



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

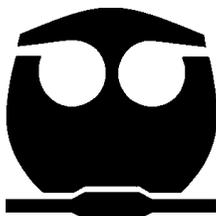
**ESTUDIO DE IDENTIFICACIÓN POR ANÁLISIS
MICROMORFOLÓGICO DE CEPAS DE
ZIGOMICETOS Y REPORTE DE SUSCEPTIBILIDAD
ANTIFÚNGICA IN VITRO**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA:

MARÍA TERESA RAMÍREZ SÁNCHEZ



MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Abel Gutiérrez Ramos
VOCAL: Profesor: José Alejandro Bonifaz Trujillo
SECRETARIO: Profesor: Misael González Ibarra
1er. SUPLENTE: Profesor: Alejandro Camacho Cruz
2° SUPLENTE: Profesora: Beatriz Ruiz Villafán

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO,
DR. BALMIS NO. 148, COL. DOCTORES, DELEGACIÓN CUAUHTÉMOC
06726, MÉXICO, D.F.**

ASESOR DEL TEMA: QFB. J. ALEXANDRO BONIFAZ TRUJILLO _____

SUPERVISOR TÉCNICO: QFB. JAVIER ARAIZA SANTIBÁÑEZ _____

SUSTENTANTE: RAMÍREZ SÁNCHEZ MARÍA TERESA _____

Agradecimientos

A Laura Concepción Ramírez y a Magdalena Ramírez,
a quienes unas cuantas líneas no serían suficientes.

A mis papás José y Teresa por que gracias a ellos llegué a este punto.

A mis hermanos Ismael y Alba por sus consejos y por escucharme.

A mis tías Mary, Juana y Lupita por su constante apoyo.

A mis maestros de la Facultad:

Alexandro Bonifaz, por su invaluable ayuda personal y académica.

Abel Gutiérrez y Enrique Amador, por escucharme, aconsejarme,
y brindarme su tiempo y amistad.

A mis profesores de la Secundaria 426 quienes me transmitieron el gusto por el estudio: Juan Carlos Solache, Marco Antonio Hernández, José Gandarilla, Jaime Pérez, Norma Cruz, Margarita López, Esthela Martínez, Edith Hernández, y Rafael Nieto.

A mi gente del Hospital General Javier Araiza y Marco Antonio Hernández, a quienes no podría expresar lo mucho que agradezco su presencia, sus enseñanzas, su apoyo y todo.

A mis amigos, a quienes me han aceptado, soportado, escuchado, alentado, aconsejado ayudado y lo demás:

Los de la preparatoria: Diana Tamariz, Itzel Espinosa, Alejandra Abrego, Leonardo Cerón y Ludwig Rosell.

Los de la Facultad: Karla Ortiz, Mayte Santafé, Jaime Lezama, Stephanie Soriano, Tania González, Teresita Rode y Berenice Martínez.

Los del Hospital: Mary Jose Gutiérrez, Enrique Argumedo, Ángel Romero, Alexis Champagnon, Margarita Méndez, Alma Flores, Carine Dumollard y Vera Vega.

Índice

	Página
Introducción	2
Objetivos	3
Hipótesis	3
Marco teórico	4
Material	22
Metodología	23
Resultados	25
Discusión	58
Conclusiones	67
Bibliografía	69

Introducción

La mucormicosis o llamada también zigomicosis, es una micosis ocasionada por hongos del orden de los *Mucorales*, que se comportan como patógenos oportunistas en pacientes que presentan enfermedades o procesos debilitantes principalmente diabetes mellitus descompensada y enfermedades hematológicas (en especial con neutropenia), así como en aquellos en que la barrera cutánea haya sido dañada. A pesar que la morbilidad es baja, la mortalidad es muy alta.^{1,2}

El éxito en la terapia consiste en un diagnóstico rápido, control del proceso concomitante, desbridamiento quirúrgico y tratamiento adecuado, siendo anfotericina B el único aceptado por la FDA y las principales guías terapéuticas para el control de la mucormicosis.¹

El principal agente etiológico es *Rhizopus oryzae*¹ seguido por *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*², sin embargo, también puede ser ocasionada por otros agentes como son *Rhizopus microsporus* var. *microsporus*, *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*, *Lichtheimia corymbifera* (antes *Absidia corymbifera*), *Mucor* spp, *Rhizomucor pusillus*, *Cunninghamella bertholletiae*, *Apophysomyces elegans* y *Saksenaea vasiformis*³. Estudios *in vitro* de los agentes etiológicos de la mucormicosis muestran que éstos presentan distinta susceptibilidad hacia diferentes antimicóticos, teniendo especial actividad anfotericina B y posaconazol.¹

Con base en lo anterior, es importante aprender a observar y diferenciar los distintos mucorales, a través de las características macro y micromorfológicas, de manera que dicha clasificación constituya una guía para una mejor elección del tratamiento.

Objetivos

- Identificar género y especie de los principales agentes de mucormicosis mediante técnicas de micromorfología, protocolizando las técnicas de identificación, de acuerdo con reportes en la literatura.
- Analizar la variabilidad en la susceptibilidad a los antifúngicos en los diferentes agentes de la mucormicosis

Hipótesis

- El análisis micromorfológico y de pruebas de termotolerancia son pruebas que permiten identificar de manera confiable por cualquier persona con conocimientos básicos de micología a los principales agentes causales de mucormicosis.
- Los diferentes agentes de la mucormicosis presentarán distintos espectros de susceptibilidad, siendo especialmente activo contra ellos la anfotericina B, seguida del posaconazol.

Marco teórico

Planteamiento del problema

Durante el diagnóstico de laboratorio de una mucormicosis, es sumamente importante la correcta identificación de el agente causal ya que, al presentar diferentes patrones de susceptibilidad frente a los antifúngicos disponibles, una mala tipificación puede ser causa de un fracaso terapéutico, ello hace indispensable el contar con un documento que protocolice de manera adecuada la identificación de los agentes, por otra parte es necesario conocer si los patrones de susceptibilidad en las cepas estudiadas corresponden con los reportes de la literatura.

Mucormicosis.

La mucormicosis es una micosis cosmopolita ocasionada por hongos oportunistas que pertenecen al orden *Mucorales*.¹

La mucormicosis es la micosis más aguda y de rápida progresión que se conoce.¹

Factores predisponentes. Entre éstos los más importantes son:

- Diabetes mellitus (en estado cetoacidótico) este factor tiene especial relación con la mucormicosis rinocerebral.^{1, 2}
- Enfermedades hematológicas (neutropenia, leucemia y linfomas) tienen relación con la variedad pulmonar.¹
- Transplantes de órganos (relacionados con mucormicosis pulmonar).²
- Uso de deferoxamina (relacionado especialmente con mucormicosis diseminada).²
- Malnutrición (para casos gastrointestinales).
- Traumas, catéteres y sitios de inyección (para los casos de mucormicosis primaria cutánea).¹

Patogenia. Para el establecimiento de dicha enfermedad es de suma importancia:

- Que los mecanismos de defensa estén alterados, especialmente la actividad de neutrófilos y macrófagos.³
- La presencia de iones de hierro sérico (Fe^{2+}). La adquisición de hierro es un paso crítico en el mecanismo de patogenicidad de los organismos. Si el medio es ácido, como en el caso de los pacientes con cetoacidosis diabética, los iones hierro se disocian de la transferrina y estimulan el desarrollo de los mucorales.¹

Por lo tanto el daño en el paciente ocurre de manera coordinada, es decir, los defectos de migración de macrófagos, la baja de neutrófilos o defectos en su funcionalidad, la acidosis (diabetes) permiten el rápido crecimiento fúngico.¹ Además Abramson y Mc Multy⁴ demostraron que algunas cepas de *Rhizopus* tienen un sistema enzimático cetona-reductasa, el cual presenta su máxima actividad a un pH ácido y con una concentración elevada de glucosa; el proceso termina con daño a las células endoteliales permitiendo

una rápida angioinvasión y trombosis de vasos, con la subsecuente necrosis y diseminación de la infección fúngica.¹

