas que las padecen (1). Sólo una mínima proporción de hongos tiene capacidad para ser patógeno del ser humano. El conocimiento de los mecanismos patogénicos de los hongos, así como la respuesta del sistema inmunitario del hombre frente a la agresión fúngica, es la mejor herramienta para optimizar el manejo de las infecciones micóticas. Los hongos patógenos presentan diversos mecanismos de virulencia que potencian su capacidad invasora. Frente a la infección fúngica, el hombre se defiende utilizando diferentes estrategias. La primera barrera de defensa es la superficie corporal y el epitelio de las mucosas respiratoria, gastrointestinal y genitourinaria. Luego se produce el reconocimiento del hongo a través de distintos receptores y posteriormente la activación del sistema inmunitario adaptativo. En diferentes situaciones en la que los mecanismos de defensa se ven comprometidos, el hospedadero es más susceptible a padecer una infección fúngica localizada o invasora (2).

Las infecciones fúngicas invasoras son frecuentes en los pacientes inmunodeprimidos y en los internados en áreas de cuidados críticos. Estas infecciones causan una elevada mortalidad y morbilidad, así como un alto consumo de recursos humanos y económicos para su prevención, diagnóstico y tratamiento.

En las últimas dos últimas décadas la infección fúngica invasora ha aumentado considerablemente su incidencia (3). Este incremento se debe en parte a la existencia

de un mayor número de pacientes sometidos a tratamientos inmunosupresores o a terapias invasivas y por otro lado, a la mejora de los métodos diagnósticos microbiológicos y no microbiológicos, tales como la detección de antígenos fúngicos, tomografía computarizada de alta resolución, etc. que permiten detectar un mayor número de infecciones (4).

A pesar del diagnóstico precoz y del uso de nuevos antifúngicos, la infección fúngica invasora se asocia a tasas muy elevadas de morbimortalidad en los pacientes con hemopatías malignas o sometidos a trasplante de progenitores hematopoyéticos (1). Aunque los agentes etiológicos más frecuentes siguen siendo *Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus* (5), el número de especies capaces de causar este tipo de infecciones ha aumentado considerablemente (6). Entre ellas encontramos otras especies de los géneros *Candida* y *Aspergillus* y especies de los géneros *Fusarium*, *Trichosporon*, *Scedosporium* y del Orden Mucorales (7). Estos hongos constituyen un grupo de patógenos emergentes, ya que su recuperación a partir de muestras clínicas ha aumentado en los últimos años (8). Causan infecciones de difícil diagnóstico y tratamiento, ya que en general son microorganismos que no responden a los antifúngicos disponibles, por lo cual se asocian a una mayor mortalidad. En síntesis, aunque las infecciones fúngicas invasoras provocadas por hongos emergentes son poco frecuentes, su importancia reside en la agresividad de su comportamiento, en el grado de inmunosupresión del hospedadero en el que se asientan y en la escasa o nula respuesta clínica a la mayoría de los antifúngicos disponibles (9). El estado inmunitario del hospedero juega un papel muy importante en la protección frente a las micosis invasoras. La restauración de la inmunidad del paciente es fundamental para la prevención y el éxito del tratamiento de estas infecciones (10).

El tratamiento de elección combina el diagnóstico precoz, el uso simultáneo de varios antifúngicos y en algunos casos, la cirugía (11).

2.2. FUSARIOSIS HUMANA

2.2.1. Microbiología del Género *Fusarium*

Un género representativo de este grupo de hongos patógenos oportunistas emergentes es *Fusarium*, uno de los hongos más frecuentemente aislados del suelo e importante fitopatógeno (12,13).

Es un género anamórfico perteneciente a los ascomicetos del orden Hypocreales (clase Sordariomycetes) que agrupa a un gran número de especies (14). La mayoría de ellas son saprobias o parásitas de plantas, aunque también existen especies capaces de infectar humanos y animales (15,16).

Las especies del género *Fusarium* son cosmopolitas, están distribuidas en todo el mundo y pueden recuperarse de diversos sustratos, como granos de cereales, plantas, tierra, madera, materia orgánica en general, etc. (12). Hacia la década de los 70 se descubrió que algunas especies dentro de este género son capaces de producir micotoxinas, metabolitos secundarios que pueden ocasionar severas intoxicaciones en animales y humanos (17). Son hongos filamentosos, con hifas hialinas tabicadas que crecen rápidamente en medios de cultivo sin cicloheximida, por la cual resultan inhibidos. En agar papa glucosa (APG), producen colonias con micelio aéreo de diversos colores según la especie. Microscópicamente se caracterizan por producir macroconidios fusiformes y microconidios unicelulares, solitarios o en cadenas. Dependiendo de la especie pueden producir sólo macro o micro conidios o una combinación de ambos (13, 18).

El análisis filogenético molecular a nivel de especie reveló que las especies más comúnmente reportadas en la última década, tales como *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides* (= *F. moliniforme*), *F. incarnatum* (= *F. semitectum*), *F. chlamydosporum* y *F. dimerum*, actualmente representan complejos de especies que colectivamente suman aproximadamente 70 especies médicamente relevantes (19-21).

Se ha comprobado por análisis de secuenciación que los complejos de especies de *F. solani* (FSSC), *F. oxysporum* (FOSC) y el complejo *Gibberella fujikuroi* (GFSC) (donde se incluye *F. verticillioides*) (22), causan aproximadamente el 80% de todas las fusariosis humanas (23).

2.2.2. Epidemiología:

Las diversas especies del género *Fusarium* son ubicuas y están distribuidas en el suelo, las plantas y el aire. Son más comunes en zonas templadas y tropicales, pero también se las ha encontrado en zonas desérticas, alpinas y árticas (12). Algunas especies del género colonizan la garganta de adultos sanos, y puede colonizar los sacos conjuntivales, especialmente en ojos enfermos (24). El viento y la lluvia han sido citados como agentes de dispersión de especies del género *Fusarium* (25).

Las queratitis son, probablemente, el tipo más común de infección superficial causado por el género *Fusarium*. El hongo no puede invadir la córnea intacta sino que requiere de un traumatismo previo que favorezca su penetración o microabrasiones producidas por el uso de lentes de contacto (26). La problemática asociada a este tipo de infección, a diferencia de otros géneros, es el hecho de que la queratitis por *Fusarium* cursa con peor pronóstico por su rápida evolución y el escaso éxito terapéutico (27-29).

En pacientes gravemente inmunocomprometidos, estos hongos causan infección diseminada. Recientemente se posicionó como el segundo grupo de hongos filamentosos más comunes (luego de *Aspergillus* spp.) en pacientes con cáncer hematológico, en receptores de trasplante de órganos sólidos (30) y en receptores de trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (31). En esta última población de pacientes, la distribución de las fusariosis es bimodal, con picos observados antes y varias semanas después del injerto (32).

Se ha encontrado que los sistemas de agua de los hospitales pueden actuar como reservorios para *Fusarium* spp. La aerosolización de especies de *Fusarium* luego de la ducha fue documentada, por lo que se sugiere evitar esta práctica en pacientes gravemente inmunocomprometidos (33).

Actualmente, quizá por el mayor estudio de este grupo de hongos, ha aumentado mucho el reporte de onicomycosis e infecciones cutáneas crónicas y agudas por *Fusarium* spp. en pacientes inmunocompetentes. La paroniquia y otras infecciones dermatomycóticas ocasionadas por *Fusarium* spp., incluyendo la dermatitis en pacientes neutropénicos, requieren un control estricto y tratamiento, ya que puede ser la puerta de entrada del hongo al torrente sanguíneo con el consecuente aumento de las tasas de mortalidad (34-36).

2.2.3. Factores de riesgo para Fusariosis:

En los individuos inmunocompetentes el factor de riesgo más común es la ruptura tisular por un traumatismo o la presencia de un cuerpo extraño en un paciente colonizado. Estas infecciones usualmente son localizadas e incluyen queratitis pos traumatismo o en usuarios de lentes de contacto (27), onicomycosis, especialmente en personas que caminan descalzas, y raramente peritonitis en pacientes con diálisis peritoneal ambulatoria (37). La fusariosis diseminada en hospedero previamente sanos puede darse en los grandes quemados (13).

En los individuos inmunosuprimidos el factor de riesgo más importante es la neutropenia severa, especialmente en pacientes oncohematológicos, sumado a la colonización y la injuria tisular (31). En estos pacientes la presentación de la fusariosis es como infección diseminada. Más específicamente, son considerados factores de riesgo para la fusariosis diseminada además de la neutropenia prolongada y severa, la linfopenia, la enfermedad de injerto versus huésped (EICH), la terapia corticosteroidea

y otros tratamientos inmunosupresores, el trasplante de células hematopoyéticas, el mieloma múltiple y los receptores de injertos de donantes no relacionados (32).

Otro factor a tener en cuenta es la virulencia de la cepa infectante. Entre los factores de virulencia que presentan las especies del género *Fusarium* se encuentra la producción de micotoxinas tales como los tricotecenos, las cuales suprimen la inmunidad celular y humoral y pueden causar daño tisular. Además, estos microorganismos pueden adherirse a materiales protésicos formando biopelículas y producir proteasas y colagenasas (38).

En una revisión reciente, las infecciones fúngicas invasoras entre los receptores de trasplante de células madre, mieloma múltiple, y los receptores de un injerto de un donante no relacionado fueron significativamente asociadas con las infecciones por *Fusarium* spp. (39).

2.2.4. Espectro clínico de la Fusariosis:

Las especies de *Fusarium* pueden causar un amplio espectro de enfermedades en humanos, incluyendo micotoxicosis y micosis que pueden ser superficiales, localizadas o diseminadas (15). Las infecciones por *Fusarium* spp. se incluyen dentro de las hialohifomicosis, es decir micosis causadas por hongos filamentosos hialinos y septados, aunque también se usa el término Fusariosis para referirse a estas infecciones. Puede afectar un único órgano, producir infección asociada a cuerpo extraño e infecciones diseminadas. La forma clínica de la Fusariosis depende fundamentalmente del estado inmune del hospedero y de la puerta de entrada de la infección. Existe una fuerte correlación entre la reconstitución inmune y la recuperación clínica (40).

A continuación se detallan los grupos de patologías que pueden ser ocasionadas por hongos del género *Fusarium*, de acuerdo con el número de órganos afectados.

Invasión de un único órgano:

-Queratitis: es frecuente en países tropicales y se relaciona generalmente con traumatismo con material vegetal o de suelo. Además, es factor de riesgo la patología corneal previa y el tratamiento con esteroides o antibióticos tópicos (26, 41).

-Endoftalmitis: puede desarrollarse luego de una queratitis por *Fusarium* spp. o luego de traumatismo o cirugía (42).

-Onicomycosis: la presentación clínica más común es la onicomycosis proximal subungueal con o sin paroniquia, y onicomycosis blanco superficial. En pacientes inmunocomprometidos puede ser la puerta de entrada para una infección diseminada (32, 36, 38, 43).

-Infección cutánea: puede presentarse en forma de granulomas, úlceras, nódulos, micetomas, necrosis e intertrigo. En los pacientes inmunocompetentes, las lesiones son localizadas y generalmente se relacionan con un traumatismo previo, progresan lentamente y tienen buena respuesta al tratamiento. En cambio, en pacientes inmunocomprometidos progresa rápidamente, se disemina y generalmente no responden a la terapia antifúngica (36).

Fusariosis asociada a cuerpo extraño:

-Queratitis en usuarios de lentes de contacto: usualmente *Fusarium* spp. puede contaminar las soluciones para lentes de contacto o las propias lentes, especialmente si no se tienen los cuidados apropiados. En zonas ventosas, puede contaminar las lentes durante su uso, ya que las especies de este género pueden penetrar la matriz de las lentes de contacto blandas, las cuales contienen un alto porcentaje de agua en su estructura que favorece el desarrollo microbiano (29).

-Peritonitis en pacientes con diálisis peritoneal ambulatoria: insidiosa, con fiebre, dolor abdominal y disminución del flujo del drenaje debido a la presencia de *Fusarium* spp. que pueden obstruir o invadir el catéter (37).

-Fungemia asociada a catéter: el patógeno puede invadir un catéter venoso central provocando fungemia (44).

-Otras localizaciones: otitis (45), osteomielitis (46), y sinusitis (47).

Infección diseminada:

La infección diseminada ocurre más comúnmente en pacientes con malignidades hematológicas y ocasionalmente en pacientes con quemaduras extensas (31).

Las especies de *Fusarium* más comúnmente implicadas como patógenos incluyen *F. solani*, *F. oxysporum* y *F. verticillioides*. Suele presentarse con fiebre persistente refractaria a los agentes antibacterianos y antifúngicos. También puede incluir sinusitis, infección rinocerebral, celulitis en el sitio de injuria tisular, endoftalmítis, lesiones dolorosas en piel, neumonía, miositis e infecciones del sistema nervioso central. Casi todos los órganos pueden ser afectados, pero el más frecuentemente involucrado es la piel, seguida por los pulmones (40).

Se pueden observar tres tipos de lesiones cutáneas: múltiples y dolorosas, nódulos subcutáneos y lesiones tipo ectima. Menos comúnmente se observan bullas o lesiones tipo "diana" que consisten en una lesión tipo ectima rodeada por un fino anillo eritematoso. Algunas de esas lesiones representan diferentes estados de evolución de las mismas lesiones (48).

Los pacientes con afectación pulmonar presentan dolor pleural, fiebre, tos y hemoptisis indistinguible de una aspergilosis pulmonar. A diferencia de la aspergilosis, la infección por *Fusarium* spp. se asocia con lesiones cutáneas y subcutáneas, y con hemocultivos positivos.

En los pacientes sometidos a trasplante de órganos sólidos, las infecciones por *Fusarium* spp. tienden a ser más localizadas, ocurren luego del trasplante y evolucionan mejor que en los pacientes con trasplante de precursores hematopoyéticos o con cáncer hematológico (49).

En una revisión de fusariosis cutánea en pacientes inmunocomprometidos, se observó que es más prevalente en los pacientes neutropénicos que en los no neutropénicos; y en aquellos con lesiones diseminadas en piel suele haber fungemia por *Fusarium* spp. (36).

Las lesiones en piel se observan prácticamente en todas partes del cuerpo, con predominio de las extremidades. Estas lesiones evolucionan rápidamente, generalmente en unos pocos días (1 a 5), entonces puede observarse en un mismo paciente lesiones en distinto grado de evolución, encontrando una combinación de pápulas, nódulos y lesiones necróticas; usualmente con mialgias que sugieren compromiso muscular. Los tipos de lesiones en piel, no se asocian a una especie particular de *Fusarium* (32).

Micotoxicosis:

Otra forma en que las especies del género *Fusarium* pueden afectar la salud humana es por la producción de micotoxinas. La micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos que se originan en la fase estacionaria del crecimiento de algunos hongos, entre ellos los géneros *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium* (50).

Micotoxicosis es el nombre que se da al grupo de enfermedades originadas en el hombre y los animales por la ingesta de micotoxinas.

La micototoxicosis puede ser primaria, por consumo de granos o frutos secos contaminados con hongos, o secundaria, por consumo de productos cárnicos, leche o huevos provenientes de animales que consumieron alimentos contaminados. El género *Fusarium* puede producir varios grupos de micotoxinas: grupo de la Zearalenona (ZEA) y sus derivados; el grupo de los Tricotecenos A y B entre los que se encuentran el Deoxinivalenol (DON) y Nivalenol (NIV), y el grupo de las Fumonisinias (51).

Estos compuestos pueden actuar en diferentes pasos de la respuesta inmune. Esto tiene como consecuencia un aumento en la susceptibilidad a las infecciones, la

reactivación de infecciones crónicas y la disminución de la eficacia de vacunas o drogas, por mecanismos que aún necesitan estudiarse para su completo entendimiento. Otros mecanismos en estudio son su efecto carcinogénico, neurotóxico, teratogénico, estrogénico, hepatotóxico, nefrotóxico, cardiotóxico, y su relación con el cáncer de esófago. Los órganos afectados son: cerebro, pulmón, hígado, riñón y corazón (52).

2.2.5. Colonización del ambiente hospitalario por *Fusarium* spp:

Los hongos oportunistas son una causa de creciente importancia de infecciones nosocomiales; tienden a ser resistentes a los antifúngicos y se asocian a fallo terapéutico. Existen reservorios de estos hongos en el ambiente hospitalario. La identificación de tales reservorios, permite tomar medidas de control de infecciones más eficaces.

Uno de los reservorios más importantes de *Fusarium* spp. es el sistema de distribución de agua de los hospitales. Hay estudios que asocian el aislamiento de especies de *Fusarium* en los sistemas de distribución de agua potable en hospitales con la ocurrencia de epidemias de fusariosis diseminada en pacientes oncohematológicos internados en una unidad de cuidados intensivos (33).