Clínica. Las formas clínicas más comunes son:¹

- Rinocerebral
- Pulmonar
- Gastrointestinal
- Cutánea
- Diseminada
- Miscelánea

Diagnóstico de laboratorio. Se realiza con exámenes en fresco o directos, de las zonas de necrosis, exudados, secreciones nasales, esputos, lavados bronquiales, etc. aclarando la muestra con KOH al 10%, en el cual se observan hifas gruesas, hialinas, cenocíticas, dicotómicas; esta imagen se considera patognomónica. Los cultivos son de poca importancia diagnóstica al tratarse de hongos que pueden formar parte de la flora del paciente, además son contaminantes frecuentes en el laboratorio. La importancia de los cultivos es hallar al agente etiológico (identificando al agente en base a criterios micromorfológicos) por lo que es necesario hacer cultivos repetidos, el medio más usado es agar dextrosa de Sabouraud (no se usa Sabouraud con antibióticos pues la cicloheximida inhibe el crecimiento de este tipo de hongos) con un periodo de incubación de tres a cinco días a temperatura ambiente (25 a 28°C).¹

La identificación de *Mucorales* se puede realizar con otras técnicas que requieren de material especial como cepas de referencia para identificar por formación de zigosporas (reproducción sexuada) o por PCR y posterior secuenciación.

Tratamiento. Hay cuatro factores críticos para controlar la mucormicosis: un diagnóstico rápido, control del factor predisponente (principalmente cetoacidosis diabética), desbridamiento quirúrgico apropiado del tejido infectado y terapia antifúngica.

El tratamiento de elección es la anfotericina B (en dosis de 0.25 a 0.75 mg/Kg/día) y cuando se usa las formas lipídicas o coloidales hasta 3-5 mg/Kg/día.¹

Para una selección apropiada del tratamiento se pueden realizar técnicas de susceptibilidad *in vitro* de la cepa en cuestión, la técnica más usada es la técnica de microdilución en caldo del documento M 38-A.

Terapia coadyuvante. Como terapia coadyuvante se puede usar oxígeno hiperbárico^{1, 3}, defasirox⁵, citocinas que inducen la actividad fagocítica, como interferón gamma (INF γ) y el factor estimulante de colonias de macrófagos (GM-CSF)⁶⁻⁸

Medidas profilácticas. Es importante resaltar que cuando se tengan pacientes diabéticos descompensados o con enfermedades hematológicas como neutropenia, leucemia o linfoma, las medidas profilácticas deben ser las mismas que con cualquier paciente inmunodeprimido, como el aislamiento en áreas estériles, incluso es aconsejable el empleo en dosis bajas de antimicóticos sistémicos de bajos efectos colaterales: como posaconazol, fluconazol e itraconazol.¹

Micología

Dentro del reino *Fungi*, de acuerdo a la clasificación de Hibbett *et al*⁹ (2007), se encuentra el *subphylum Mucoromycotina* (antes *Phylum Zygomycota*) que contiene a los hongos que producen mucormicosis, estos se encuentran en el orden de los *Mucorales*.¹

El orden de los *Mucorales* está constituido por seis familias de interés patogénico:³

- *Mucoraceae*: dentro de esta familia miembros del género *Rhizopus*, *Mucor*, *Lichtheimia*, *Rhizomucor* y *Apophysomyces* causan enfermedades a los humanos.³
- *Mortierellaceae*: (patógeno en bovinos)³, en la clasificación de Hibbett *et al*⁹, se halla en el nuevo orden *Mortierellales*.
- *Cunninghamellaceae*³
- *Saksenaseae*³
- *Syncephalastraceae*³
- *Thamniaceae*: dentro de esta familia se encuentra *Cokeromyces recurvatus*³

Los mucorales (zigomicetos) son un grupo de hongos holomórficos (que presentan estados anamórficos y teleomórficos).¹

La reproducción teleomórfica o sexuada se realiza a través de zigosporas (cigosporas), la mayoría de los mucorales son heterotálicos por lo que requieren la presencia de hifas fisiológicamente distintas (provenientes de dos cepas), éstas deben ser compatibles: una donadora (+) y otra receptora (-). La producción de zigosporas homotálicas se da en *Rhizomucor mihei* y en *Cokeromyces recurvatus*³ De la unión de las dos hifas surge, mediante fenómenos de plasmogamia, el nuevo hongo (a partir del huevo o zigospora).¹

La formación de las zigosporas ocurre cuando ramificaciones especializadas (sexualmente orientadas) de la hifa, llamadas zigóforos, son atraídas a otras. El zigóforo desarrolla, cerca de su extremo, micelio de rápido crecimiento que secreta atrayentes químicos, dos zigóforos se acercan y al estar en contacto se hinchan, formando el progametangio, al fusionarse dan

lugar al gametangio, que sufre plasmogamia (mezcla de citoplasmas) y cariogamia (mezcla de núcleos). La pared se vuelve delgada, con múltiples capas y da lugar al zigospangio.³

Las zigosporas pueden ser usadas para identificar especies en *Mucorales*, pero no resulta posible en la práctica rutinaria de un laboratorio debido a la necesidad de contar con cepas de referencia de cada género y especie, cepas que se encuentran solo en laboratorios de referencia.³

La reproducción anamórfica o asexuada es a través de esporangiosporas, y es el tipo de reproducción que se obtiene en los medios de cultivo rutinarios; las esporangiosporas, las estructuras especializadas y la modalidad de micelio que se encuentran en esta fase son de utilidad para la identificación morfológica de los mucorales.

La mayoría de los mucorales crecen en medios ordinarios como agar dextrosa Sabouraud (ADS). El tipo de colonias que forman son indistinguibles a simple vista y se requiere, para la identificación, de las características micromorfológicas, resistencia térmica y algunas pruebas bioquímicas. Las colonias se desarrollan entre 48 y 72 horas a temperatura ambiente (25 a 28°C).¹

Mientras la mayoría de los miembros de la familia *Mucoraceae* esporulan rápidamente en un medio estándar como ADS, *Rizopus schipperae*, *Apophysomyces elegans* y *Saksenaea vasiformis* pueden producir únicamente hifas estériles bajo las condiciones ordinarias de cultivo. Para que la esporulación de estas especies sea estimulada se requiere someterlas a condiciones mínimas de nutrientes, después de esto es posible identificar a dichas especies por sus características microscópicas.³

Micromorfología: los mucorales tienen hifas macrosifonadas, gruesas (10 a 20µm), cenocíticas características del género las cuales sostienen la forma de reproducción asexuada por medio de estructuras denominadas esporangióforos;¹ éstos pueden ensancharse en su interfase con el esporangio, este proceso se conoce como apófisis, el esporangióforo puede protruir dentro del esporangio formando la columnela. En el esporangio ocurre la formación de

las esporangiosporas por la división del protoplasma.³ En algunas cepas se observan modalidades de micelio como rizoides o estolones¹ (el estolón, cuando esté presente, forma parte del micelio vegetativo y se extiende entre dos grupos de rizoides).³

Rhizopus

Esta compuesto por micelio macrosifonado, grueso, cenocítico, no ramificado con abundantes rizoides, de los que se forma inmediatamente el esporangio (100-200µm), con esporangiosporas normalmente estriadas (6-8µm). La mayoría de las ramificaciones parten del rizoide, las hifas casi no se ramifican, la columela es ovoide; dependiendo de la especie puede haber estolones (puentes de comunicación entre rizoides).¹

Se considera que hay siete especies y variedades de *Rhizopus* que pueden ocasionar enfermedades en humanos:³

- *R. oryzae*
- *R. azigosporus*
- *R. microsporus* var. *microsporus*
- *R. microsporus* var. *oligosporus*
- *R. microsporus* var. *rhizopodiformis*
- *R. schipperae*
- *R. stolonifer*

R. stolonifer ha sido raramente implicado como patógeno en humanos, pero ha sido detectado en casos de alveolitis alérgica, y dado que es un contaminante común dentro del laboratorio es importante diferenciarlo de otras especies de *Rhizopus*.^{2, 10, 11}

Las especies oportunistas más importantes son: *R. oryzae* y *R. microsporus* var. *rhizopodiformis*.^{1, 3}

Ibrahim *et al*¹² reportan que tanto las esporas como las hifas de *R. oryzae* pueden ocasionar daño en células endoteliales, y que este daño es dependiente del inóculo y del tiempo. Además el daño ocasionado a estas células requiere que *R. oryzae* sea fagocitado, dicho daño se observa incluso sin que se requiera viabilidad del hongo. Esto, mencionan, podría explicar el hecho de que este organismo sea refractario en los pacientes.¹²

Mucor

Está compuesto por micelio macrosifonado, grueso, cenocítico, no posee rizoides ni estolones y se ramifica para formar sus esporangios, que en comparación con los de *Rhizopus*, son más pequeños y redondos (20-80µm), la columela es ovoide, las esporangiosporas son redondas y miden de 3 a 5µm; en algunas ocasiones se observan con múltiples clamidoconidios sobre todo cuando las cepas han sido resembradas. Una propiedad distintiva de *Mucor* es el dimorfismo demostrado en algunas especies como: *M. rouxii* y *M. racemosus* fenómeno dependiente de la concentración de bióxido de carbono y algunas sustancias hormonales.¹ *M. circinelloides* presenta estructuras en forma de levadura cuando se siembra en caldo infusión-cerebro corazón (BHI) a 37°C.¹³

Las especies de *Mucor* que causan enfermedad en humanos incluyen:³

- *M. circinelloides*
- *M. hiemalis*
- *M. indicus* (*M. rouxianus*)
- *M. ramosissimus*
- *M. racemosus*

Las especies oportunistas más importantes son: *M. circinelloides*¹³, *M. indicus* y *M. ramosissimus*.^{1, 3}

***Lichtheimia* (antes *Absidia*)**

Está compuesto por micelio macrosifonado, grueso cenocítico, con escasos y pequeños rizoides, sus esporangios son pequeños (10-70µm) y las esporangiosporas que forma son de 2 a 4µm, los esporangióforos suelen ramificarse a cierta distancia del rizoide¹ además crecen entre los rizoides y no directamente encima de ellos (como en el caso de *Rhizopus*), tiene una columela piriforme y tiene una apófisis característica al terminar el esporangióforo.

Su producción de sideróforos es considerado un factor de virulencia.³

L. corymbifera puede causar mucormicosis cutánea en pacientes sin compromiso inmunológico, que han sufrido traumas en accidentes en los que se presenta contacto piel-suelo.¹⁴

La especie más importante es *L. corymbifera*^{1, 3} aunque también se ha reportado a *L. ramosa* como patógena en humanos.¹⁵

Pruebas de susceptibilidad *in vitro* han reportado para *L. corymbifera* concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de anfotericina B menores que las reportadas para *Rhizopus* spp., *Rhizomucor* spp. y *Mucor* spp.¹¹

Rhizomucor

Presenta características similares a *Mucor*, sin embargo, tiene pequeños rizoides.¹ Otra característica que puede diferenciarlo de *Mucor* es la máxima temperatura de crecimiento ya que *Rhizomucor* es termófilico.³

Los rizoides, pobremente formados, se encuentran entre, y no en la base de los esporangióforos, esta característica lo distingue de *Rhizopus*, cuyos esporangióforos nacen directamente arriba de los rizoides.

Las especies oportunistas más frecuentes son: *R. pusillus*¹ y *R. miehei*, este último no ha sido descrito como patógeno humano.³

Apophysomyces

En medios ordinarios (ADS) produce micelio estéril; en medios pobres en nutrientes se observa micelio macrosifonado, delgado, no ramificado, con raíces rudimentarias, el esporangio es piriforme (10x40µm), con una columnela y apófisis en forma de embudo, las esporangiosporas son cilíndricas.^{1, 3}

La especie más importante es *A. elegans*.^{1, 3} Alvarez *et al*⁶ proponen que *Apophysomyces elegans* es un complejo que contiene como nuevas especies *A. ossiformis*, *A. trapeziformis* y *A. variabilis*, especies que son diferentes filogenética, morfológica y fisiológicamente.¹⁶

Se ha reportado que *A. elegans* puede ocasionar infección invasiva y rino-órbito-cerebral en pacientes inmunocompetentes.^{6, 17, 18} Las infecciones con *A. elegans* son, en su mayoría, resultado de inoculaciones traumáticas.¹⁶

En estudios de susceptibilidad *in vitro* se ha reportado resistencia de *A. elegans* hacia anfotericina B.^{9, 19}

Mortierella

Sus colonias son diferentes a las de otros mucorales, es decir no presentan tanto micelio. Micromorfológicamente tiene hifas macrosifonadas, delgadas, cenocíticas (en raras ocasiones con septos). No forman rizoides sus esporangios no poseen columnela y miden entre 20 y 80µm, con esporangiosporas de 2 a 4µm.¹

La especie oportunista más importante es *M. wolfii*.^{1, 3} *M. wolfii* es considerado patógeno bovino, y causa de aborto, placentitis, encefalitis e infecciones pulmonares en vacas. En la literatura no se encuentran casos probados en los que *Mortierella* sea patógeno humano.³

Cokeromyces

Está formado por micelio macrosifonado, cenocítico, esporangióforo predominantemente no ramificado que sostiene una vesícula, de ella nace un esporangiole que es sostenido por un tallo llamado esterigmata recurvado y largo; cada esporangiole contiene de 12 a 20 esporangiosporas. No presenta rizoides.³

Los sitios de donde se ha aislado *Cokeromyces recurvatus* en humanos son la vagina, el cérvix, la vejiga,³ el fluido pleural y peritoneal.²⁰

C. recurvatus es un mucoral dimórfico, en el directo de la muestra presenta una morfología similar a la fase levaduriforme de *Paracoccidioides brasiliensis* (células alargadas levaduriformes con una o múltiples gemaciones).³ Ryan *et al*²¹ reportan una forma parasitaria (en pulmones) semejante a la de *Coccidioides immitis* (esférulas, con pared gruesa, no gemantes).²¹ En ningún caso de infección con este hongo se han encontrado filamentos.³

Cunninghamella

Constituida por micelio macrosifonado, cenocítico, no tiene rizoides, algunas cepas forman hifas pectíneas¹ los esporangióforos terminan en una vesícula, los esporangiolos (unicelulares a diferencia de *Cokeromyces recurvatus*) nacen de las vesículas sobre pequeños tallos llamados esterigmata. A menudo se observan clamidoconidios.³

La especie oportunista más importante es *C. bertholletiae*^{1, 3} aunque también se ha reportado a *C. echinulata* como patógeno en humanos.²²

La mayor parte de casos de mucormicosis ocasionados por *C. bertholletiae* involucran senos y pulmones como sitio primario de infección.³

Pruebas de susceptibilidad *in vitro* han reportado, para *C. bertholletiae*, una alta resistencia hacia anfotericina B.^{9, 19, 23-25}

Según el estudio de Roden *et al*² la infección con *Cunninghamella* es un factor de riesgo importante para mortalidad en pacientes con mucormicosis.²

Saksenaea

En medios ordinarios (ADS) produce micelio estéril; en medios pobres en nutrientes se observa micelio macrosifonado, grueso, corto y cenocítico; tiene rizoides, pero estos están casi pegados al esporangio (10-20µm), sus esporangiosporas son pequeñas.³

La única especie oportunista reportada es *Saksenaea vasiformis*.^{1, 3}

La mayor parte de casos en los que ha sido reportado este agente, ocurre en pacientes inmunocompetentes posterior a una inoculación traumática²⁶ aunque también se le ha reportado en mucormicosis diseminada y en mucormicosis rino-órbito-cerebral.²⁷

Syncephalastrum

Formado por micelio macrosifonado, cenocítico, no tiene rizoides y sus hifas terminan en un esporangióforo que se ensancha para formar una vesícula que mide de 20 a 30µm que está rodeada por estructuras llamadas merosporangios (una especie de saco), en los que se desarrollan las esporangiosporas dispuestas en cadenas largas.³

Es un agente que raramente se ha asociado a mucormicosis, en 1980 se reportó el primer caso de una infección cutánea en un paciente masculino de 50 años con diabetes como factor predisponente³; otro caso fue reportado en 2005 de una mucormicosis intraabdominal, ocasionada por una herida²⁸ ambos comprobados por el hallazgo de hifas cenocíticas no septadas y el respectivo cultivo.