En estos estudios se demostró que los sistemas de agua funcionan como reservorios de hongos oportunistas, particularmente de *F. solani* y *F. oxysporum*; que cepas genéticamente diversas de *F. solani* pueden contaminar los sistemas de agua; que las cepas pueden persistir por años en los sistemas de agua; que el agua puede diseminar estos microorganismos por aerosolización en duchas y lavatorios; y que los aislamientos de especies de *Fusarium* recuperados de los sistemas de distribución de agua pueden causar infecciones nosocomiales. Se observó que las especies de *Fusarium* recuperadas eran resistentes a los niveles de clorinación normal del agua potable (media, 0,3 ppm de cloro). También se asoció la recuperación de *Fusarium*

spp. en la vecindad del agua corriente a la ocurrencia de la infección senopulmonar en la fusariosis, sugiriendo que la aerosolización de las fuentes de agua puede ser responsable de la enfermedad; y la celulitis por *Fusarium* spp. en miembros inferiores, a pacientes expuestos a *Fusarium* spp. durante la ducha (53). Sobre la base de estos estudios se hicieron recomendaciones a los hospitales donde se registran casos de fusariosis de revisar sus sistemas de distribución de agua en busca de la presencia de hongos filamentosos. Si se recuperan tales hongos del sistema de agua, en estos hospitales se indica evitar o minimizar la exposición de pacientes inmunodeprimidos al agua corriente, proporcionando agua estéril (hervida) para beber y evitar ducharse durante la inmunosupresión grave debido al riesgo de infectarse por aerosolización de conidios. Se recomiendan baños de cama, siempre con esponjas estériles descartables en lugar de la ducha.

Se necesitan estudios adicionales para comprender mejor la epidemiología de la fusariosis nosocomial (33).

Estudios previos sugieren que la presencia de biopelículas o biofilms de *Fusarium* spp. en las cañerías pueden funcionar como fuente de infecciones intrahospitalarias o de la comunidad. Además de su distribución mundial en los sistemas de distribución de agua, *Fusarium* spp. pueden colonizar, formando biopelículas, otros materiales como jabones, pintura, lubricantes de maquinaria pesada, bebidas de vegetales pasteurizadas, etc. Las biopelículas facilitan la interacción entre *Fusarium* spp. y otros microorganismos presentes en las cañerías formando comunidades con características metabólicas particulares, que incluyen la degradación de la queratina y otros compuestos refractarios (54).

Se observó que los miembros del complejo de especies de *F. solani* que causan infecciones en humanos y en las plantas son los que se encuentran en mayor proporción en su entorno. Esto sugiere que las infecciones ocurren por el encuentro azaroso del hospedero susceptible con el miembro más prevalente en su medio ambiente (55).

2.2.6. Diagnóstico de Fusariosis

En los pacientes con inmunosupresión grave debe sospecharse fusariosis diseminada, especialmente si se reporta fungemia por hongos filamentosos o si se observa celulitis de dedos de pies o manos, lesiones cutáneas o subcutáneas. La piel es la fuente de diagnóstico más importante y en muchos casos, es la única fuente diagnóstica. Generalmente, las lesiones en piel preceden a la fungemia con una media de 5 días (rango de 1 a 10 días), aunque también pueden aparecer luego de la fungemia. El examen histopatológico de las lesiones en piel muestra hifas hialinas ramificadas en ángulo agudo, septadas que invaden la piel y se extienden a los vasos sanguíneos, con trombosis y necrosis en aquellos pacientes con lesiones metastásicas (36).

A diferencia de la aspergilosis diseminada, la fusariosis diseminada puede diagnosticarse por hemocultivos positivos en el 40% de los casos. La positividad de los hemocultivos asciende al 60% en presencia de lesiones diseminadas en piel, aunque la fungemia es extremadamente rara en pacientes con lesiones únicas en piel (15).

Así como en la aspergilosis, los hallazgos radiológicos de la infección pulmonar por *Fusarium* spp. comprenden un rango que va desde infiltrados inespecíficos, lo más común, hasta lesiones nodulares o cavitarias.

En los estudios histopatológicos, las hifas de *Fusarium* spp. se asemejan a las de *Aspergillus* spp.; son hifas hialinas, septadas y de 3-8 μm de diámetro. Tienen ramificaciones típicas en ángulos agudos o rectos. En ambos casos, se observan elementos fúngicos alrededor y dentro de los vasos sanguíneos, lo cual resulta en trombosis y necrosis del tejido.

El diagnóstico definitivo de fusariosis requiere el aislamiento de *Fusarium* spp. de los especímenes clínicos (sangre, piel, senos, pulmones, etc.). La identificación de los cultivos a nivel de especie es importante porque histopatológicamente *Fusarium* spp. no pueden diferenciarse de otros agentes de hialohifomicosis y cada aislamiento presenta diferente sensibilidad antifúngica (31).

2.2.7. Tratamiento:

En la enfermedad localizada, la rápida instauración del tratamiento impide la progresión de la misma e incluye el debridamiento quirúrgico y tratamiento antifúngico sistémico (31).

En el caso de la fusariosis diseminada, el tratamiento óptimo todavía no está claro. La fusariosis invasora supone un desafío para los médicos infectólogos ya que, exceptuando algunos éxitos limitados, la mayoría de las especies presentan altos niveles de resistencia a todos los antifúngicos disponibles. Generalmente se recomienda una terapia inicial con voriconazol o anfotericina B liposomal (56). Aunque en general, la respuesta de *Fusarium* spp. al tratamiento es muy pobre y depende de las especies involucradas, siendo *F. solani* la especie más resistente, al menos *in vitro* (57, 58).

Recientes estudios utilizando análisis de secuencias multilocus demostraron que bajo los nombres genéricos de *F. solani* y *F. oxysporum*, existen varias especies filogenéticamente diferentes, lo cual indica que el género presenta una alta diversidad genética. A pesar de su diversidad, presentan un comportamiento homogéneo en cuanto a su pobre respuesta a los antifúngicos (55).

En general, todas las drogas presentan altos valores de concentración inhibitoria mínima (CIM). La anfotericina B fue la droga más activa, aunque su CIM generalmente fue mayor a 1 µg/ml; seguida por voriconazol. *F. solani* fue la especie más resistente del género (59). En los casos de pacientes neutropénicos con terapia corticosteroidea, la supervivencia es prácticamente nula, aunque el tratamiento sea agresivo (21, 40, 60).

2.3. NUEVAS ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS:

2.3.1. Generalidades:

El aumento de la resistencia fúngica a las drogas clásicas, sus acciones indeseadas y el alto costo de los tratamientos, impulsó la investigación de nuevas estrategias de control de las infecciones (61). El desarrollo de nuevos antifúngicos se basa en la exploración de diferentes fuentes de compuestos bioactivos.

El uso de plantas en los tratamientos de infecciones ha sido reportado a lo largo de la historia humana. Dentro de las varias clases de compuestos aislados de plantas con propiedades antimicrobianas, los aceites esenciales son un grupo reconocido por presentar actividad contra un gran número de microorganismos, incluyendo especies resistentes a los antibióticos y antifúngicos (62).

Un aceite esencial se define como la fracción química de un vegetal que es arrastrada por vapor de agua, volátil, formada mayoritariamente por compuestos de naturaleza terpenoide y que generan el olor característico de ese vegetal (63).

Son mezclas complejas de muchos componentes y su efecto antimicrobiano se atribuye a la presencia de fenoles, alcoholes y monoterpenos oxigenados (64-66).

La Organización Mundial de la Salud en 1978 definió a las plantas medicinales como aquellas que en uno o más de sus órganos contienen sustancias que pueden ser utilizadas con finalidad terapéutica o que son precursores para la semisíntesis químico-farmacéutica. Las plantas aromáticas son plantas medicinales que sintetizan y acumulan aceites esenciales (63).

La popularidad de las plantas medicinales y aromáticas ha crecido considerablemente en los últimos años a partir de su uso como hierbas medicinales, suplementos alimenticios, su utilización en perfumería y cosmética, aromaterapia y extractos para la elaboración de nuevas drogas. Es a partir de 1970 que Europa Occidental vuelve a buscar en los vegetales las sustancias químicas con las cuales curar enfermedades,

elaborar cosméticos y perfumes, y obtener nuevos productos para el hogar y para las industrias de bebidas y alimentos, luego de décadas apostando a la química industrial y sintética. Los cultivos de plantas aromáticas aportan materia prima para dichos productos y de ahí el creciente interés por su conocimiento (67).

Muchas especies vegetales producen aceites esenciales que juegan un papel importante en los mecanismos de defensa de la planta contra fitopatógenos. Se ha demostrado que algunos aceites esenciales tienen efecto fungicida, con la ventaja de que son inocuos para el medio ambiente y para los consumidores. La necesidad de reducir el uso de químicos sintéticos en la agricultura ha llevado a la experimentación con aceites esenciales para el control de fitopatógenos con buenos resultados (68).

Las plantas medicinales representan una alternativa terapéutica para diversas afecciones del ser humano y animales especialmente en países en vías de desarrollo. En nuestro país se utilizan frecuentemente plantas medicinales autóctonas pero existen pocos estudios farmacológicos experimentales y clínicos y por lo tanto poca bibliografía disponible (69-71).

2.3.2. *Lippia alba*

La planta *L. alba* Mill N.E. Brown ex Britton & Wills. (familia *Verbenaceae*), es un subarbusto aromático que está ampliamente distribuido y crece espontáneamente en América Central y del Sur. Es conocida también por sus nombres populares “Pronto alivio” (Colombia), “Erva cidreira” (Brasil), “Salvia morada” (Argentina) y “Quita dolor” (Cuba), entre otros (72).

Es una hierba perenne, erecta, algunas veces arbusto o subarbusto, crece hasta 2 m y presenta un fuerte olor a limón, lima o menta. Crece en alturas de hasta 1800 m.s.n.m. y se puede encontrar en climas cálido húmedos, cálido secos y templados. Se desarrolla en regiones con temperaturas de hasta 32°C, con alta intensidad

lumínica. Debido a su rusticidad responde a diversos tipos de suelos como arcillosos y limosos con pH de 5-6. Esta distribución tan amplia condiciona a la planta a presentar una gran variabilidad genética, con el propósito de ocupar los diversos hábitats naturales disponibles, situación que lleva a su adaptación a las diversas regiones biogeográficas de América. La presencia de biotipos en diversas regiones de América, contribuye a que la especie se adapte con mayor facilidad a las condiciones reinantes en cada sitio, variando a su vez el contenido de aceites esenciales o de metabolitos secundarios en sus órganos, según el origen de la planta. Precisamente, la presencia de biotipos de *L. alba*, con características propias en América, que presentan diferencias morfológicas distintivas, se correlaciona con variaciones en el contenido de los aceites esenciales. Esto permite que los biotipos sean agrupados en quimiotipos dependiendo de la composición química de sus aceites esenciales. En la medicina popular se utilizan comúnmente los extractos e infusiones a partir de sus hojas, para el tratamiento de diversas afecciones de las vías respiratorias, fiebre y problemas digestivos entre otros (73-75).

Se han encontrado diferencias cuantitativas en la composición de los aceites esenciales. Además de presentar quimiotipos claramente definidos, *L. alba*, presenta variaciones en los componentes principales de sus aceites esenciales. Estas pueden deberse a diferencias climáticas (temperatura, luminosidad, humedad relativa), edáficas (características del suelo tales como estructura, composición, pH, humedad, etc.) y geográficas en las regiones en las que se hayan distribuidos los quimiotipos (76).

Tanto la composición cualitativa como cuantitativa de los componentes principales de los aceites esenciales son de gran interés ya que tendrán una gran influencia en el desarrollo industrial y en su posible utilización.

Recientemente, se ha sugerido una clasificación simplificada de los quimiotipos descritos para esta especie, basada en criterios como la identidad del o de los

constituyentes mayoritarios y a la presencia de compuestos minoritarios (que representen al menos 5% del total del aceite) pero característicos (77).

Siete quimiotipos principales han sido identificados dentro de *L. alba* (Tabla N° 1):

Tabla N° 1: Quimiotipos de *L. alba*: sus principales componentes y distribución en Argentina.

QUIMIOTIPO	COMPONENTE MAYORITARIO	EN ARGENTINA
1	1a Citral	Chaco
	1b Linalol	
	1c Citral/Linalol según la estación	Chaco
	1d β -cariofileno	
2	Tagetenona	Corrientes
3	3a Limoneno y Carvona	Entre Ríos
	3b Limoneno y Dihidrocarvona	
	3b Limoneno y Piperitona	
	3b Limoneno y Lippiona	
4	Mirceno	Corrientes
5	γ -terpineno	
6	Alcanfor y 1,8-cineol	
7	Estragol	

El aceite esencial de *L. alba* se caracteriza por poseer una composición muy variable (Tabla N° 1), dependiendo del lugar de su procedencia (ver Tabla N° 1) (79, 80).

La hierba nativa *L. alba*, es una especie promisoriosa ya que se utiliza actualmente en diversos países con propósitos medicinales y se verificó que el aceite esencial obtenido de sus hojas presenta actividad *in vitro* contra algunos patógenos como *Trichophyton mentagrophytes*, *C. albicans*, *Neurospora crassa* (81) y también contra ciertos hongos fitopatógenos como *Dreschlera oryzae* y *F. moniliforme* (= *F. verticillioides*) (82).

En otros estudios se demostró el poder antifúngico *in vitro* de los quimiotipos limoneno y Carvona frente a cepas de *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *A. fumigatus* y *A. flavus* (83).

También existe evidencia de la actividad antimicrobiana *in vitro* del aceite esencial de *L. alba* sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium smegmatis* y *C. albicans* (84).

En otros trabajos se demuestra efecto antimicrobiano sobre cepas de *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Salmonella typhi* (85).

3. JUSTIFICACIÓN:

Las enfermedades micóticas han tomado relevancia en estos últimos años. Las tasas de incidencia las colocan como un problema de salud pública en todo el mundo, con un incremento creciente en las poblaciones más pobres, en los ancianos, en las personas inmunosuprimidas y en las receptoras de trasplantes de órganos (3, 59).

La fusariosis diseminada constituye una causa de morbimortalidad importante en pacientes oncohematológicos y receptores de trasplante de médula ósea con neutropenias prolongadas constituyendo una enfermedad micótica nosocomial de importancia (6).

En hospederos inmunocompetentes la infección por *Fusarium* spp. puede llevar a la pérdida de la visión en forma permanente por queratitis pos traumática (26).

La complejidad de estas infecciones radica principalmente en la poca actividad que tienen los antifúngicos conocidos sobre especies del género *Fusarium* (21, 57, 58). Esto dificulta el tratamiento, siendo en ocasiones una infección letal o altamente incapacitante. Por otro lado, al ser un hongo ubicuo, su control ambiental es muy difícil. El número de compuestos antifúngicos disponibles para tratar estas micosis es muy reducido y la eficacia de éstos es limitada (86).

El pobre éxito terapéutico puede deberse a la falta de técnicas que permitan un diagnóstico precoz, a la toxicidad y a las limitaciones que presenta la dosificación de algunos fármacos como la anfotericina B, y a la aparición de cepas con resistencia secundaria a los antifúngicos o de especies con resistencia intrínseca (87).

El aceite esencial de *L. alba* constituyen un recurso accesible debido a que el cultivo de la planta es sencillo, económico y tiene bajo impacto ambiental; es una planta rústica, resistente a las condiciones climáticas de la región pampeana de la República Argentina y permite obtener gran cantidad de materia prima.

En la Argentina hay muy pocos estudios sobre el efecto antifúngico de aceites esenciales sobre aislamientos de *Fusarium* spp. provenientes de muestras clínicas. Por lo anteriormente expuesto, este trabajo plantea la posibilidad de buscar en los aceites esenciales de plantas nativas, alternativas terapéuticas naturales, eficientes, ecológicas y económicas que brinden más y mejores opciones para controlar las infecciones micóticas causadas por diversas especies del género *Fusarium* en humanos.

Existiendo antecedentes que confirman las propiedades medicinales atribuidas al aceite esencial de *L. alba* (82, 83), y por tratarse de una planta autóctona de América se desea realizar un estudio que evalúe el efecto antifúngico *in vitro* sobre el crecimiento micelial de distintos aislados de *Fusarium* spp.

4. HIPÓTESIS:

El aceite esencial de *L. alba* tiene actividad antifúngica *in vitro* frente a *Fusarium* spp. aislados de muestras clínicas.

5. OBJETIVOS:

5.1. Objetivo general:

-Evaluar la actividad antifúngica *in vitro* de aceites esenciales de plantas medicinales.

5.2. Objetivos Específicos:

-Identificar a nivel de especie una colección de aislados del género *Fusarium* recolectados de pacientes hospitalarios para determinar las especies predominantes.

-Evaluar la capacidad inhibitoria *in vitro* de diferentes quimiotipos y concentraciones del aceite esencial de *L. alba* sobre el crecimiento micelial de aislados de especies del género *Fusarium* provenientes de pacientes hospitalarios.