La única especie conocida es *Syncephalastrum racemosum*.^{1, 3}

Identificación de hongos por técnicas moleculares

La característica para discriminar individuos, cepas, especies y géneros es la secuencia de nucleótidos de moléculas de ADN que llevan la información genética.

Las técnicas genéticas utilizadas en la identificación de especies y géneros de hongos comprenden:²⁹

- **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):** con la que se logra tener un gran número de copias de un fragmento de ADN específico. Esta técnica consta de tres etapas:
 - 1) Desnaturalización del ADN a temperatura mayor a 90°C.
 - 2) Unión específica de los cebadores a las cadenas sencillas mediante complementariedad de bases.
 - 3) Extensión de la cadena de ADN a copiar a partir de los cebadores.
- **Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP):** permite diferenciar los microorganismos mediante el análisis de patrones de bandas derivados de la ruptura de su ADN, estos patrones se originan debido a la actividad de enzimas endonucleasas de restricción.
- **Polimorfismo en la conformación de cadenas sencillas (SSCP):** Se basa en la relación entre la movilidad electroforética de una hebra de ADN monocatenario y su conformación, que es reflejo de su secuencia nucleotídica.
- **Polimorfismo de ADN con cebadores arbitrarios (RAPD):** basado en la amplificación simultánea de múltiples fragmentos de ADN mediante PCR utilizando un único cebador con secuencia elegida al azar, utilizando una temperatura de alineamiento baja, lo que favorece la poca especificidad. Los fragmentos se analizan por electroforesis. El número y tamaño de fragmentos se mantiene constante si se usa el mismo cebador y se hace en las mismas circunstancias.

Estas herramientas son de utilidad para estudios genéticos y filogenéticos así como para estudios epidemiológicos y diagnósticos de hongos involucrados en infecciones micóticas.²⁹

Identificación de *Mucorales*

El análisis de ADN, especialmente ribosomal (rADN), es útil para la identificación de *Mucorales*.

El rADN es una secuencia de ADN contenida en los cromosomas del nucléolo que codifica ARN ribosómico. Estas secuencias regulan la transcripción e iniciación de la amplificación y contienen segmentos espaciadores transcribibles (ITS) y no transcribibles.

El método de elección para identificación de *Mucorales* a nivel de especies, en cultivo, es la amplificación por PCR de la región ITS (ITS1-5.8S-ITS2) seguida de la secuenciación de la misma.^{15, 30}

Se han descrito técnicas de identificación de *Mucorales* para el diagnóstico de mucormicosis que incluyen la amplificación por PCR de la secuencia 18S rARN, seguida de identificación por SSCP, que permite diferenciar infecciones causadas por *Rhizopus*, de las ocasionadas por otros hongos.³

Machouart *et al*³¹ acoplan PCR (amplificando la secuencia 18S rARN) con RFLP, diferenciando *Rhizopus* spp., *Rhizomucor* spp., *Mucor* spp. y *Lichtheimia corymbifera*.

Chakrabarti *et al*¹⁸ describen un técnica en la que acoplan PCR-RFLP para una rápida identificación de *A. elegans*. Jane Hata *et al*³² refieren una técnica, para identificación de *Mucorales*, en la cual se amplia el gen citocromo b que se encuentra en *Lichtheimia*, *Apophysomyces*, *Cunninghamella*, *Mucor*, *Rhizopus* y *Saksenaea* spp.

Dannoui *et al*³⁰ presentan la identificación de *Mucorales* usando amplificación por PCR de la región ITS y posterior secuenciación con muestras de tejido de cerebro y riñón (fijado con formalina y embebido en parafina) de ratones infectados con *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus microsporus*, *L. corymbifera*, *Rhizomucor pusillus* y *Mucor circinelloides*, obteniendo, a excepción de *M. circinelloides*, que a mayor cantidad de muestra (1, 10 y 30 cortes) mejoraba la

detección de los *Mucorales* por PCR en dicho tejido así como una correcta identificación 93, 98 y 100% para 1, 10 y 30 cortes respectivamente.

Álvarez *et al*²² reportan la identificación de 190 *Mucorales*, identificados previamente por método morfológicos, por secuenciación de la región de los ITS del rADN obteniendo una coincidencia de 96.2 % a nivel especie y 100% a nivel género. También mencionan que en su método *Mucor circinelloides* presenta de 99 a 100% de similitud con *Rhizomucor variabilis* var. *regularior*.

Estas técnicas ayudarían a realizar el diagnóstico de mucormicosis así como a obtener el agente etiológico en un menor tiempo que los cultivos, que requieren un mínimo de 48 horas para su identificación.

Antifúngicos frente a *Mucorales*

Para el tratamiento de la mucormicosis el antifúngico de elección es la **anfotericina B** (en dosis de 0.25 a 0.75 mg/Kg/día).¹

Actualmente existen cuatro tipos de anfotericina B disponibles en el mercado:

- anfotericina B desoxicolato (AnBD)
- anfotericina B lipídica
- anfotericina B liposomal (LAmB)
- anfotericina B de dispersión coloidal (complejo colesteril-sulfato).¹

La anfotericina B desoxicolato (AnBD) es un macrólido poliénico del tipo heptaeno, contiene una micosamina unida al C-19. Actúa como fungistático y fungicida a nivel de membrana celular adhiriéndose a los esteroides de la membrana fúngica. Deja poros y espacios membranosos, causa lisis y muerte celular.¹ Como mecanismo indirecto la anfotericina B estimula la vía oxidativa en la respuesta inmune, la estimulación de los macrófagos por la anfotericina B incrementa la producción de peróxido de hidrógeno y de radicales libres.³ El principal efecto secundario crónico es la nefrotoxicidad.

Las formulaciones lipídicas de anfotericina son significativamente menos nefrotóxicas que AnBD y pueden ser seguramente administradas a mayores dosis y un mayor periodo de tiempo.³³

LAmB es menos nefrotóxica que AnBD, también presenta mejor penetración en el parénquima cerebral superior a la de AnBD y al complejo lipídico, la dosis de LAmB recomendada es de 5-10mg/Kg/día.³⁴ Ibrahim *et al*³³

reportan un experimento en el que comparan la acción de AnBD contra la de LAmB en un modelo diabético murino con mucormicosis diseminada ocasionada por *R. oryzae* (principal agente etiológico); después de evaluar la toxicidad de ambas formulaciones eligieron las dosis diarias de 0.5mg/Kg para AnBD, y de 7.5mg/Kg para LAmB; obtienen un porcentaje mayor de supervivencia (a los 12 días) en los tratados con LAmB (90%), en comparación con los tratados con AnBD (67%).³³

El **posaconazol** es un triazol que actúa como fungistático, a nivel de la membrana celular, inhibiendo a la 14 α -esterol-desmetilasa generando una membrana defectuosa que pierde la capacidad de permeabilidad.¹ Frente al posaconazol la mayoría de los *Mucorales* presenta buena susceptibilidad (solo superada por anfotericina B).^{10, 19, 23, 24, 37-41} Diversas cepas de *R. oryzae* tienen CMI₅₀ (concentración mínima inhibitoria) de 0.251-4 μ g/mL y la CMI₉₀ es de 1-4 μ g/mL.⁴¹ En la actualidad se considera que es el derivado triazólico con mejor actividad. La dosis recomendada es de 800 mg/día dividida en cuatro tomas, lo que mejora la absorción.¹ El posaconazol es una opción razonable para pacientes con mucormicosis refractaria o que son intolerantes a los polienos.^{42, 34, 43-49} Tobon *et al*⁴⁵ reportan un caso de mucormicosis postoperatoria en un paciente con trasplante de corazón y riñón que no mejoró con anfotericina B, a quien se le dio como terapia de rescate posaconazol. Paul *et al*⁴⁷ reportan un caso de mucormicosis pulmonar resistente hacia LAmB, causada por *C. bertholletiae*, que tuvo un buen resultado con la combinación de resección quirúrgica y posaconazol.⁴⁷ El posaconazol también ha sido reportado como una opción para el tratamiento de salida para pacientes, con mucormicosis, que han respondido bien con anfotericina B.⁴⁴