6. MATERIALES Y MÉTODOS:

6.1. Identificación de una colección de *Fusarium* spp. :

Se realizaron cultivos monospóricos de una colección de 75 aislados identificados como *Fusarium* spp. provenientes de 55 pacientes que concurren al Hospital Interzonal General de Agudos Dr. R. Rossi de la ciudad de La Plata, Buenos Aires, Argentina y 18 pacientes que concurren al Hospital de Enfermedades Infecciosas Francisco Muñiz, de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina durante el período comprendido entre Julio de 2007 y Diciembre de 2014.

Los aislamientos provenían de dos tipos de pacientes: (i) pacientes de consultorio externo, inmunocompetentes, que presentaban onicomycosis y lesiones en la córnea y (ii) pacientes inmunocomprometidos internados en la Unidad de Trasplante de Médula Ósea (UTMO). En el segundo caso, las muestras fueron obtenidas de lesiones en piel, hisopados nasales, reservorios de catéter o hemocultivos.

Los cultivos monospóricos se obtuvieron mediante diluciones sucesivas y cultivo en agar agua (12). El mantenimiento de los aislamientos monospóricos obtenidos se llevó a cabo en viales con aceite mineral y otros con agua destilada estéril a 4° C (88).

Para la identificación de las especies de *Fusarium* la totalidad de la colección de cultivos fue repicado en Agar Papa Glucosa al 2% (12) preparado artesanalmente en el laboratorio (APGL) con el agregado de 0,25% de cloranfenicol e incubado en estufa a 22°C +/- 2° C durante 7 días. Se realizó la caracterización morfo-biométrica y cultural convencional, considerando fundamentalmente la ontogenia conídica de acuerdo a las descripciones de Booth (12) y siguiendo los lineamientos de Leslie y Summerell (14).

Se tuvieron en cuenta las siguientes características:

- velocidad de crecimiento (diámetro de la colonia a los 4 días de la siembra);
- presencia o ausencia de pigmentos, color del anverso, color del reverso y textura de la colonia;
- densidad del micelio;
- formación de esporodoquios, pionnotes;
- características de las macroconidias (presencia o ausencia de ellas, tamaño, número de septos, forma de la célula pie, forma de la célula apical);
- características de las microconidias (cantidad, tamaño, disposición en cabezas húmedas o en cadenas);
- características de las fiálides (longitud, presencia o ausencia de septo);
- características de los clamidosporas (presencia o ausencia de ellas, disposición intercalar o terminal, textura, forma).

6.2. Ensayo de inhibición del crecimiento micelial con aceite esencial de *L. alba*:

Se utilizaron cuatro quimiotipos del aceite esencial de *L. alba*: Carvona, Citral, Dihidrocarvona y Linalol provistos por la Cátedra de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata. Estos quimiotipos fueron obtenidos de ejemplares de *L. alba* cultivados en la Estación Experimental Julio Hirschhorn perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata (34° 52' S y 57° 58' W).

Las plantas provinieron de estacas de diversos lugares: quimiotipo Carvona, de la Amazonia peruana, en Iquitos, Perú; quimiotipo Dihidrocarvona de la costa del Río Paraná, frente a la ciudad de Santa Fé, Argentina; quimiotipo Linalol de una estación forestal en Montevideo, Uruguay; y quimiotipo Citral de jardines ornamentales de La Plata, Argentina (Ringuelet J, com. pers.).

La extracción fue realizada por el método de hidrodestilación. Los quimiotipos obtenidos en cada caso fueron secados sobre sulfato de sodio anhidro y almacenados en un recipiente ámbar a temperatura ambiente para su posterior uso. Luego se alicuotaron en frascos de 15 ml al 10% en propilenglicol (Sigma Chemical Co.) como emulsionante, obteniendo una concentración final de 100.000 ppm (89).

6.2.1. Ensayos preliminares de ajuste de la concentración para cuatro quimiotipos de *L. alba*:

Para encontrar el rango de las concentraciones más adecuadas para trabajar con *L. alba* y las especies fúngicas, se realizaron dos ensayos preliminares con los cuatro quimiotipos de *L. alba* (68, 90).

Se seleccionaron al azar tres aislados de la colección, que posteriormente fueron identificados dos como *F. oxysporum* y uno como *F. solani*, para evaluar si se inhibía el crecimiento micelial al sembrarlos en medio de cultivo Agar Papa Glucosado comercial (Britania®) (APGC) con el agregado de cada uno de los cuatro quimiotipos de *L. alba* a una concentración de 1000 ppm partiendo siempre del mismo extracto. Esta concentración fue elegida tomando como referencia antecedentes bibliográficos donde se evaluó el efecto antimicrobiano de distintos aceites esenciales (61, 64-66). Se utilizó APGC por tratarse de un medio de cultivo estándar. Se realizó un segundo ensayo de ajuste variando las concentraciones para cada quimiotipo de *L. alba* evaluado.

En los ensayos preliminares de ajuste de concentración se empleó el mismo método que en el ensayo de inhibición que se describe a continuación (sección 6.2.2.).

6.2.2. Ensayo inhibición del crecimiento micelial de cuatro quimiotipos de *L. alba* para aislados de *F. solani* y *F. oxysporum*:

Para evaluar la capacidad inhibitoria *in vitro* de los diferentes quimiotipos y concentraciones del aceite esencial de *L. alba* sobre el crecimiento micelial de aislados de especies del género *Fusarium* se empleó como medio de cultivo APGC. Los distintos quimiotipos de *L. alba* (Carvona, Citral, Dihidrocarvona y Linalol) a una concentración de 100.000 ppm se incorporaron a 200 ml de medio de cultivo APGC, previamente esterilizado y enfriado a 45° C, en cantidades determinadas (500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500 y 4000 µl) para obtener las concentraciones finales deseadas (250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750 y 2000 ppm) respectivamente y las mezclas se homogeneizaron en agitador magnético. Cada quimiotipo fue adicionado por separado para alcanzar las concentraciones deseadas según el quimiotipo y la especie a ensayar. Finalmente se dispuso en cajas de Petri estériles, a razón de 9 ml de medio de cultivo por caja. Luego de la solidificación de los medios de cultivo, se transfirieron a las placas los aislados de *Fusarium* spp. mediante un trozo de colonia de 0,5 cm de diámetro obtenido con un sacabocado. Todos los fragmentos de colonia se obtuvieron de la zona periférica de colonias provenientes de cultivos monospóricos luego de 7 días de incubación. Como testigo se usó medio de cultivo sin el agregado del aceite esencial. Se incubaron las placas en estufa a 25° C por siete días, tiempo en el que el crecimiento fúngico en las placas control cubrió completamente la superficie del medio. El crecimiento micelial (diámetro de la colonia) fue medido con un vernier cada dos días, tomando dos diámetros perpendiculares entre sí y promediando los valores que se registraron en una tabla. El ensayo se realizó por triplicado.

Se evaluó el crecimiento micelial tomando medidas cada dos días del diámetro de la colonia en cada tratamiento durante siete días.

Luego de observar el desarrollo de los aislados sometidos a las condiciones establecidas, se midió el halo de crecimiento obtenido al día 7 en cada caso. Para cada quimiotipo y concentración se midió el diámetro de crecimiento micelial de las placas sin agregado de aceite esencial (Placa de Control de Crecimiento) y se hizo un promedio entre las tres repeticiones, luego se midió el diámetro de crecimiento micelial de las placas con el agregado de cada quimiotipo del aceite esencial (3 placas para cada concentración y para cada quimiotipo) y se hizo un promedio entre esos tres valores. Luego se calculó el porcentaje de Inhibición en cada caso de acuerdo a la fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = [DC \text{ (cm)} - DQ \text{ (cm)} / DC \text{ (cm)}] \times 100$$

DC: diámetro de crecimiento micelial en la placa control sin agregado de aceite esencial.

DQ: diámetro de crecimiento micelial en la placa con el quimiotipo de aceite esencial, incorporado al medio agarizado.

Se estableció la actividad antifúngica determinando la CIM, definida como la concentración más baja de aceite capaz de inhibir el crecimiento visible en agar (100% de inhibición). La CIM se calculó a partir de los valores obtenidos para los porcentajes de inhibición de las concentraciones evaluadas para cada uno de los modelos biológicos (quimiotipo y aislado fúngico).

Análisis estadístico: se realizó análisis de la varianza (ANOVA) entre las medias de los porcentajes de inhibición de cada uno de los tratamientos. Para estabilizar la varianza de estos datos y ajustarlos a una distribución normal, los mismos se transformaron usando la función arcoseno de la raíz cuadrada de la probabilidad. Las

medias fueron comparadas usando Tukey ($p \leq 0,05$). Para todas las combinaciones de parámetros se llevaron adelante análisis de correlación de Pearson con $\alpha = 0,05$.

6.3. Pruebas de sensibilidad *in vitro* para la anfotericina B y para el voriconazol

Con el objetivo de evaluar el comportamiento de los aislados utilizados frente a antifúngicos de uso comercial recomendados para el tratamiento de la fusariosis, se decide realizar la determinación de la CIM a la anfotericina B y el voriconazol.

A los aislados seleccionados de la colección de cultivos se les determinó la sensibilidad *in vitro* a la anfotericina B (Sigma, Chemical Co.) y al voriconazol (Pfizer, Buenos Aires, Argentina) por dos métodos:

Método de Microdilución: se determinó la CIM de las cepas de *Fusarium*, por el método de microdilución en medio líquido, siguiendo las normativas del Documento M38-A2: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi del Clinical Laboratory Standad Institute (CLSI). Se usó el medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma Chemical Co.) tamponado con 0.165 M de ácido morfolinopropanosulfónico (MOPS) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) ajustado a pH 7.0. Las placas con antifúngicos voriconazol y anfotericina B se prepararon de acuerdo a las normas del mencionado Documento (91).

Método de difusión: se realizó la preparación de los inóculos de acuerdo a las normas del Documento M51-A: Method for Antifungal Disk Difusión Susceptibility Testing of Non dermatophyte Filamentous Fungi del Clinical Laboratory Standad Institute (CLSI) (92). Se empleó el medio de cultivo agar Mueller Hinton (MH) y se utilizaron las tiras con gradiente de concentración de antifúngicos Etest® (bioMérieux, Marcy L`Etoile, Francia) de voriconazol y anfotericina B. El uso de MH como medio de cultivo tiene

alta grado concordancia con el método de referencia. Por esta razón se considera como una buena opción para la realización del Etest®, como fue demostrado por otros autores. Es un medio de fácil preparación, económico que se adapta al trabajo en un laboratorio hospitalario (93-97).

Se realizaron repiques de los aislados en agar papa glucosa APGC, se incubaron 72 h. a 37°C y a 28° C hasta completar 7 días de incubación.

Los inóculos (suspensión de conidios) se prepararon en solución salina estéril, y se ajustaron a una D.O. de 0,15 a 0,17 a 530 nm midiendo en Espectrofotómetro, lo que equivale a un inóculo de 0.4×10^4 a 5×10^4 UFC/ml.

Se realizaron las lecturas luego de 48 h de incubación a 37° C.

Cepas control: se utilizó en todos los casos el *Paecilomyces variotii* MYA-3630

La CIM fue definida como la menor concentración de antifúngico a la cual se logra la inhibición total del crecimiento (100%).

Para los hongos filamentosos, el CLSI no tiene definidos puntos de corte clínicos ni epidemiológicos para especies de *Fusarium*. Sólo se han establecido valores de corte con fines analíticos (91).

7. RESULTADOS:

7.1. Identificación de los aislados de *Fusarium* spp.

Para la identificación de los aislados de *Fusarium* spp. a nivel de especie, fue apropiada la utilización del medio de cultivo APGL con el agregado de 0,25% de Cloranfenicol, preparado artesanalmente en el laboratorio con ingredientes crudos según lo sugerido por Booth (12) y Nelson y col. (98). Se observaron las características culturales y morfológicas diferenciales de cada especie necesarias para la identificación tales como producción de pigmentos, pionnotes y aspecto del micelio como así también ontogenia conídica según las descripciones de Leslie y Summerell (14) y Booth de 1971 (12) (Figura N° 1).

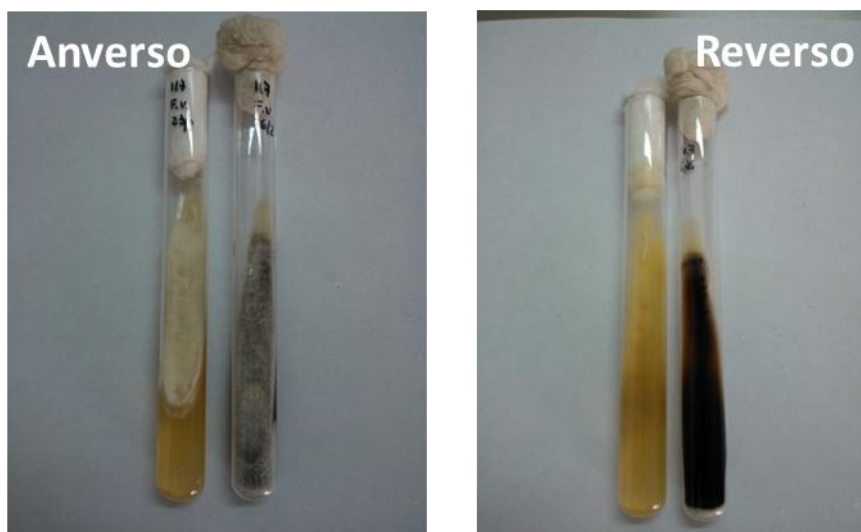


Figura N° 1: Observación de las características culturales de aislados de *Fusarium* spp. en medio de cultivo comercial y artesanal. Cultivo de *F. verticillioides* en APG comercial (derecha) y APG artesanal (izquierda) donde se observa la producción de pigmentos sólo en el medio preparado artesanalmente. El aspecto del micelio también se ve modificado por el medio.

Identificación de las especies de la colección de *Fusarium* spp.

Se observó que los aislados del género *Fusarium* produjeron colonias con abundante micelio aéreo de colores variados, blanco, rosado, violeta, púrpura, crema, con presencia de pústulas estromáticas de color violeta oscuro y pionnotes de colores vivos (naranja, verde azulado, avellana) etc., según la especie.

En las observaciones microscópicas de los cultivos se encontró que el micelio está formado por hifas hialinas, septadas con fiálides que pueden ser simples o ramificadas, donde se observaron microconidios formando agrupaciones denominadas “falsas cabezas” o dispuestos en cadenas largas.

Se observó gran variabilidad en el aspecto del micelio en especímenes de la misma especie.

Una de las características más notables de las observaciones microscópicas de las especies estudiadas es la presencia de dos tipos de conidios: microconidios y macroconidios. Se observaron microconidios pequeños, unicelulares y de forma elipsoidal. Se observó que los macroconidios tenían mayor tamaño, eran fusiformes y septados (presentaron entre 1 y 9 septos). Se encontraron los macroconidios formando parte de estructuras especializadas llamadas esporodoquios o pionnotes.

De la colección obtenida se identificaron 45 aislados pertenecientes a *F. solani* complex, 24 a *F. oxysporum* complex y 4 a *F. verticillioides*. Sus características principales son:

Complejo de especies *Fusarium solani*:

Características macroscópicas: se observó la presencia de micelio aéreo veloso y abundante, blanco a crema. Cuando estuvieron presentes esporodoquios y/o pionnotes, éstos presentaron colores vivos, azul, verde o marrón.

Características microscópicas: se observó macroconidios fusiformes, ligeramente curvados, con varios septos. Se encontraron formando esporodoquios. Se observaron abundantes microconidios agrupados en el extremo de fiálides largas y septadas formando falsas cabezas. En algunos aislados se observaron clamidosporas hialinas, globosas, generalmente individuales, terminales o intercalares (Figura N° 2).