A pesar de que las **equinocandinas** parecen no tener actividad *in vitro* como únicos agentes contra la mucormicosis Ibrahim *et al*³⁵ reportan que *R. oryzae* expresa una enzima blanco para equinocandinas (antifúngicos inhibidores de la síntesis de 1,3 β D glucano sintasa).³⁵ Además la combinación del complejo lipídico con equinocandinas puede beneficiar en la terapia según estudios retrospectivos de Reed, Bryant e Ibrahim.^{34, 36}

El **voriconazol** no se recomienda para tratamiento, de hecho su administración puede ser contraproducente, algunos autores lo han relacionado

como un factor de predisposición sobre todo cuando se usa como profiláctico en cuadros de inmunosupresión como los pacientes con enfermedades hematológicas,⁵⁰ en especial aquellos que han recibido trasplante de células madre hematopoyéticas.^{1, 51, 52} Se sugiere que este medicamento tiene buena acción contra *Candida* spp., *Scedosporium* spp. y *Aspergillus* spp; por lo que la inhibición de esta flora puede hacer que los mucorales se desarrollen con más facilidad.^{1, 50}

Para obtener la susceptibilidad *in vitro* del agente etiológico se deben tener en cuenta los siguientes criterios¹:

1. Una CMI no es una medición física o química.
2. Ciertos factores del paciente son más importantes que los resultados de las pruebas de susceptibilidad en la determinación de la evolución clínica.
3. La susceptibilidad *in vitro* no siempre predice el éxito en una terapia específica.
4. La resistencia *in vitro* con frecuencia se correlaciona con fracaso en el tratamiento.

El método M38-A detalla la metodología de macro y microdilución en caldo para la determinación de susceptibilidad en los hongos más comunes que causan micosis invasivas, entre ellos *Rhizopus* spp.¹ Contiene información sobre:⁵³

- **Composición del medio de cultivo:** medio sintético RPMI-1640 con glutamina, sin bicarbonato y con rojo de fenol como indicador de pH.
- **Buffer:** se recomienda el uso de MOPS (ácido 3-N-propanosulfónico) a una concentración de 0.165mol/L para un pH de 7.
- **Preparación de antifúngicos:** las soluciones madre deben estar preparadas en concentración de mínimo 1280µg/mL o diez veces la más alta concentración a probar. Para agentes antifúngicos que no pueden prepararse en agua como ketoconazol, anfotericina B o itraconazol se prepara la solución madre a una concentración 100 veces mayor a la más alta a probar, en un solvente adecuado, los solventes

más usados son: dimetilsulfóxido grado analítico (DMSO) alcohol etílico, polietilenglicol y carboximetilcelulosa.

Tabla 1 Rangos de concentración de antifúngicos.

Antifúngico	Rangos de concentración (µg/mL)
Anfotericina B	0.0313-16
5-Fluorocitosina	0.125-64
Fluconazol	0.125-64
Ketoconazol	0.0313-16
Itraconazol	0.0313-64
Posaconazol	0.0313-64
Ravuconazol	0.0313-64
Voriconazol	0.0313-64

- **Elaboración y concentración de los inóculos:** cultivo en PDA por 7 días incubado a 35°C, cubrir colonias con solución salina estéril 0.85%, ajustar suspensión de conidios o esporangiosporas por método espectrofotométrico:

0.09-0.11 (80-82% de transmitancia) para *Aspergillus* y *S. schenckii*.

0.15-0.17 (68-70% de transmitancia) para *Fusarium*, *P. boydii* y *Rhizopus oryzae*.

- **Incubación:** a 35°C

Rhizopus se examina después de 21-26 horas.

Fusarium spp, *Aspergillus* spp. y *Sporothrix schenckii* se examinan después de 46-50 horas.

P. boydii se examina después de 70-74 horas.

- **Lectura de CMI:** son comparadas con un control de crecimiento (que contiene el medio RPMI-1640 y el inóculo, sin agente antifúngico). Se asigna un número:

4 No reducción de crecimiento

3 Crecimiento (75% de control)

2 Crecimiento (50% del control)

1 Crecimiento (25% del control)

0 Ausencia de crecimiento

La CMI para anfotericina B, itraconazol, posaconazol, ravuconazol y voriconazol es la concentración más baja del fármaco que inhibe toda clase de crecimiento (0).

La CMI para 5-fluorocitosina, fluconazol y ketoconazol es la concentración del fármaco en la que se presenta turbidez correspondiente al 50% del control (2).

Material

Medios de cultivo: Agar dextrosa Sabouraud (ADS)
Agar Czapec Dox
Agar Papa Dextrosa

Reactivos: Azul de lactofenol

Cepas de mucorales obtenidas de casos clínicos o contaminación de medios de cultivo.

Microscopio ocular de campo claro
Portaobjetos micrométrico graduado.
Objetivo con escala micrométrica.
Incubadoras a 28°C, 37°C, 45°C y 60°C.

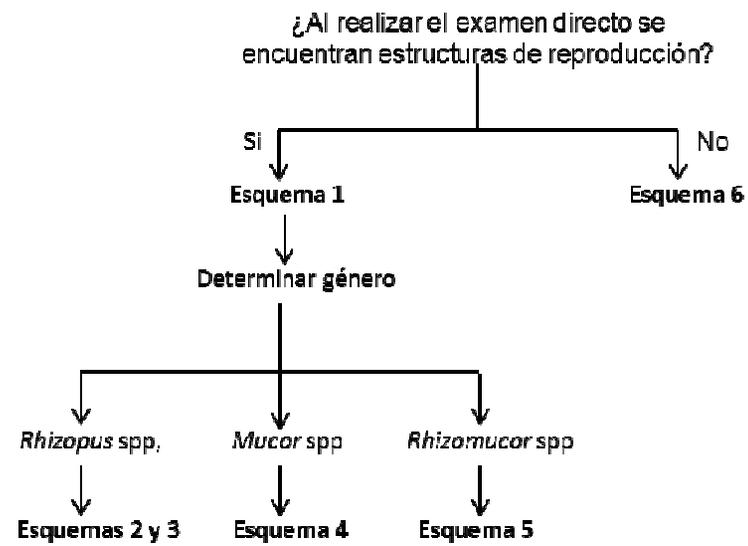
Metodología

- Se trata de un estudio descriptivo, observacional, comparativo en el cual se incluirán todas las cepas de mucorales causantes de mucormicosis, de los diversos Servicios del Hospital General de México, OD. así como de otras instituciones hospitalarias y cepas aisladas de la naturaleza.
- No se incluirán las cepas provenientes de los mismos pacientes en posteriores aislados (es decir cepas aisladas durante el seguimiento terapéutico), a menos que se tratase de cepas diferentes.
- Como criterio de exclusión se considerarán todas aquellas cepas que sufran pleomorfismo fúngico irreversible, o bien pierdan su capacidad de crecimiento durante el presente estudio.
- Realizar la resiembra de los mucorales obtenidos en agar dextrosa Sabouraud con un periodo de incubación de 72 horas a 28°C después de este tiempo efectuar tanto la observación de las colonias (macroscópica) como la observación y medida de las estructuras especializadas a través de exámenes directos (con azul de lactofenol) con ayuda de un ocular graduado cuya escala haya sido determinada con un portaobjetos graduado micrométricamente.
- Las cepas en las que no se logre observar estructuras especializadas serán resembradas en un medio pobre (agar Czapec Dox) y serán incubadas 72 horas a 28°C, después de esto se realizará la observación microscópica.
- Realizar la siembra de los mucorales en ADS e incubar a 28°C, 37°C, 45°C y 60°C; haciendo una suspensión de la cepa en solución salina estéril y tomando una alícuota para sembrar los 4 medios.
- Elaborar algoritmos para identificación de mucorales.
- Clasificar a los mucorales en género y especie de acuerdo a los algoritmos desarrollados.