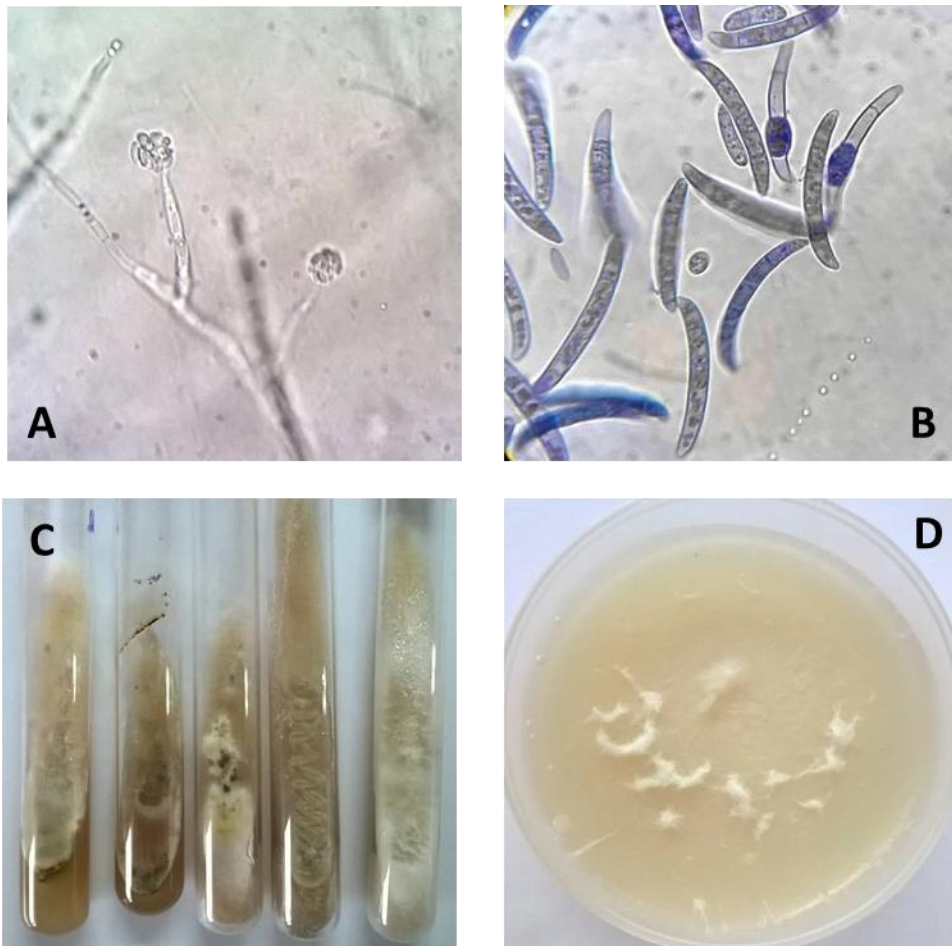


Figura N° 2: Identificación morfológica y cultural de aislados de *Fusarium solani*. (A) Microconidios agrupados sobre fiálides largas formando falsas cabezas (1000 X); (B) Macroconidios con clamidosporas en formación. Se observa una concentración del citoplasma en los espacios intertabicales de los macroconidios y la doble pared que caracteriza a las clamidosporas (1000 X); (C) Variantes de coloración de micelio aéreo y pionnotes en medio de cultivo agar papa glucosa artesanal; (D) Colonia gigante.

Complejo de especies *Fusarium oxysporum*:

Características macroscópicas: se observó la presencia de micelio aéreo con un rango de colores que va del blanco al violeta. En muchos aislados se observó un pigmento violeta oscuro que difunde en el agar. Pudo observarse que el micelio acompaña el contorno del tubo.

Características microscópicas: se observaron macroconidias fusiformes, relativamente cortas, curvadas y con pocos septos. Las microconidias se encontraron formando falsas cabezas o cabezas húmedas. En algunos casos se observaron clamidosporas hialinas terminales o intercalares. En contraste con las observaciones de aislados de *F. solani*, en *F. oxysporum* se vieron fiálides cortas y generalmente sin septo (Figura N° 3).

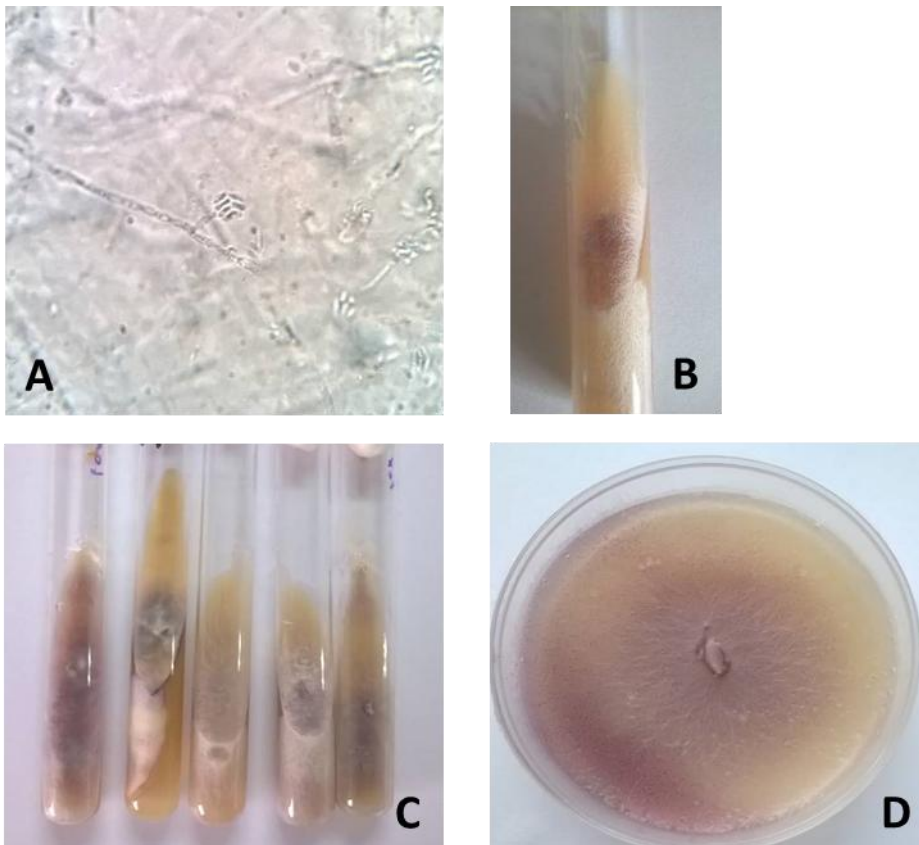


Figura N° 3: Identificación morfológica y cultural de aislados de *Fusarium oxysporum*. (A) Microconidios sobre fiálides cortas (1000 X); (B) Micelio aéreo característico que sigue la forma del contorno del tubo (C) Variantes de coloración de micelio aéreo en medio de cultivo agar papa glucosado artesanal; (D) Colonia gigante: se observa pigmento difusible característico en el medio.

Complejo de especies *Fusarium verticillioides*:

Características macroscópicas: inicialmente los cultivos presentaron micelio blanco pero con el tiempo desarrollaron un pigmento color violeta. Su aspecto fue “seco” o “pulverulento”.

Características microscópicas: se observaron pocos macroconidios relativamente grandes y alargados, con varios septos. Se observaron abundantes microconidias, ovaladas, sin septos y con la base aplanada. En algunos aislados se observaron microconidios formando largas cadenas. No se observaron clamidosporas (Figura N° 4).

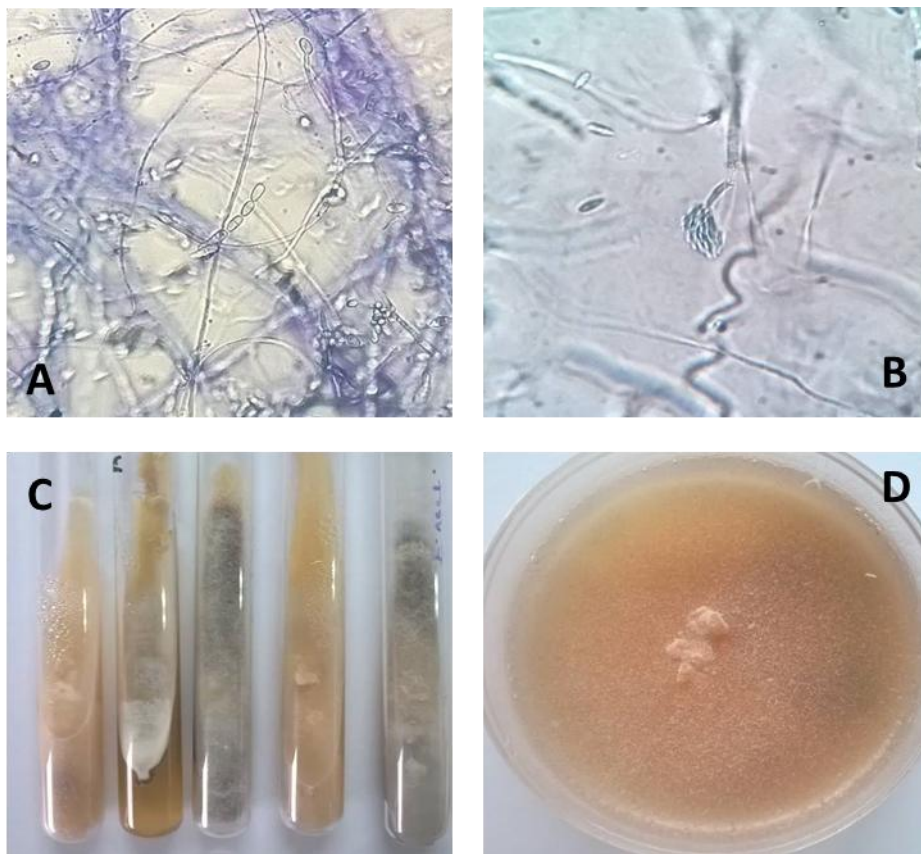


Figura N° 4: Identificación morfológica y cultural de aislados de *Fusarium verticillioides*. (A) Microconidios en cadenas (1000 X); (B) Microconidios en falsas cabezas (1000 X); (C) Variantes de coloración de micelio aéreo en medio de cultivo agar papa glucosado artesanal; (D) Colonia gigante: aspecto seco característico del micelio.

Las muestras según su procedencia se agruparon en cuatro categorías:

Uñas: corresponde a escamas de uñas (Figuras N° 5, 6 y 7).

Córnea: incluye muestras de lesiones corneales (Figura N° 8) y biopsias corneales intraquirúrgicas.

Hemocultivos:

Piel: incluye escamas de piel, nódulos subcutáneos, hisopados nasales, biopsias de lesiones cutáneas (Figuras N° 9 y 10) y reservorio de catéter venoso.



Figura N° 5: Onicomiosis Blanca Superficial en paciente de la comunidad por *Fusarium oxysporum*.

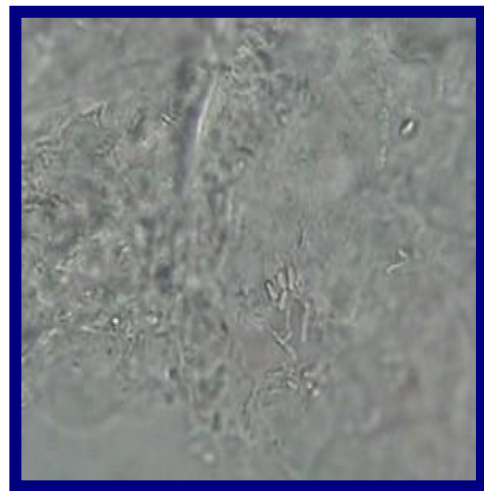


Figura N° 6: Examen directo con KOH 40%, 40 X de escarificación de la lesión de la Fig. N° 5 donde se observan filamentos hialinos y elementos compatibles con conidios.



Figura N°7: Onicomiosis por *Fusarium solani* mostrando lesión Blanca Superficial y onicodistrofia en paciente de la comunidad.

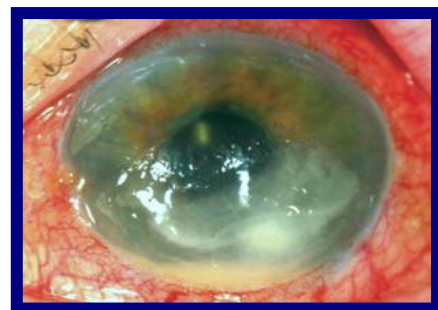


Figura N°8: Lesión corneal de bordes radiados con ulceración blanca e hipopion en paciente con queratocosis por *Fusarium oxysporum*.



Figura N° 9: Lesiones en piel de brazo izquierdo de fusariosis diseminada por *Fusarium solani* en paciente con Leucemia Mieloide Aguda.



Figuras N° 10: Lesiones en piel de brazo derecho de fusariosis diseminada por *Fusarium solani* en paciente con Leucemia Mieloide Aguda.

De la colección de 75 aislados de *Fusarium* spp. obtenidos de especímenes clínicos (Uña, Córnea, Hemocultivos y Piel) se identificaron a nivel de especie 73 aislados pertenecientes a las especies *F. solani*, *F. oxysporum* y *F. verticillioides*.

Dos aislados no se pudieron identificar a nivel de especie ya que se contaminaron y no fue posible su recuperación, por lo cual se excluyen del estudio.

De los 73 aislados, 45 (61,6%) fueron identificados como *F. solani*, 24 (32,9%) como *F. oxysporum*, 4 (5,5%) como *F. verticillioides* (Figura N° 11).

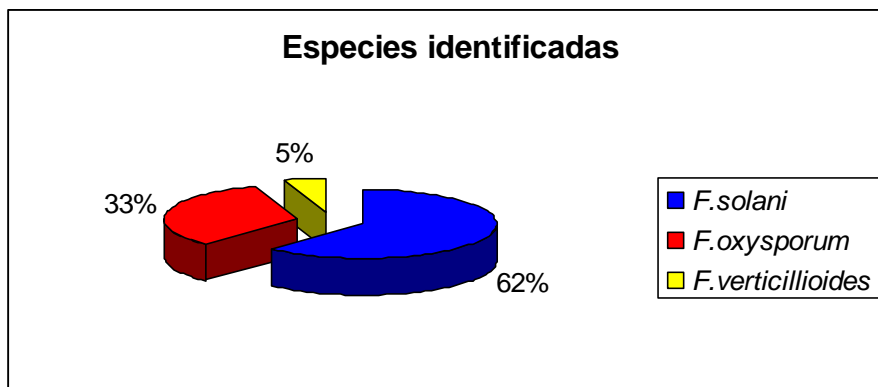


Figura N° 11: Distribución porcentual de las especies del género *Fusarium* identificadas a partir de una colección de 73 aislados provenientes de especímenes clínicos.

En cuanto a la procedencia de los aislados, un 63% (46 aislados) de la colección de cultivos fue obtenido de escamas de uñas, un 21,9% (16 aislados) provinieron de materiales corneales, un 9,6% (7 aislados) de muestras de piel y 5,5% (4 aislados) de Hemocultivos (Figura N° 12).

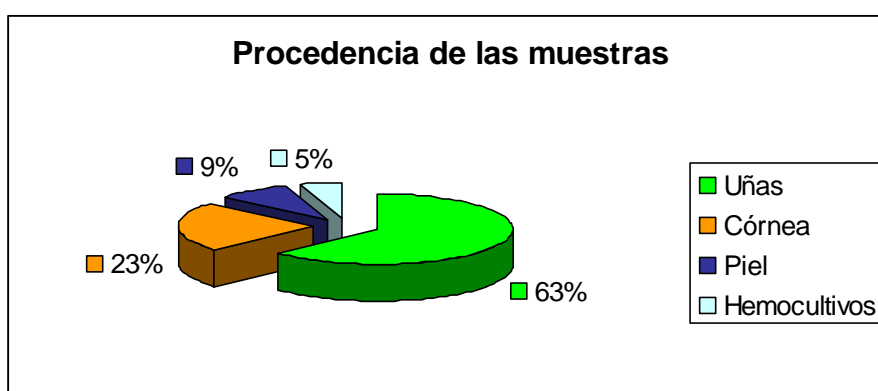


Figura N° 12: Distribución porcentual de una colección de 73 aislados de *Fusarium* spp. provenientes de especímenes clínicos según la procedencia de las muestras.

De la totalidad de la colección de *Fusarium* spp. la especie más aislada en los grupos de muestras **Piel**, **Córnea** y **Uñas** fue *F. solani*, seguida por *F. oxysporum*. En el

grupo **Hemocultivos** se invirtió el orden y *F. oxysporum* fue la especie más recuperada. En los grupos de muestras **Córnea** y **Uñas** se aisló e identificó una tercera especie, *F. verticillioides* (Figura N° 13).

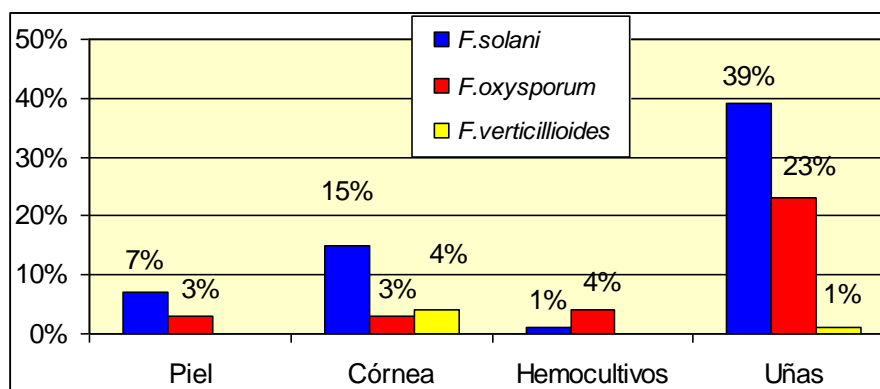


Figura N° 13: Distribución porcentual de las especies del género *Fusarium* identificadas a partir de una colección de 73 aislados provenientes de especímenes clínicos según el origen de las muestras.

Las muestras de hemocultivos pertenecieron a tres pacientes neutropénicos receptores de trasplante de progenitores hematopoyéticos, correspondiendo un aislado de *F. solani* al paciente 1, un aislado de *F. oxysporum* al paciente 2 y tres aislados de *F. oxysporum* al paciente 3. Todos los aislados de la categoría Córnea fueron obtenidos de abscesos corneales posteriores a traumatismos provocados por vegetales, y dos de los tres aislados de *F. verticillioides* recuperados de córnea provenían de pacientes que desarrollaban tareas rurales en cultivos de maíz, coincidiendo con las citas bibliográficas que describen a *F. verticillioides* como uno de los principales agentes fitopatógenos de ese cereal (99).

7.2. ENSAYOS DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO MICELIAL:

7.2.1. Ensayos preliminares de ajuste de la concentración para cuatro quimiotipos de *L. alba*:

En el ensayo previo de ajuste de concentración con *F. solani* (cepa 3) y *F. oxysporum* (cepas 6 y 30) frente a los cuatro quimiotipos a 1000 ppm (= 1000 µg/ml) *F. oxysporum* resultó fuertemente inhibido en presencia del quimiotipo Citral, no registrándose desarrollo al cabo del tiempo de medición. Frente al quimiotipo Carvona se observó crecimiento a partir del cuarto día de incubación hasta el sexto día, luego del cual prácticamente no se observa aumento de los diámetros de las colonias. Los quimiotipos Dihidrocarvona y Linalol tuvieron un menor efecto inhibitor del crecimiento fúngico (Figura N° 14).

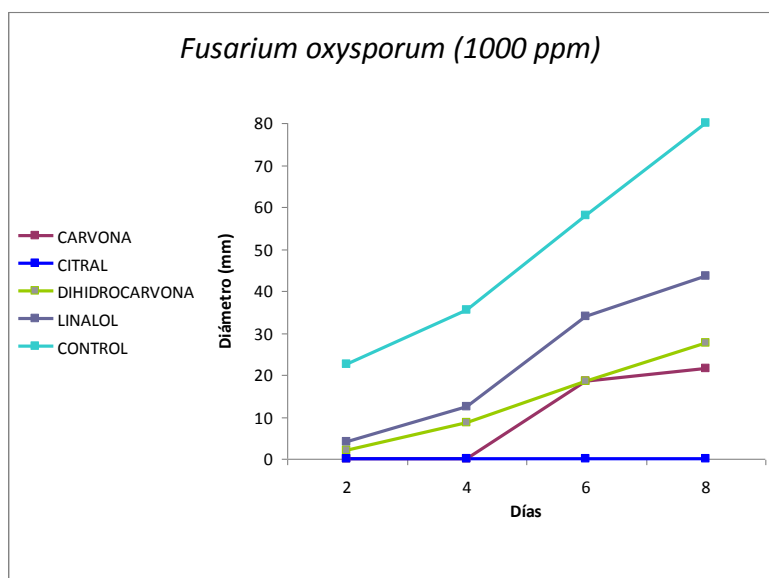


Figura N° 14: Efecto inhibitor de cuatro quimiotipos de *L. alba* a 1000 ppm sobre *F. oxysporum*. No se observa desarrollo en presencia del quimiotipo Citral.

Fusarium solani fue menos sensible al efecto inhibitor de los aceites observándose crecimiento micelial con los cuatro quimiotipos. El quimiotipo Citral también en este

caso, produce mayor inhibición del crecimiento. Se observó que los diámetros de las colonias frente a los cuatro quimiotipos fueron siempre menores que el control, aunque continuaron aumentando durante el período de medición (Figura N° 15).

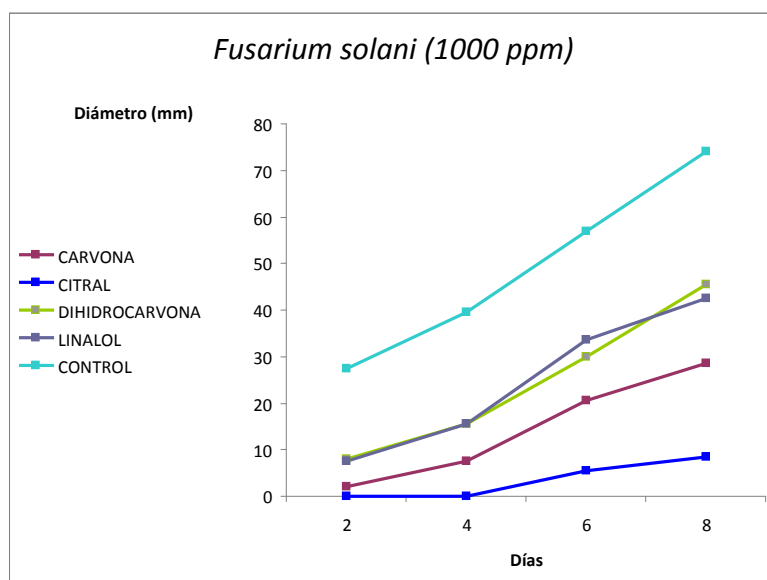


Figura N° 15: Efecto inhibitor de cuatro quimiotipos de *L. alba* a 1000 ppm sobre el crecimiento radial de *F. solani*.

Al evaluar todos los quimiotipos a 1000 ppm se observó que el quimiotipo Citral fue el que produjo mayor inhibición del crecimiento micelial dando lugar a colonias de menor tamaño, seguido por el quimiotipo Carvona, Dihidrocarvona y Linalol. Los cuatro quimiotipos mostraron mayor inhibición del crecimiento micelial sobre las colonias de *F. oxysporum* que sobre las de *F. solani*.

En el segundo ensayo de ajuste se buscó establecer un rango de concentraciones óptimo para cada quimiotipo tomando como referencia su comportamiento en el ensayo anterior. Se aumentaron las concentraciones de los quimiotipos Carvona, Dihidrocarvona y Linalol que presentaron menor efecto inhibitor a 1000 ppm y se redujo la concentración del quimiotipo Citral que mostró mayor poder inhibitorio. Esta segunda evaluación se realizó con los mismos aislamientos utilizados en el primer ensayo de ajuste de concentraciones (Tabla N° 3).

Tabla N° 3: Concentraciones utilizadas en el ensayo de inhibición para cuatro quimiotipos de *L. alba* frente a especies de *F. solani* y *F. oxysporum*:

QUIMIOTIPO	CONCENTRACIÓN (ppm)
CARVONA	1000-1250-1500
CITRAL	250-500-750
DIHIDROCARVONA	1250-1500-1750
LINALOL	1250-1500-1750

Al evaluar la capacidad inhibitoria de los cuatro quimiotipos ensayados se pudo observar que a las distintas concentraciones ensayadas todos los quimiotipos presentaron un mayor porcentaje de inhibición del crecimiento micelial sobre *F. oxysporum* que sobre *F. solani* (Figura N° 16).

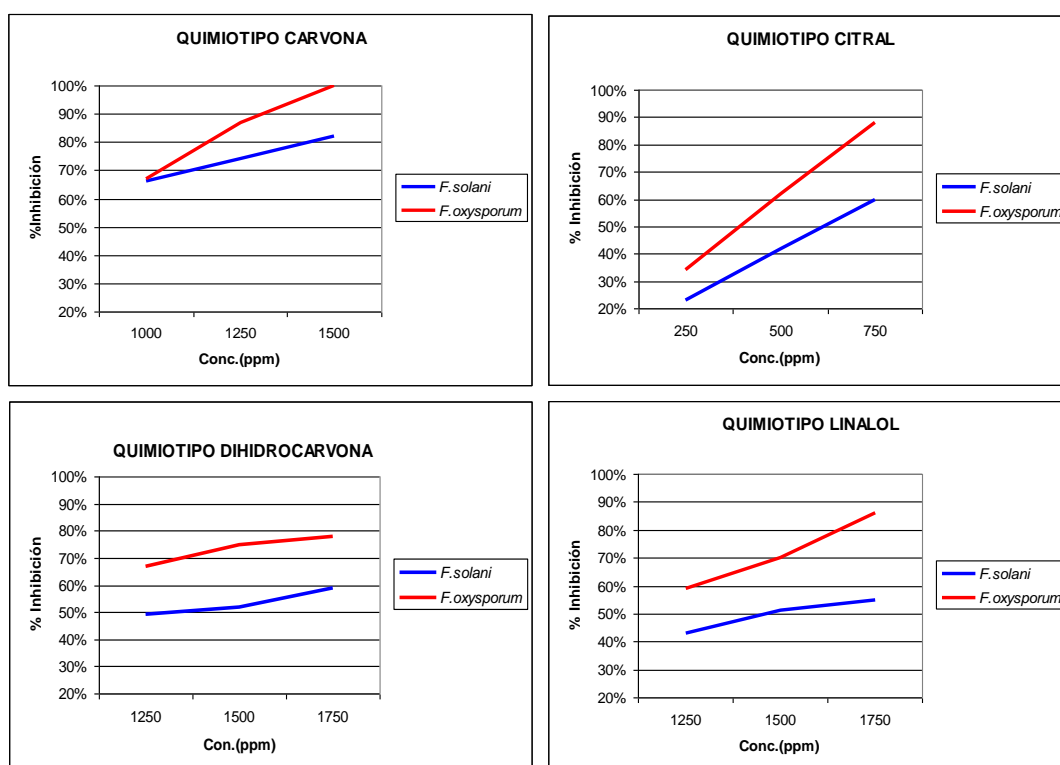


Figura N° 16: Efecto Inhibidor de cuatro quimiotipos de *L. alba* a distintas concentraciones sobre el crecimiento micelial de *F. solani* y *F. oxysporum*.

Con los quimiotipos Dihidrocarvona y Linalol, *F. oxysporum* mostró valores de inhibición mayores al 60% aún a las concentraciones más bajas ensayadas llegando a valores de casi 90% a 1750 ppm. En cambio con *F. solani* se obtuvieron porcentajes de inhibición inferiores al 60% aún con 1750 ppm.

El quimiotipo Carvona produjo inhibición del crecimiento cercana al 100% para *F. oxysporum* a 1500 ppm. En cambio con *F. solani* no se superó el 80% de inhibición aún a la máxima concentración.

El quimiotipo Citral fue probado a un rango de concentraciones muy inferior a los otros tres quimiotipos evaluados. Aún así, presentó valores de inhibición elevados. El máximo porcentaje de inhibición para *F. solani* fue de 60%, en cambio, se obtuvo una inhibición cercana al 90% para *F. oxysporum* con sólo 750 ppm (Figura N° 17).

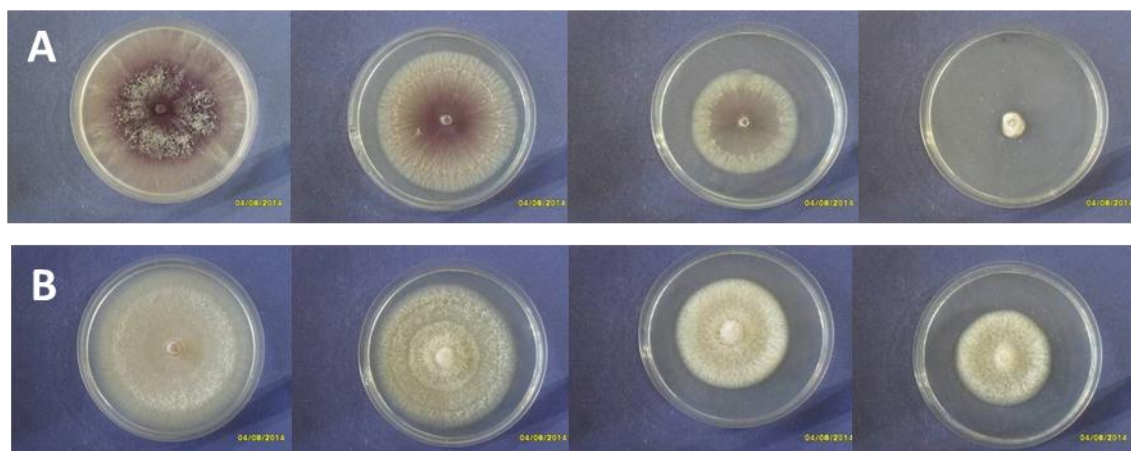


Figura N°17: Efecto inhibitorio del crecimiento micelial de *Fusarium* spp. por el quimiotipo Citral a diferentes concentraciones: (A) *F. oxysporum*: Placa Control sin aceite, Citral a 250 ppm, Citral a 500 ppm y Citral a 750 ppm. (B) *F. solani*: Control sin aceite, Citral a 250 ppm, Citral a 500 ppm y Citral a 750 ppm.

Se pudo observar distinto comportamiento del quimiotipo Citral frente a las dos especies estudiadas a 750 ppm (Figura N° 18):

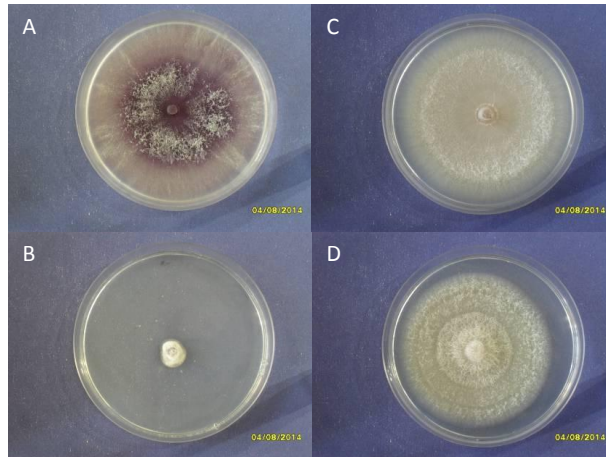


Figura N° 18: Comparación del efecto inhibitor del quimiotipo Citral a 750 ppm sobre el crecimiento micelial de *F. oxysporum* y *F. solani*: (A) *F. oxysporum* (Control sin aceite); (B) *F. oxysporum* (quimiotipo Citral 750 ppm); (C) *F. solani* (Control sin aceite); (D) *F. solani* (quimiotipo Citral 750 ppm).

Los cuatro quimiotipos de *L. alba* evaluados presentaron diferente poder inhibitorio del crecimiento micelial según la especie de *Fusarium* y según el quimiotipo, por ello se propone usar distintas concentraciones para cada quimiotipo y para cada una de las dos especies ensayadas.

7.2.2. Ensayos de inhibición con aceites esenciales de *L. alba* sobre cepas de *F. solani* y *F. oxysporum*:

Para los ensayos de inhibición se seleccionaron 4 aislados de *F. solani* (cepas 3, 8, 15 y 23) y 4 de *F. oxysporum* (cepas 7, 11, 13 y 30) recuperadas de lesiones de piel, escamas de uñas, raspados corneales y hemocultivos para que sea una muestra representativa de la colección. En función de los resultados obtenidos en los ensayos preliminares se definieron las siguientes concentraciones para evaluar el efecto inhibitor de cada quimiotipo para cada especie (Tabla N° 4).

Tabla N° 4: Concentraciones utilizadas en el Ensayo de Inhibición para cada quimiotipo y especie.

QUIMIOTIPO	CONCENTRACIÓN (ppm)	ESPECIE
Carvona	1000-1250-1500	<i>F. oxysporum.</i>
	1250-1500-1750	<i>F. solani</i>
Citral	250-500-750	<i>F. oxysporum</i>
	750-1000-1250	<i>F. solani</i>
Dihidrocarvona	1250-1500-1750	<i>F. oxysporum</i>
	1500-1750-2000	<i>F. solani</i>
Linalol	1250-1500-1750	<i>F. oxysporum</i>
	1500-1750-2000	<i>F. solani</i>

El efecto inhibitorio frente a *F. solani* y *F. oxysporum* difirió según el quimiotipo.

- Efecto inhibitorio del quimiotipo Carvona frente a *F. solani* y *F. oxysporum*:

El quimiotipo Carvona mostró diferencias estadísticamente significativas entre las especies de *Fusarium* analizadas a 1250 y 1500 ppm ($F = 45,65$; $p < 0,01$) y entre las concentraciones para *F. solani* ($F = 80,90$; $p < 0,01$) y para *F. oxysporum* ($F = 520,82$; $p < 0,01$). No se encontró la ocurrencia de interacción concentración por especie significativa ($F = 2,81$). La mayor concentración inhibe en mayor medida que la menor para las dos especies (Tabla N° 5 y Figura N° 18). *F. oxysporum* fue significativamente más inhibido que *F. solani* por este quimiotipo a 1250 y 1500 ppm (Tabla N° 6).

Tabla N° 5: Efecto inhibitorio del quimiotipo Carvona a distintas concentraciones sobre *F. solani* y *F. oxysporum*.

QUIMIOTIPO CARVONA		
CONCENTRACIÓN (ppm)	INHIBICIÓN (%)	
	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. solani</i>
1000	79 ^c	
1250	86 ^b	78 ^c
1500	100 ^a	89 ^b
1750		92 ^a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,01$).