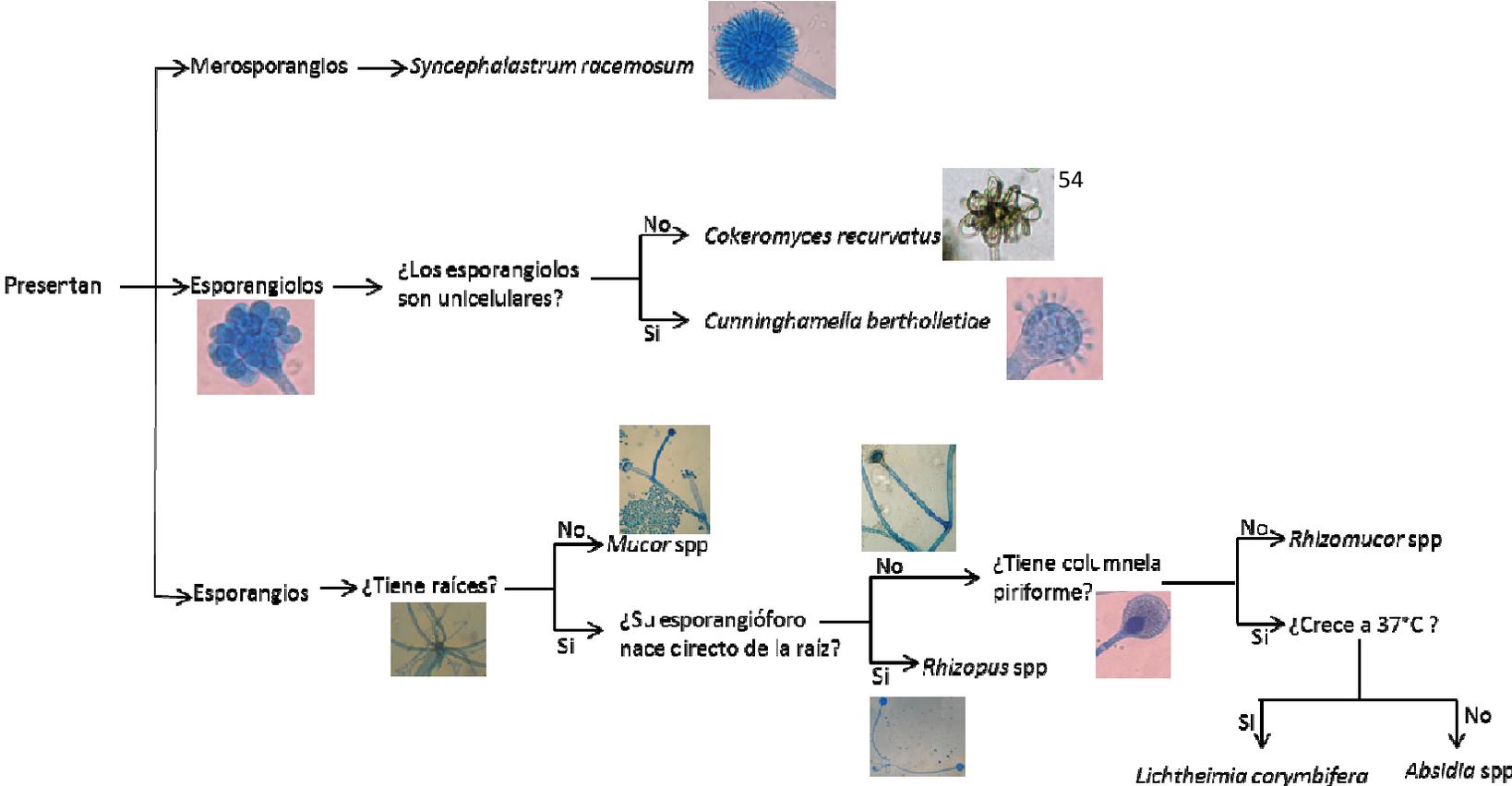
- El estudio se realizará por duplicado (dos observadores diferentes) a fin de poder evaluar los resultados estadísticamente.
- Comparar la identificación obtenida a través de los algoritmos planteados con la proporcionada en el estudio por biología molecular.
- Analizar la información de susceptibilidad *in vitro* de las cepas estudiadas.

Resultados

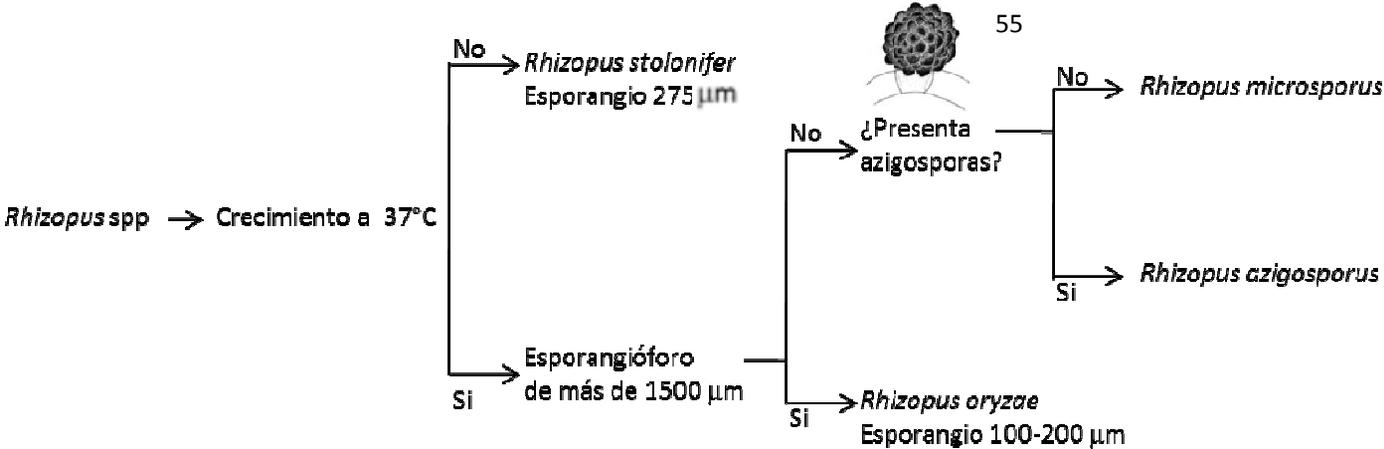
Después de la consulta de la literatura se elaboraron los siguientes algoritmos con base en el texto de Ribes *et al.*³