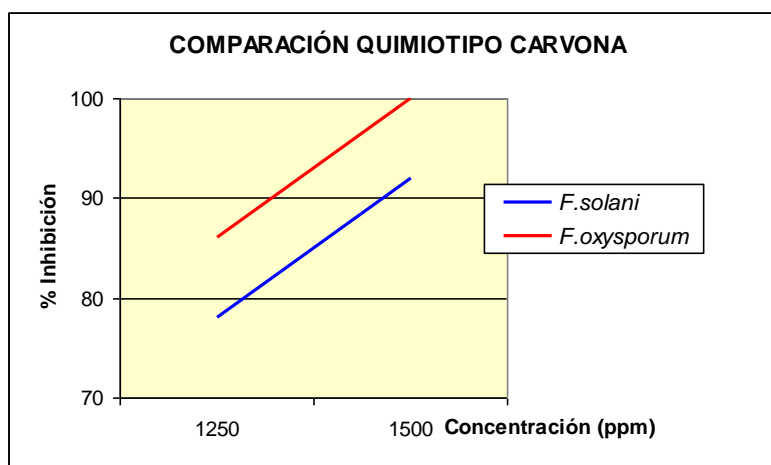


Figura N° 18: Comparación del efecto inhibitorio del quimiotipo Carvona sobre *F. solani* y *F. oxysporum*. No se observa interacción concentración por especie.

Tabla N° 6: Comparación de los porcentajes de inhibición entre las especies con Carvona a 1250 y 1500 ppm.

ESPECIE	Media del % de Inhibición
<i>F. oxysporum</i>	0.9278 a
<i>F. solani</i>	0.8358 b

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,01$).

- Efecto inhibidor del quimiotipo Citral frente a *F. solani* y *F. oxysporum*:

El quimiotipo Citral mostró diferencias estadísticamente significativas entre las entre las especies de *Fusarium* analizadas a 750 ppm ($F = 129$; $p < 0,01$) y entre las concentraciones para *F. solani* ($F = 564,43$; $p < 0,01$) y para *F. oxysporum* ($F = 396,38$; $p < 0,01$). La mayor concentración inhibe en mayor medida que la menor para las dos especies (Tabla N° 7). *F. oxysporum* fue significativamente más inhibido que *F. solani* por este quimiotipo (Tabla N° 8) a 750 ppm, mostrando escaso desarrollo micelial a dicha concentración de Citral (Figura N° 19).

Tabla N° 7: Efecto inhibitorio del quimiotipo Citral a distintas concentraciones sobre *F. solani* y *F. oxysporum*

QUIMIOTIPO CITRAL		
CONCENTRACIÓN	(%) INHIBICIÓN	
(ppm)	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. solani</i>
250	33 ^c	
500	65 ^b	
750	92 ^a	65 ^c
1000		86 ^b
1250		100 ^a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,01$).

Tabla N° 8: Comparación de los porcentajes de inhibición entre las especies con Citral a 750 ppm.

ESPECIE	Media del % de Inhibición
<i>F. oxysporum</i>	0.9242 a
<i>F. solani</i>	0.6449 b

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,01$).

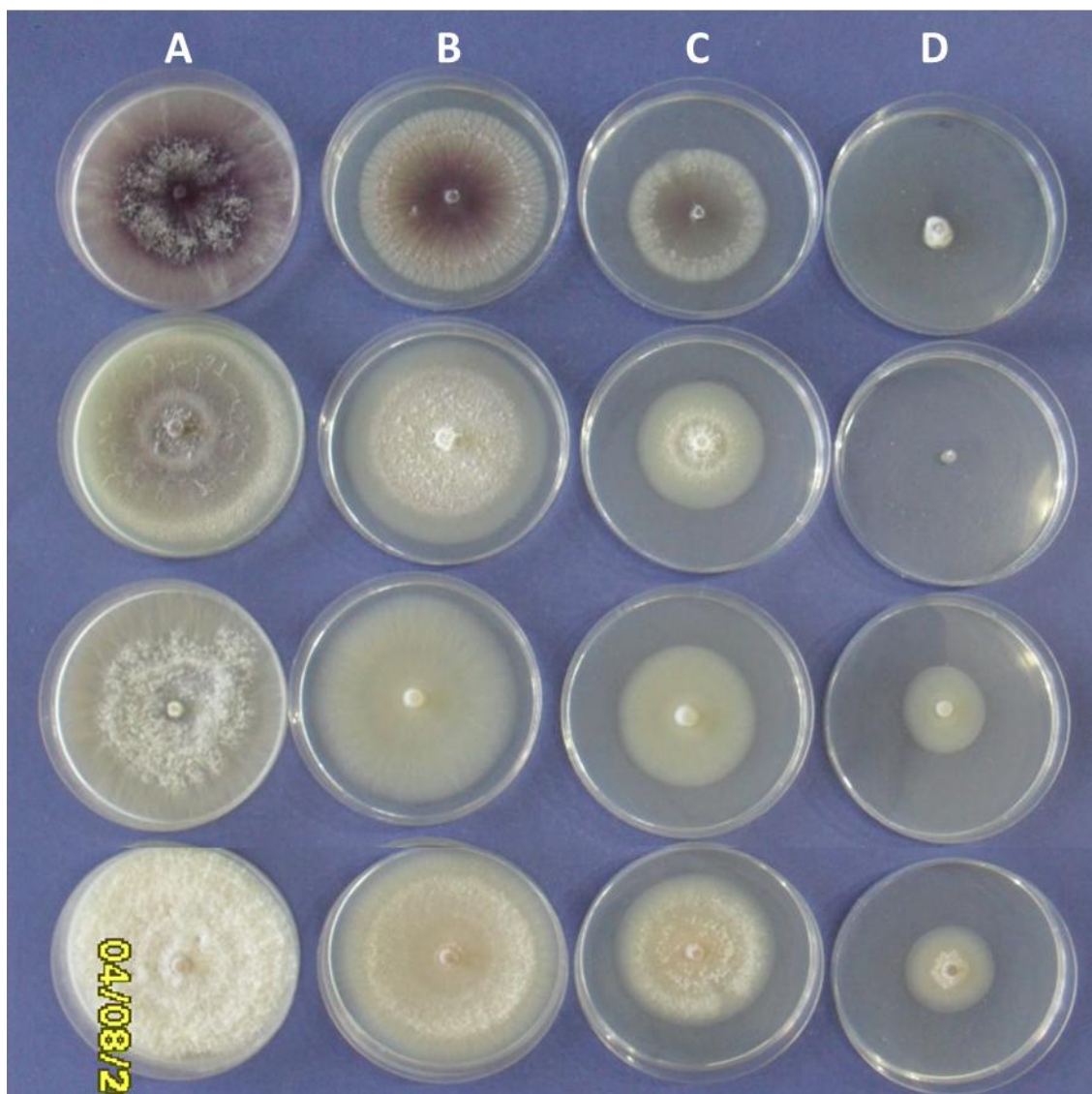


Figura N°19: Efecto inhibitor del crecimiento micelial de 4 aislados de *F. oxysporum* frente a quimiotipo Citral. Se observa que el efecto inhibitor aumenta a medida que aumenta la concentración del quimiotipo. Columna A: control de crecimiento sin agregado de quimiotipo Citral. Columna B: Citral 250 ppm. Columna C: Citral 500 ppm. Columna D: Citral 750 ppm.

-Efecto inhibitor del quimiotipo Dihidrocarvona frente a *F. solani* y *F. oxysporum*:

El quimiotipo Dihidrocarvona mostró diferencias estadísticamente significativas entre las especies de *Fusarium* analizadas a 1500 y 1750 ppm ($F = 35,45$; $p < 0,01$) y entre las concentraciones para *F. solani* ($F = 256,16$; $p < 0,01$) y para *F. oxysporum* ($F = 14,84$; $p < 0,01$) (Tabla N° 8).

Se encontró la ocurrencia de interacción concentración por especie significativa ($F = 13,12$; $p < 0,01$), se vio que a 1750 ppm el incremento en la concentración del quimiotipo produjo una diferencia en la respuesta en los aislados de *F. solani* mucho mayor a la observada para los aislados de *F. oxysporum* (Figura N° 20).

Fusarium oxysporum fue significativamente más inhibido que *F. solani* por este quimiotipo a 1500 y 1750 ppm (Tabla N° 9).

Tabla N° 8: Efecto inhibitorio del quimiotipo Dihidrocarvona a distintas concentraciones sobre *F. solani* y *F. oxysporum*.

QUIMIOTIPO DIHIDROCARVONA		
CONCENTRACIÓN (ppm)	INHIBICIÓN (%)	
	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. solani</i>
1250	66b	
1500	76a	55c
1750	79a	74b
2000		84a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,01$)

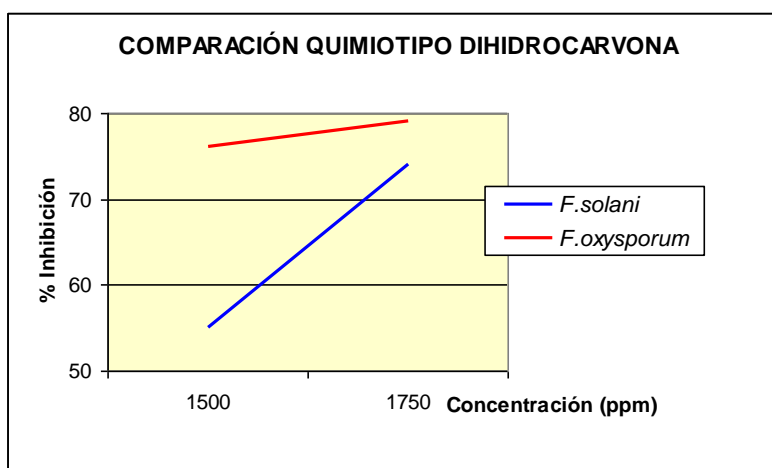


Figura N° 20: Comparación del efecto inhibidor del quimiotipo Dihidrocarvona sobre *F. solani* y *F. oxysporum*. Se observa interacción concentración por especie.

Tabla N° 9: Comparación de los porcentajes de inhibición entre las especies con Dihidrocarvona a 1500 y 1750 ppm.

ESPECIE	Media del % de Inhibición
<i>F. oxysporum</i>	0,7796 a
<i>F. solani</i>	0,6450 b

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,01$).

-Efecto inhibidor del quimiotipo Linalol frente a *F. solani* y *F. oxysporum*:

El quimiotipo Linalol mostró diferencias estadísticamente significativas entre las especies de *Fusarium* analizadas a 1500 y 1750 ppm ($F = 10,79$; $p < 0,01$) y entre las concentraciones para *F. solani* ($F = 19,13$; $p < 0,01$) y para *F. oxysporum* ($F = 99,21$; $p < 0,01$) (Tabla N° 10). No se encontró la ocurrencia de interacción concentración por especie significativa ($F = 0,47$) (Figura N° 21). *F. oxysporum* se vio significativamente más inhibido que *F. solani* por este quimiotipo a 1500 y 1750 (Tabla N° 11).

Tabla N° 10: Efecto inhibitorio del quimiotipo Linalol sobre *F. solani* y *F. oxysporum*.

QUIMIOTIPO LINALOL		
CONCENTRACIÓN (ppm)	INHIBICIÓN (%)	
	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. solani</i>
1250	56c	
1500	70b	61b
1750	78a	72a
2000		73a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,01$).

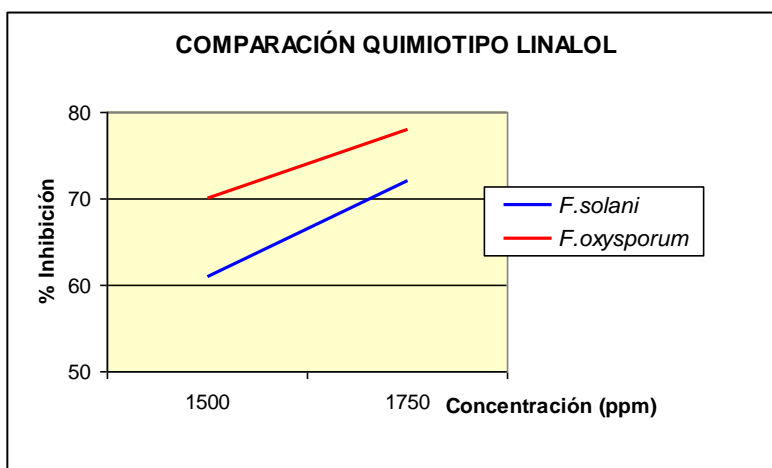


Figura N° 21: Comparación del efecto inhibitor del quimiotipo Linalol sobre *F. solani* y *F. oxysporum*. No se observa interacción concentración por especie significativa.

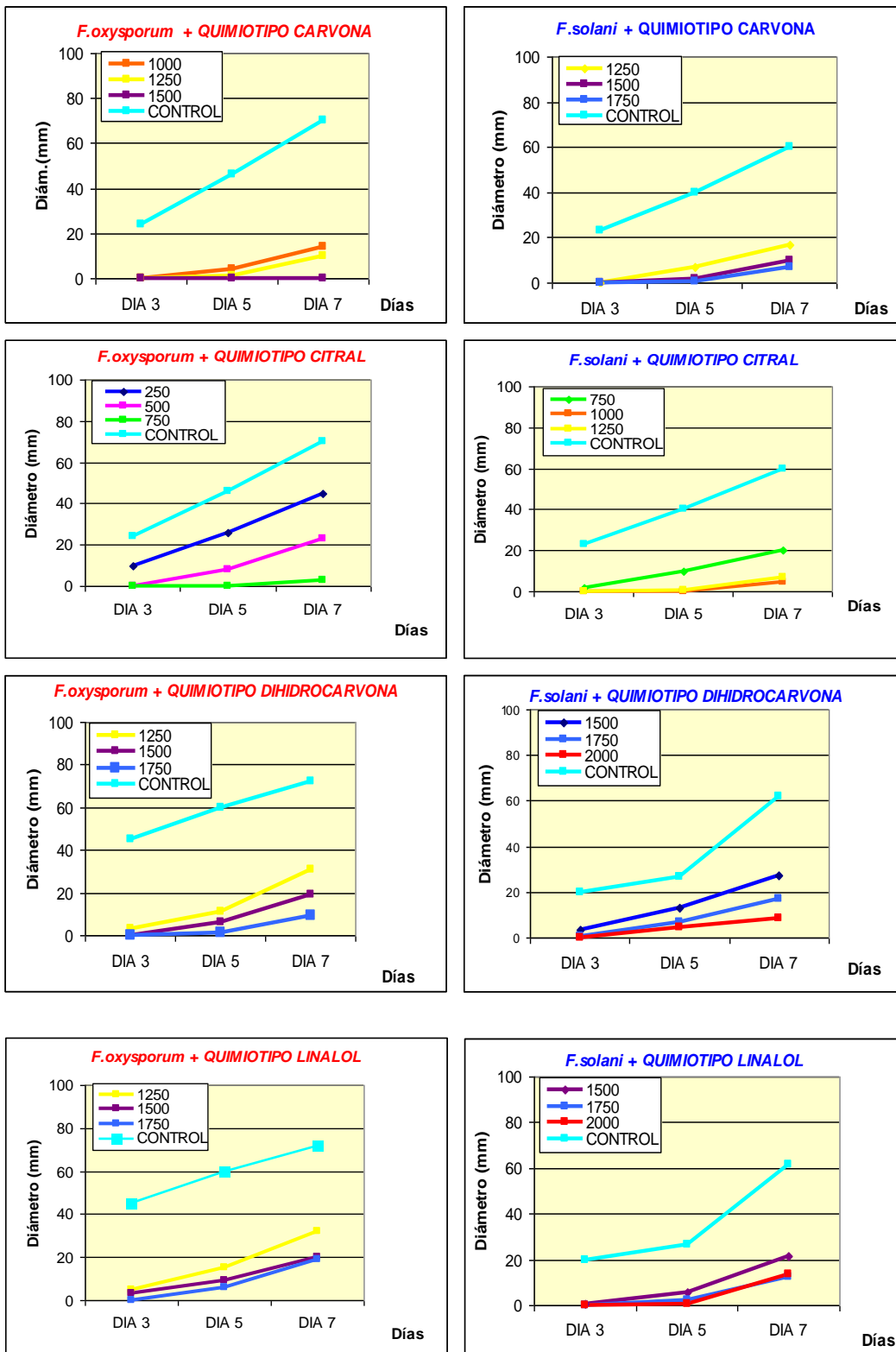
Tabla N° 11: Comparación de los porcentajes de inhibición entre las especies con Linalol a 1500 y 1750 ppm.

ESPECIE	Media del % de Inhibición
<i>F. oxysporum</i>	0,7466 a
<i>F. solani</i>	0,6721 b

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,01$).

-Efecto fungistático de los cuatro quimiotipos de *L. alba*:

A partir de estos ensayos puede valorarse el efecto fungistático de cada quimiotipo de *L. alba*. Para ello se registraron los diámetros de crecimiento micelial de ambas especies frente a diferentes concentraciones de los cuatro quimiotipos (Figura N° 22).



Figuras N° 22: Efecto fungistático: medición de los diámetros de crecimiento micelial de *F. solani* y *F. oxysporum* cuando se desarrollan en medios de cultivo con distintas concentraciones y quimiotipos de *L. alba*.

Se observa una marcada disminución del diámetro de las colonias en todos los casos en comparación con el control de crecimiento a medida que aumentan las concentraciones de los distintos quimiotipos. También se aprecia un retardo en el crecimiento en presencia de los quimiotipos de *L. alba*.

Determinación de la CIM para cada quimiotipo de *L. alba*:

De estos ensayos puede calcularse la CIM de cada quimiotipo definida como la concentración mínima de aceite necesaria para producir una inhibición del 100% del crecimiento micelial (Tabla N° 12).

Tabla N° 12: Cálculo de la Concentración Inhibitoria Mínima para *F. solani* y *F. oxysporum* con cuatro quimiotipos de *L. alba*.

QUIMIOTIPO	CIM (ppm)	
	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. solani</i>
CARVONA	1500	>1750
CITRAL	>750	1250
DIHIDROCARVONA	>1750	>2000
LINALOL	>1750	>2000

Los valores de CIM más bajos se obtuvieron para el quimiotipo Citral.

7.3. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD *IN VITRO* A ANFOTERICINA B Y VORICONAZOL:

El valor de la CIM para ambas especies frente a los antifúngicos ensayados generalmente fue mayor a 1 µg/ml.

Las cepas control utilizadas para validar cada ensayo dieron resultados dentro de los rangos que figuran en las tablas para control de calidad de los protocolos mencionados en Materiales y Métodos.

Las CIM para el voriconazol y la anfotericina B para cada especie se resumen en las Tablas N° 13 y 14. Con el método de difusión en placa se observaron halos de inhibición pequeños o nulos (Figura N° 23).

Tabla N° 13: CIM de anfotericina B y voriconazol para *F. solani*.

	Anfotericina B		Voriconazol	
	MICRODILUCIÓN	DIFUSIÓN	MICRODILUCIÓN	DIFUSIÓN
	CIM(µg/ml)	Etest (µg/ml)	CIM (µg/ml)	Etest (µg/ml)
FS 3	2	1	8	8
FS 8	16	16	8	8
FS 15	16	>32	8	>32
FS 23	2	2	4	2

FS: *F. solani*

Tabla N° 14: CIM de anfotericina B y voriconazol para *F. oxysporum*.

	Anfotericina B		Voriconazol	
	MICRODILUCIÓN	DIFUSIÓN	MICRODILUCIÓN	DIFUSIÓN
	CIM (µg/ml)	Etest (µg/ml)	CIM (µg/ml)	Etest (µg/ml)
FOX 7	2	2	0,5	1
FOX 11	2	1	2	1
FOX 13	1	1	2	2
FOX 30	0,5	0,5	0,25	0,25

FOX: *F. oxysporum*.

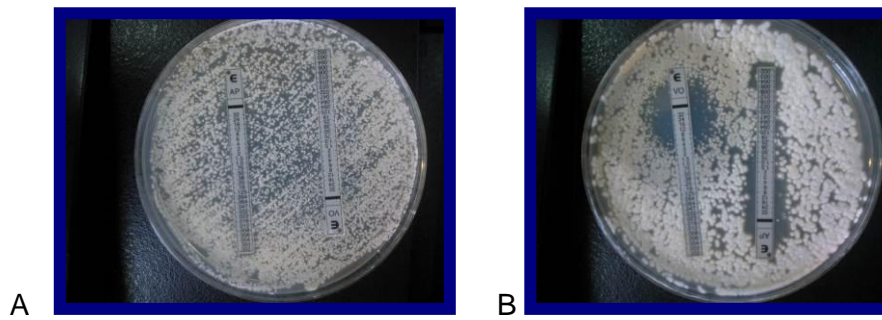


Figura N° 23: Método de difusión en medio sólido con tiras Ettest® de voriconazol y anfotericina B de (A) aislado 23 *F. solani*: se observa desarrollo de colonias en toda la placa y (B) aislado 13 *F. oxysporum*: se observan halos de inhibición pequeños. Ambos aislados no fueron inhibidos por los antifúngicos empleados.

Por ambos métodos se obtuvieron valores de CIM > 1 µg/ml (= ppm) que indican que los aislados usados en este ensayo necesitan de altas concentraciones *in vitro* de producto para inhibir el desarrollo micelial.

8. DISCUSIÓN

Una colección de 73 aislados clínicos de *Fusarium* spp. fue identificada a nivel de especie de acuerdo a caracteres morfológicos y culturales. Estos aislados fueron recolectados durante un período comprendido entre enero de 2007 y diciembre de 2014. La especie más frecuentemente recuperada fue *F. solani*, seguida por *F. oxysporum* y sólo cuatro aislados de *F. verticillioides*.

Los resultados del presente trabajo coinciden con los reportes que ubican a *F. verticillioides*, como la tercera especie en orden de importancia responsable de infecciones en humanos dentro del género, tras *F. solani* y *F. oxysporum* (15, 23).

En todos los casos analizados existió un factor predisponente para la infección. En pacientes inmunocompetentes el factor de riesgo más común fue la ruptura de los tejidos provocada por un traumatismo directo o por la presencia de un cuerpo extraño. En los pacientes inmunodeprimidos el factor predisponente más importante fue la neutropenia severa. Estas observaciones concuerdan con lo expuesto por otros autores (6, 32, 38).

Para la identificación de los aislados se utilizó Agar Papa Glucosado preparado artesanalmente en el laboratorio con extracto de papa al 2% y 0,25% de Cloranfenicol, siguiendo las indicaciones de Nelson y colaboradores. Ellos sugieren que al preparar este medio de cultivo para la caracterización de las especies del género *Fusarium* resulta recomendable la utilización de ingredientes crudos y naturales más que usar algún preparado comercial disponible (12, 98).

En general, dada la importancia en la salud humana de varias especies del género, y que aún no se ha establecido un tratamiento eficaz frente a las diferentes infecciones que ocasionan, el estudio de su respuesta antifúngica *in vitro* tiene un evidente interés clínico. La baja actividad *in vitro* de los diferentes antifúngicos convencionales

utilizados hasta el momento para el género *Fusarium* ha sido comprobada en varios estudios siendo *F. solani* la especie más resistente (57, 58).

Aunque la anfotericina B es el fármaco recomendado para el tratamiento de la fusariosis, presenta un bajo éxito clínico (32, 100).

En aquellos casos de pacientes neutropénicos que reciben corticosteroides, la supervivencia es prácticamente nula, a pesar de utilizar un tratamiento intensivo (40).

Voriconazol, el otro antifúngico recomendado, es el único agente indicado para el tratamiento de la fusariosis refractaria (32), sin embargo, en el presente estudio, los valores de CIM obtenidos para este fármaco frente a *F. solani* fueron siempre mayores de 2 µg/ml, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en otros trabajos (57).

En el estudio de sensibilidad *in vitro* frente a la anfotericina B y el voriconazol realizado se observó que los valores de CIM obtenidos con los aislados 7, 11, 13 y 30 de *F. oxysporum* fueron menores a los de los aislados 3, 8, 15 y 23 de *F. solani*. Todos los aislados mostraron muy baja sensibilidad a las drogas ensayadas, en coincidencia con otros autores (56), corroborando la elevada resistencia de este género al tratamiento antifúngico convencional.

El escaso éxito terapéutico obtenido al tratar infecciones ocasionadas por *Fusarium* spp. con los antifúngicos disponibles fue el motivante para este ensayo con productos naturales. Existen diversas publicaciones que dan cuenta del poder antimicrobiano de los aceites esenciales sobre algunas especies de bacterias y hongos (62).

Lippia alba es una planta medicinal autóctona del continente americano que presenta diversos quimiotipos con poder antifúngico documentado (83). También es popular su uso en varios países como medicación casera para distintas afecciones (61, 73, 74).

La utilización como antifúngico del aceite esencial de *L. alba* cultivada en la Argentina frente a aislados de *Fusarium* spp. provenientes de especímenes clínicos no ha sido reportada hasta el momento por ningún grupo de investigación, según nuestro conocimiento.

En el presente estudio se pudo observar que la actividad inhibitoria ejercida por los cuatro quimiotipos de *L. alba* sobre los aislados evaluados muestra un efecto dependiente de la concentración del aceite.

Las dos especies estudiadas presentaron un nivel diferente de sensibilidad frente a los quimiotipos de *L. alba*. *F. oxysporum* fue más sensible que *F. solani* frente a los quimiotipos ensayados, resultado coincidente con los estudios que ubican a *F. solani* como la especie del género más resistente a los tratamientos antifúngicos convencionales (56).

Se observó que se obtuvieron altos porcentajes de inhibición del crecimiento micelial para las dos especies cuando se utilizó el quimiotipo Citral en un rango de concentraciones bajas en comparación con las utilizadas con los otros quimiotipos. Se obtuvieron valores de inhibición cercanos al 100% para las dos especies a concentraciones inferiores a las usadas con el quimiotipo Carvona, con el cual también se obtuvieron altos porcentajes de inhibición. Esto es concordante con las observaciones de otros autores que documentaron que el quimiotipo Citral mostró actividad antifúngica a bajas concentraciones frente a aislados de *A. fumigatus* y *C. krusei* con una CIM de 78 µg/ml y 270 µg/ml respectivamente (101).

El quimiotipo Carvona también presentó un fuerte efecto inhibitor, aunque para lograrlo se trabajó con concentraciones más altas. Otros autores comprobaron que este quimiotipo, a diferencia del quimiotipo Citral, no es activo frente a *A. fumigatus* y *C. krusei* a concentraciones inferiores a 500 µg/ml (101). Esta observación concuerda con lo hallado en el presente trabajo donde se demuestra la necesidad de utilizar mayores concentraciones de Carvona para obtener el mismo efecto inhibitor que el obtenido con Citral (62).

Algunos grupos de investigación dan cuenta del efecto antifúngico de los aceites de *L. alba* pero no hacen referencia al quimiotipo del aceite con el que trabajaron (84).

Con los quimiotipos Dihidrocarvona y Linalol se obtuvieron valores del orden del 70% de inhibición del crecimiento micelial a la concentración más alta de las probadas. A pesar de que los porcentajes de inhibición en algunos casos fueron bajos, cabe destacar que en los ensayos con los cuatro quimiotipos se pudo apreciar un retardo en el crecimiento radial de los cultivos.

Se observó que los aislados utilizados en el presente estudio presentaron valores elevados de CIM para la anfotericina B y el voriconazol, coincidentes con bibliografía (56) y resultaron inhibidas por algunos quimiotipos del aceite ensayado. Esta diferencia en cuanto a la respuesta de las especies fúngicas evaluadas frente a los antifúngicos convencionales y los quimiotipos de *L. alba*, podría sugerir que los sitios de acción de estos quimiotipos difieren de los de la anfotericina B y el voriconazol. Este comportamiento también fue descrito por otros autores que demostraron una acción sinérgica entre aceites esenciales y Fluconazol frente a cepas resistentes a dicha droga (102). En apariencia, los aceites esenciales facilitarían el ingreso del antifúngico a las células ya que actúan rompiendo las membranas celulares. Existen algunos estudios que dan cuenta de los beneficios de la terapia combinada de dos o más drogas antifúngicas convencionales (103).

Sin embargo, la combinación de la terapia convencional con productos naturales está menos explorada. Las ventajas sobre la monoterapia incluyen el aumento del efecto fungicida de las drogas, la disminución la aparición de cepas resistentes y de las dosis empleadas con la consecuente disminución de los efectos tóxicos (104). Por este motivo, los aceites esenciales podrían tratarse de una alternativa terapéutica sustentable frente a aislados resistentes los antifúngicos mencionados.

Considerando la resistencia de las especies del género *Fusarium* a los antifúngicos actualmente utilizados, la búsqueda de nuevos compuestos de origen vegetal con actividad antifúngica es de gran importancia. Los aceites esenciales serían una fuente

potencial de productos naturales capaces de controlar las infecciones fúngicas producidas por este género.

El presente trabajo pretende ser una introducción al estudio de la interacción *in vitro* de quimiotipos del aceite esencial de *L. alba* y aislados de *Fusarium* spp. de muestras clínicas. Sería interesante evaluar esta interacción con un mayor número de aislados, y realizar estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos, eficacia *in vivo* y estudios de toxicidad.

9- CONCLUSIONES

-*Fusarium solani* fue la especie más aislada, seguida por *F. oxysporum* y en tercer lugar *F. verticillioides*.

-Todos los quimiotipos produjeron un retardo del crecimiento de los cultivos.

-Los quimiotipos Carvona y Citral produjeron una inhibición del crecimiento micelial de *F. solani* y *F.oxysporum* superior a 90% a las concentraciones ensayadas.

- Los quimiotipos Dihidrocarvona y Linalol produjeron inhibición del crecimiento de las especies evaluadas inferiores a 80% a las concentraciones ensayadas.

-Por los resultados obtenidos no se rechaza la hipótesis planteada ya que algunos quimiotipos del aceite esencial de *Lippia alba* tienen efecto inhibitor *in vitro* sobre el crecimiento micelial de aislados de especies del género *Fusarium* obtenidos de muestras clínicas.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. García –Vidal C, Carratalá J. Patogenia de la infección fúngica invasora. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012; 30(3):151–8.
2. McNeil MM, Nash SL, Hajjeh RA, Phelan MA, Conn LA, Plikaytis BD, et al. Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in the United States, 1980-1997. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 641–7.
3. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of Invasive Mycosis in North America. *Crit Rev Microbiol* 2010; 36:1-53.
4. Kontoyiannis DP, Marr KA, Park BJ, Alexander BD, Anaissie EJ, Walsh TJ, et al. Prospective surveillance for invasive fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients, 2001-2006: overview of the Transplant - Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) Database. *Clin Infect Dis* 2010; 50:1091–100.
5. Garcia-Vidal C, Upton A, Kirby K, Marr K. Epidemiology of invasive mould infections in allogenic stem cell transplant recipients: biological risk factors for infection according to time after transplant. *Clin Infect Dis* 2008; 47: 1041–50.
6. Neofytos D, Horn D, Anaissie E, Steinbach W, Olyaei A, Fishman J, et al. Epidemiology and outcome of invasive fungal infection in adult hematopoietic stem cell transplant recipients: analysis of Multicenter Prospective Antifungal Therapy (PATH) Alliance registry. *Clin Infect Dis* 2009; 48: 265–73.

7. 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.
8. Pfaller MA, Diekema DJ. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 4419-31.
9. Malani AN, Kauffman CA. Changing epidemiology of rare mould infections: implications for therapy. *Drugs* 2007; 67:1803-12.
10. Pagano L, Akova M, Dimopoulos G, Herbrecht R, Drgna L, Blijleven N. Risk assessment and prognostic factors for mould-related diseases in immunocompromised patients. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66 (Suppl 1): 5-14.
11. Vallejo Llamas JC, Ruiz-Camps I. Infección fúngica invasora en los pacientes hematológicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2012; 30 (9): 572-9.
12. Booth C. *The Genus Fusarium*. Comm Mycol Inst, Kew, Surrey, England. 1971; pp. 237.
13. Nelson PE, Dignani MC y Anaissie EJ. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7: 479-504.
14. Leslie JF, Summerell BA. *The Fusarium laboratory manual*. Blackwell Publishing. 2006; pp. 369.

15. Guarro J y Gené J. Opportunistic fusarial infections in humans. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995; 14: 741-54.
16. Pontón J, Rüchel R, Clemons KV, Coleman DC, Grillot R, Guarro J et al. Emerging pathogens. *Med Mycol* 2000; 38: 225-36.
17. Marasas WFO, Nelson PE y Toussoun TA. Toxigenic *Fusarium* species: identity and mycotoxicology. Editorial: Pennsylvania State University Press, University Park, PA & London 1984; pp. 328.
18. Guarro J. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2012; 30(1):33–9.
19. O'Donnell K, Cigelnik E and Nirenberg HI. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycology* 1998; 90: 465-93.
20. O'Donnell K, Gueidan C, Sink S, Johnston PR, Crous P W, Glenn A et al. A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. *Fungal Genet Biol* 2009; 46: 936–48.
21. O'Donnell K, Sutton DA, Fothergill A, McCarthy D, Rinaldi MG, Brandt ME et al. Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 2477–90.

22. O'Donnell K, Nirenberg HI, Aoki T and Cigelnik E. A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience* 2000; 41: 61-78.
23. Migheli Q, Balmas V, Harak H, Sanna S, Scherm B, Aoki Tet al. Molecular Philogenetic Diversity of Dermatologic and Other Human Pathogenic Fusarial Isolates from Hospitals in Northern and Central Italy. *J Clin Microbiol* 2010; 48 (4): 1076-84.
24. Ando N, Takatori K. Fungal flora of the conjunctival sac. *Am J Ophthalmol* 1982; 94: 67-74.
25. Ooka J, Kommedahl T. Wind and rain dispersal of *Fusarium moniliforme* in corn fields. *Phytopathology* 1977; 67: 1023–6.
26. Leck AK, Thomas PA, Hagan M et al. Aetiology of suppurative corneal ulcers in Ghana and south India, and epidemiology of fungal keratitis. *Br J Ophthalmol* 2002; 86: 1211–5.
27. Gopinathan U, Garg P, Fernandes M.; Sharma S, Athmanathan S et al. The Epidemiological Features and Laboratory Results of Fungal Keratitis: A 10-Year Review at a Referral Eye Care Center in South India. *Cornea* 2002; 21(6): 555-9.
28. Venugopal PL, Venugopal TL, Gomathi A, Ramakrishna ES, Ilavarasi S. Mycotic keratitis in Madras. *Indian J Pathol Microbiol* 1989; 32: 190–7.