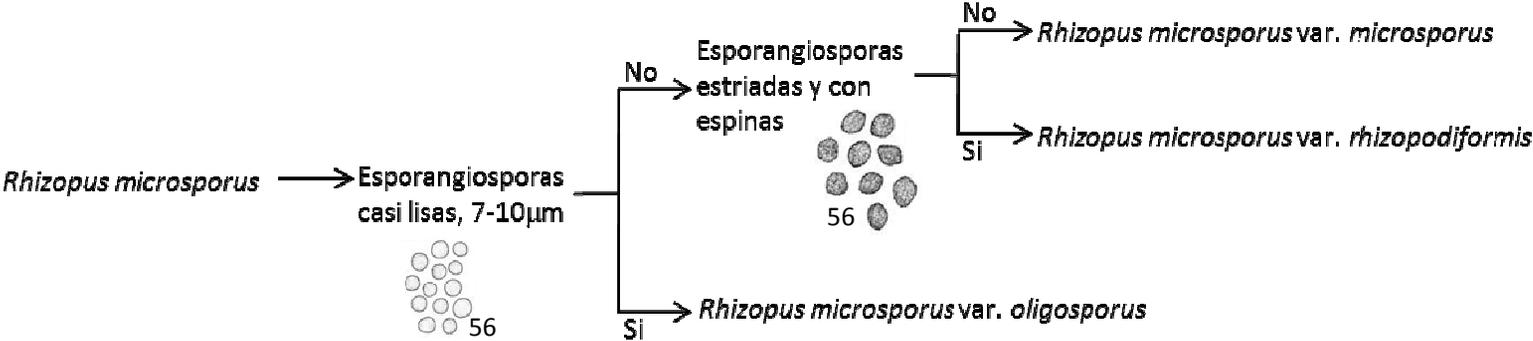
Esquema 1



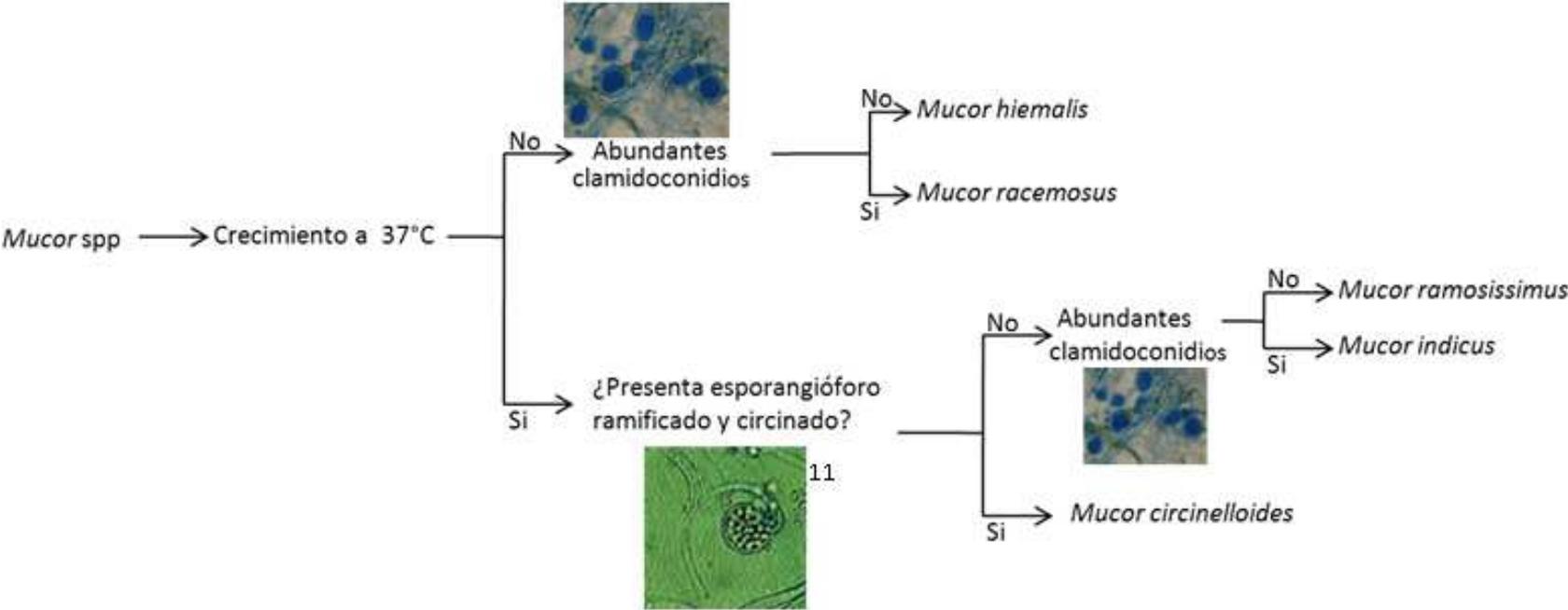
Esquema 2



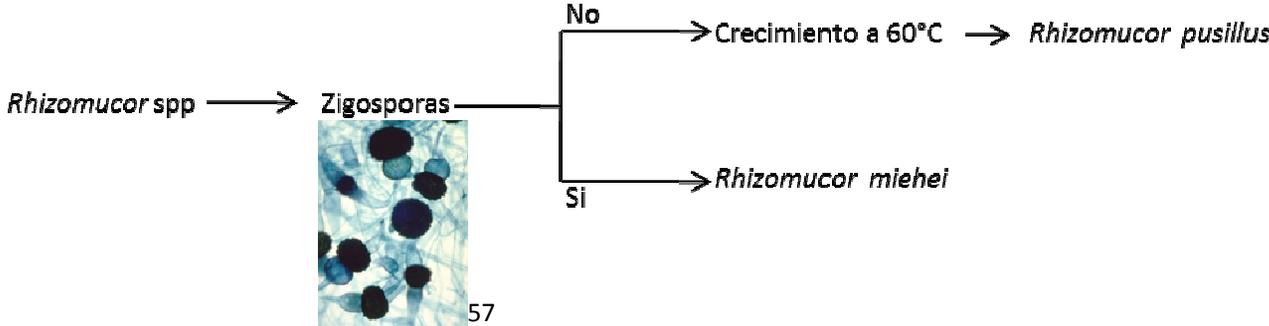
Esquema 3



Esquema 4



Esquema 5



Esquema 6. Observación después de 72 horas a 28°C en agar Czapek Dox.

Esporangio piriforme y apófisis prominente en forma de vaso de *Champagne*.



→ *Apophysomyces elegans*

Esporangio en forma de matraz con un tapón en el extremo superior



58

→ *Saksenaea vasiformis*

Grupos de 10 esporangióforos saliendo de los rizoides



59

→ *Rhizopus schipperae*

Después de la búsqueda de las cepas conservadas de los *Mucorales* en el laboratorio de Micología del Hospital General de México, se obtuvieron 22 cepas que fueron rotuladas con la clave HGM-Z-01 a HGM-Z-22.

HGM-Z-01

Cultivo (ADS): Micelio blanco que llena toda la caja, en las orillas de la caja se ve un color negro, y en la parte central se ven pequeños puntos negros (esporangios).

Morfología

Esporangióforo: 900-1800 μ m

Apófisis: Marcada

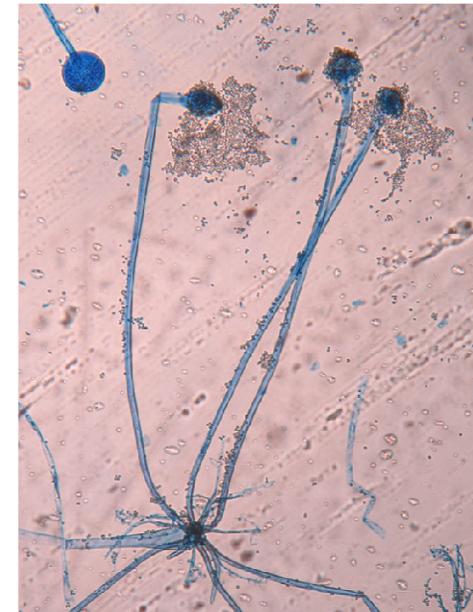
Columnela: Globosa

Esporangio: 45-195 μ m

Esporangiosporas: Estriadas 7.5-11 μ m

Rizoides: Bien desarrollados (285 μ m de largo)

Clamidoconidios: Ausentes



Clave	28°C	37°C	45°C	60°C
HGM-Z-01	C	x	x	x

Identificación preliminar: *Rhizopus stolonifer*

HGM-Z-02

Cultivo (ADS): Micelio blanco que llena toda la caja, en las orillas de la caja se ve un color negro y en la parte central se ven pequeños puntos negros (esporangios).