29. Godoy P, Cano J, Gené J, Guarro J, Höfling-Lima AL, Colombo AL. Genotyping of 44 isolates of *Fusarium solani*, the main agent of fungal keratitis in Brazil. J Clin Microbiol 2004; 42: 4494-7.
30. Sampathkumar P, Paya CV. *Fusarium* infection after solid-organ transplantation. Clin Infectious Dis 2001; 32:1237–40.
31. Boutati EI, Anaissie EJ. *Fusarium*, a significant emerging pathogen in patients with hematologic malignancy: ten years experience at a cancer center and implications for management. Blood 1997; 90: 999-1008.
32. Dignani MC, Anaissie E. Human fusariosis. Clin Microbiol Infect 2004; 10 (Suppl.1): 67-75.
33. Anaissie E, Kuchar R, Rex J, Francesconi A, Kasai M, Müller F et al. Fusariosis Associated with Pathogenic *Fusarium* Species Colonization of a Hospital Water System: A New Paradigm for the Epidemiology of Opportunistic Mold Infections. Clin Infect Dis 2001; 33:1871-8.
34. Girmenia C, Arcese W, Micozzi A, Martino P, Bianco P, Morace G. Onychomycosis as a possible origin of disseminated *Fusarium solani* infection in a patient with severe aplastic anemia. Clin Infect Dis 1992; 14: 1167.
35. Bourgeois GP, Cafardi JA, Sellheyer K and Aleodor AA. Disseminated *Fusarium* originating from toenail paronychia in a neutropenic patient. Cutis 2010; 85(4): 191-4.

36. Nucci M, Anaissie E. Cutaneous infection by *Fusarium* species in healthy and immunocompromised hosts: implications for diagnosis and management. *Clin Infect Dis* 2002; 35: 909-20.
37. Bibashi E, Kokolina E, Sigler L, Sofianou D, Tsakiris D, Visvardis G, et al. Three cases of uncommon fungal peritonitis in patients undergoing peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* 2002; 22: 523–5.
38. Nucci M, Anaissie E. *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20(4): 695-704.
39. Marr KA, Carter RA, Crippa F, Wald A, Corey L. Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 909–17.
40. Nucci M, Anaissie E, 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.
41. Sallaber S, Lori G, Galeppi I. Keratomycosis by *Fusarium dimerum*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1999; 17: 146-7.
42. Pflugfelder SC, Flynn HW Jr, Zwickey TA et al. Exogenous fungal endophthalmitis. *Ophthalmology* 1988; 95: 19-30.

43. Nucci M, Varon AG, Garnica M, Akiti T, Barreiros G, Moritz Trope B et al. Increased Incidence of Invasive Fusariosis with Cutaneous Portal of Entry, Brazil. *Em Infect Dis* 2013; 19(10): 1567-72.
44. Velasco E, Martins CA, Nucci M. Successful treatment of catheter-related fusarial infection in immunocompromised children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995; 14: 697-9.
45. Wadhvani K, Srivastava AK. Fungi from otitis media of agricultural field workers. *Mycopathology* 1984; 88: 155-9.
46. Mascaró J, Vadillo M, Ferrer JE, Carratalá J. Post-traumatic osteomyelitis caused by *Fusarium solani*. *Enfer Infec Microbiol Clin* 1992; 10: 508-9.
47. Wickern GM. *Fusarium* allergic fungal sinusitis. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92: 624-5.
48. Nucci M, Anaissie E. Emerging fungi. *Infect Dis Clin North Am* 2006; 20: 563–79.
49. Nucci M, Marr KA, Queiroz-Telles F, Martins CA, Trabasso P, Costa S et al. *Fusarium* infection in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis*. 2004; 38: 1237–42.
50. Gimeno A, Martins ML. Micotoxinas y Micotoxicosis en Animales y Humanos Special Nutrients, Inc. USA (Ed.) 2003. Talleres graficos del SRL, Buenos Aires (Argentina). pp. 1-160.

51. Marasas WFO. "Fumonisin: Their Implications for Human and Animal Health". *Natural Toxins* 1995; 3:193-8.
52. Soriano del Castillo JM et al. (Director – Coordinador). *Micotoxinas en alimentos*. 2007. Ediciones Díaz Santos. pp 396.
53. Short D, O'Donnell K, Zhang N, Juba JH, Geiser DM. Widespread Occurrence of Diverse Human Pathogenic Types of the Fungus *Fusarium* Detected in Plumbing Drains. *J Clin Microbiol* 2011; 49 (12): 4264-72.
54. O'Donnell K, Sutton DA, Rinaldi MG, Magnon KC, Cox PA, Revankar SG et al. Genetic Diversity of Human Pathogenic Members of the *Fusarium oxysporum* Complex Inferred from Multilocus DNA Sequence Data and Amplified Fragment Length Polymorphism Analyses: Evidence for the Recent Dispersion of a Geographically Widespread Clonal Lineage and Nosocomial Origin. *J Clin Microbiol* 2004; 42 (11): 5109- 20.
55. Zhang N, O Donnell K, Sutton D., Ameena Nalim F, Summerbell R, Padhye A et al. Members of the *Fusarium solani* Species Complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment. *J Clin Microbiol* 2006; 44(6): 2186-90.
56. Arikan S, Lozano-Chiu M, Paetznick V, Nangia S, Rex JH. Microdilution susceptibility testing of amphotericin B, itraconazole, and voriconazole against clinical isolates of *Aspergillus* and *Fusarium* species. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3946-51.

57. Azor M, Gené J, Cano J, Guarro J. Universal *in vitro* antifungal resistance of genetic clades of the *Fusarium solani* species complex. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 51: 1500-03.
58. Azor M, Cano J, Gené J, Guarro J. High genetic diversity and poor *in vitro* response to antifungals of clinical strains of *F. oxysporum*. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63: 1152-5.
59. Tortorano AM, Prigitano A, Dho G, Esposito MC, Gianni C, Grancini A et al. Species distribution and *in vitro* antifungal susceptibility patterns of 75 clinical isolates of *Fusarium* spp. from Northern Italy. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52 (7): 2683-5.
60. Azor M, Gené J, Cano J, Manikandan P, Venkatapathy N, Guarro J. Less-frequent *Fusarium* species of clinical interest: correlaton between morphological and molecular identification and antifungal susceptibility. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 1463-8.
61. Rates SMK. Plants as source of drugs. *Toxicon* 2001; 39: 603-13.
62. Lang G, Buchbauer G. A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungal. A review. *Flavour Fragr J* 2012; 27:13-39.
63. Ringuelet J, Viña S. Introducción a los productos naturales vegetales. En: Ringulet J, Viña S. *Productos Naturales Vegetales*. Editorial de la Universidad de La Plata, Buenos Aires, Argentina 2013; 4-17.
64. Alzate N, López V, Marín H, Murillo A. Evaluación preliminar de la actividad de los aceites esenciales de eucalipto (*Eucalyptus tereticornis*, *Myrtaceae*) y cáscara de

naranja (*Citrus sinensis*, *Rutaceae*) sobre algunos hongos filamentosos. Revista Tumbaga 2009; 4: 59-71.

65. Dambolena J, Meriles JM, López A, Galucci M, González S, Guerra et al. Actividad antifúngica del aceite esencial de cinco especies de *Juniperus* de Argentina. Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas 2011; 19(2): 104-15.

66. Moura Menendez J, Sarmiento Guerra F, Oliveira Pereira F, Pereira de Sousa J, Nogueira Trajano V, Oliveira Lima E. Actividad antifúngica del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* sobre cepas de *Candida tropicalis* de aislados clínicos. Bol. Latinoam Caribe Plant Med Aromat 2012; 11(3): 208-17.

67. Bandoni A, Dellacassa E. Importancia de las plantas aromáticas en el contexto internacional. En: Dellacassa, E. Normalización de productos Naturales Obtenidos de Especies de la Flora Aromática Latinoamericana. Ed Universitária da PUCRS, Porto Alegre, Brasil 2010; 11-5.

68. Barrera Necha L, García Barrera L. Actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium* sp. aislado de papaya. Revista UDO Agrícola 2008; 8 (1): 33-41.

69. Alonso J, Desmarchelier C. Plantas Medicinales Autóctonas de la Argentina. Ed. Literature of Latin American (L.O.L.A.), Buenos Aires, Argentina 2005; 508-14.

70. Lahitte HB, Hurrell JA, Belgrano MJ, Jankowski LS, Haloua P and Mehltreter K. Plantas medicinales rioplatenses. Ed Literatura of Latin America (L.O.L.A.), Buenos Aires, Argentina 1998; 500-6.

71. Soraru SB, Bandoni A. Plantas de la medicina popular argentina. Ed Albatros, Buenos Aires, Argentina 1978; 109-10.
72. Villamil J. El modelo *Lippia alba*. En: Dellacassa, E. Normalización de productos Naturales Obtenidos de Especies de la Flora Aromática Latinoamericana. Ed Universitária da PUCRS, Porto Alegre, Brasil 2010; 97-107.
73. Viana GSB, do Vale TG, Rao VSN, Matos FJA. Analgesic and antiinflammatory effects of two chemotypes of *Lippia alba*: a comparative study. Pharm Biol 1998; 36: 347-51.
74. Blanco M, Colareda G, van Baren C, Bandoni A, Ringuet J, Consolini A. Antispasmodic effects and composition of the essential oils from two South American chemotypes of *Lippia alba*. J Ethnopharmacol 2013; 149(3): 803-9. .
75. Ringuet J, Cerimele E. Buenas prácticas agrícolas para cultivos aromáticos. Su incidencia en la calidad. En: Dellacassa, E. Normalización de productos Naturales Obtenidos de Especies de la Flora Aromática Latinoamericana. Ed Universitária da PUCRS, Porto Alegre, Brasil 2010; 15-37.
76. Ciccio J, Ocampo R. Distribución biogeográfica de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. ex Britton & Wilson y quimiotipos en América y el Caribe. En: Dellacassa, E. Normalización de productos Naturales Obtenidos de Especies de la Flora Aromática Latinoamericana. Ed Universitária da PUCRS, Porto Alegre, Brasil 2010; 107-30.

77. Hennebelle T, Sahpaz S, Dermont C, Joseph H, Bailleul F. The essential oil of *Lippia alba*: analysis of samples from french overseas departments and review of previous works. Chem Biodiv 2006; 3: 1116-25.
78. Stashenko E. Estudio comparativo de la composición y la actividad biológica de aceites esenciales de *Lippia alba* de diferentes regiones de Colombia. En: Dellacassa, E. Normalización de productos Naturales Obtenidos de Especies de la Flora Aromática Latinoamericana. Ed Universitária da PUCRS, Porto Alegre, Brasil 2010; 173-92.
79. Catalán CAN, Merep DJ, Retamar JA. Aceite esencial de *Lippia alba* (Miller) N.E. Brown de la provincia de Tucumán. Riv. Ital. EPPOS. 1977; 59: 513-8.
80. Craveiro A. Óleos essenciais do nordeste do brasil. Do laboratório ao mercado. En: Dellacassa, E. Normalización de productos Naturales Obtenidos de Especies de la Flora Aromática Latinoamericana. Ed Universitária da PUCRS, Porto Alegre, Brasil 2010; 63-97.
81. Cáceres A, Giron L. Actividad antimicrobiana de plantas usadas en el tratamiento de afecciones de la piel y mucosa. Seminario Nacional Medicina Tradicional – Mesoamericano de Etnofarmacología 1987; 3: 104-9.
82. Vale T, Matos FJ, De Lima T, Viana GS. Behavioral effects of essential oils from *L. alba* (Mill.) N.E. Brown chemotypes. J Ethnopharmacol 1999; 167: 127-33.
83. Montiel J, Mesa Arango A, Durán C, Bueno J. Evaluación de la actividad anti – candida y anti- *Aspergillus* de aceites esenciales de *Lippia alba* (Miller) N.E. Brown quimiotipo Carvona Limoneno y su asociación con sus componentes mayoritarios. Scientia et Technica 2007; 13 (33): 243-6.

84. Aguiar JS, Costa MC, Nascimento SC, Sena KX. Atividade antimicrobiana de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). Revista Brasileira de Farmacognosia, 2008; 18(3): 436-40.
85. Ricciardi GAL, Ricciardi AIA, Bandoni AL. Fitoquímica de Verbenáceas (*Lippias* y *Aloysias*) del Nordeste Argentino. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Universidad Nacional del Nordeste, 2000.
86. Li Li, Wang Z, Luo S, Sun X. *In vitro* evaluation of combination antifungal activity against *Fusarium* species isolated from ocular tissues of keratomycosis patients. Am J Ophthalmol 2008; 146: 724-8.
87. Odds FC, Brown JP, Gow AR. Antifungal agents: mechanisms of action. Trends in Microbiol 2003; 11 (6): 272-9.
88. Buell CB, Weston WH. Application of the mineral oil conservation method to maintaining collections of fungous cultures. Am J Bot 1947; 34: 555-61.
89. Elder H. Optimización de Procesos Extractivos aplicados a especies vegetales aromáticas y medicinales. Buenas prácticas de operaciones unitarias. En: Dellacassa E. Normalización de productos naturales obtenidos de especies de la Flora Aromática Americana. Ed Universitária da PUCRS, Porto Alegre, Brasil 2010; 37-63.
90. Cueto Wong MC, Rivas Morales C. Determinación del efecto antifúngico del aceite esencial y diferentes extractos de orégano (*Lippia berlandieri* Schauer) sobre el desarrollo de *F. oxysporum* aislado de plantas de tomate. 3° Reunion Nacional sobre orégano. México, 2007.

91. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi—Second Edition: Approved Standard M38-A2. CLSI, Wayne, PA, USA, 2008.

92. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Antifungal Disk Difusión Susceptibility Testing of Non dermatophyte Filamentous Fungi- Approved Standard M51-A. CLSI, Wayne, PA, USA, 2010.

93. Espinel-Ingroff A, Canton E, Gibbs D, Wang A. Correlation of *Neo-Sensitabs*® tablet diffusion assay results on three different agar media with CLSI broth microdilution M27-A2 and disk diffusion M44-A results for testing susceptibilities of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B, caspofungin, fluconazole, itraconazole, and voriconazole. J Clin Microbiol, 2007; 45: 858-64.

94. Pfaller M, Boyken L, Messer S, et al. Evaluation of the *E-test*® 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.

95. Ochiuzzi M, Santiso G, Arechavala A. Correlation of *E-test*® and *Neo-Sensitabs*® diffusion assays on Mueller-Hinton-methylene blue agar with broth microdilution reference method (CLSI-M27-A2) for testing susceptibilities of *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B and fluconazole. Med Mycol 2010; 48: 893–6.

96. Cantón E, Peman J, Sastre M, Valentín A, Bosch M, Espine-Ingroff A. Evaluación y utilidad de los métodos *E-test*® y *Neo-Sensitabs*® para estudiar la sensibilidad de las levaduras al fluconazol. Rev Esp Quimioterap 2006; 19 (3): 267-74.

97. Al-Wathiqi F, Ahmad S, Khan Z. Molecular identification and antifungal susceptibility profile of *Aspergillus flavus* isolates recovered from clinical specimens in Kuwait. *BMC Infectious Diseases* 2013, 13:126.
98. Nelson PE, Tousson TA, Marasas WFO. *Fusarium* species, An illustrated Manual for Identification. The Pennsylvania State University Press; 1983. 193 pp.
99. Munkvold G, McGee DC, Carlton WM. Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology* 1997; 87: 209-17.
100. Guarro J, Pujol I, Mayayo E. In vitro and in vivo experimental activities of antifungal agents against *Fusarium solani*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1256-7.
101. Mesa - Arango AC, Montiel – Ramos J, Zapata B, Durán C, Betancur – Galvis L, Stashenko E. Citral and Carvone chemotypes from the Essentials oils colombian *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 2009; 104 (6): 878-4.
102. Khan M, Ahmad I. Antifungal activity of Essentials oil and their synergy with fluconazole against drug-resistant strains of *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011; 90:1083-94.
103. Cuenca-Estrella M. Combinations of antifungal agents in therapy—what value are they? *J Antimicrob Chemother* 2004; 54: 854-60.

104. Vitale RG, Afeltra J, Dannaoui E. Antifungal combinations. In: Ernst EJ, Rogers PD (eds). *Methods in molecular medicine. Antifungal agents: methods and protocols*. Humana Press Inc, Clifton 2005; 143–52.