Morfología

Esporangióforo: 465-1500 μ m

Apófisis: Marcada

Columnela: Globosa

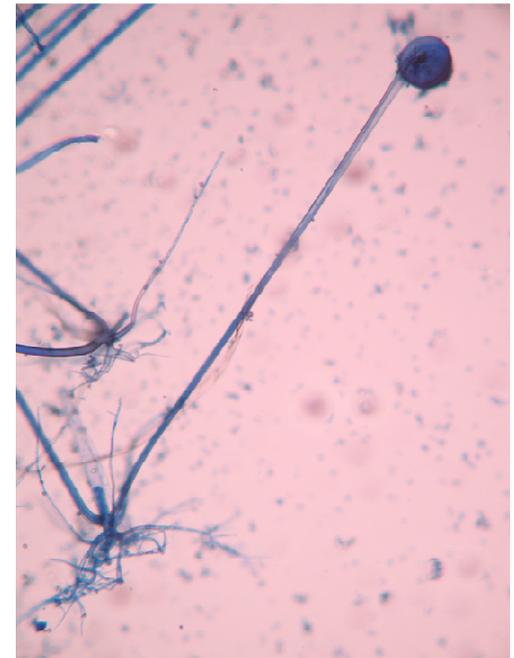
Esporangio: 60-195 μ m

Esporangiosporas: 7.5 μ m

Rizoides: Bien desarrollados, muy grandes y ramificados (285-540 μ m de largo)

Clamidoconidios: Ausentes

Clave	28°C	37°C	45°C	60°C
HGM-Z-02	C	x	x	x



Identificación preliminar: *Rhizopus stolonifer*

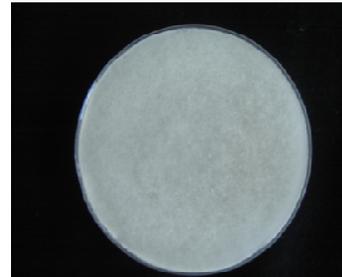
HGM-Z-03

Cultivo (ADS): Micelio blanco que llena toda la caja, muy pocos puntos negros (esporangios).

Morfología

Esporangióforo: Ramificado (195-510 μ m)
Apófisis: Visible
Columnela: Globosa
E esporangio: 51-150 μ m
E esporangiosporas: Pocas, heterogéneas (5 μ m)
Rizoides: Medio desarrollados
Clamidoconidios: Redondos

Clave	28°C	37°C	45°C	60°C
HGM-Z-03	C	C	PC	x



Identificación preliminar: *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*

HGM-Z-04

Cultivo (ADS): Micelio blanco que llena toda la caja, en las orillas de la caja se ve un color negro y en la parte central se ven pequeños puntos negros (esporangios).

Morfología

Esporangióforo: 1050-1600 μ m

Apófisis: Marcada

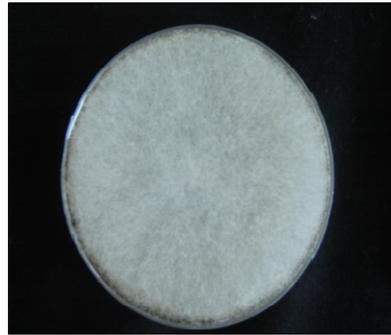
Columnela: Globosa

Esporangio: 105-195 μ m

Esporangiosporas: 5 μ m

Rizoides: Bien desarrollados

Clamidoconidios: Ausentes



Clave	28°C	37°C	45°C	60°C
HGM-Z-04	C	x	x	x

Identificación preliminar: *Rhizopus stolonifer*

HGM-Z-05

Cultivo (ADS): Micelio blanco que llena toda la caja, muy pocos puntos negros (esporangios).

Morfología

Esporangióforo: 375-975 μ m

Apófisis: No se nota

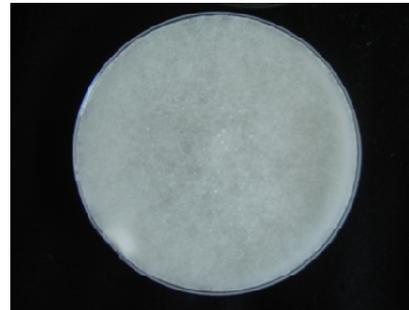
Columnela: Globosa

Esporangio: 90-180 μ m

Esporangiosporas: Pocas, heterogéneas, angulares (5 μ m)

Rizoides: Medio desarrollados

Clamidoconidios: Presentes



Clave	28°C	37°C	45°C	60°C
HGM-Z-05	C	C	PC	x

Identificación preliminar: *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*

HGM-Z-06

Cultivo (ADS): Micelio blanco que llena toda la caja, a orillas de la caja se ve un color negro verdoso, en el centro se distinguen puntos blancos.

Morfología

Esporangióforo: 375-1850 μ m

Apófisis: No se nota

Columnela: Globosa

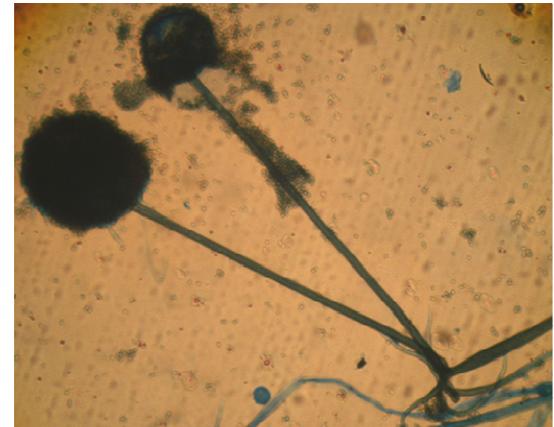
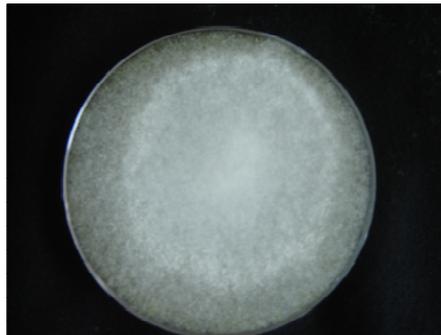
Esporangio: 75-150 μ m

Esporangiosporas: Pocas (5 μ m)

Rizoides: Medio desarrollados

Clamidoconidios: Presentes

Clave	28°C	37°C	45°C	60°C
HGM-Z-06	C	C	PC	x



Identificación preliminar: *Rhizopus oryzae*

HGM-Z-07

Cultivo (ADS): Micelio blanco que llena toda la caja, muy pocos puntos negros (esporangios).

Morfología

Esporangióforo: 420-675µm

Apófisis: Visible

Columnela: Globosa

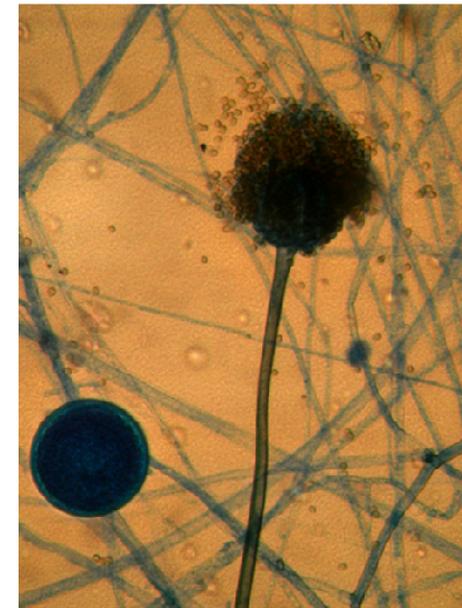
Esporangio: 75-150µm

Esporangiosporas: Pocas (5µm)

Rizoides: Poco desarrollados

Clamidoconidios: Ausentes

Clave	28°C	37°C	45°C	60°C
HGM-Z-07	C	C	PC	x



Identificación preliminar: *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*

HGM-Z-08

Cultivo (ADS): Micelio blanco que llena casi toda la caja, puntos negros (esporangios) en la orilla.

Morfología

Esporangióforo: Ramificado (255-645 μ m)

Apófisis: Visible

Columnela: Globosa

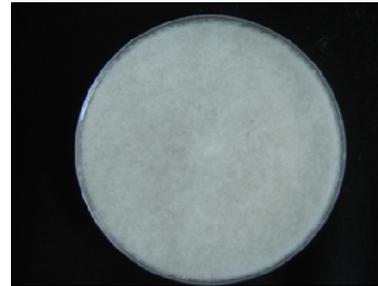
Esporangio: 105-150 μ m

Esporangiosporas: 5 μ m

Rizoides: Poco desarrollados

Clamidoconidios: Redondos

Clave	28°C	37°C	45°C	60°C
HGM-Z-08	C	C	PC	x



Identificación preliminar: *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*

HGM-Z-09

Cultivo (ADS): Color naranja-amarillo en la parte de abajo, micelio gris, con puntos grises, que tarda en llenar toda la caja.

Morfología

Esporangióforo: Ramificado, mayor a 510 μ m

Columnela: 15-26 μ m

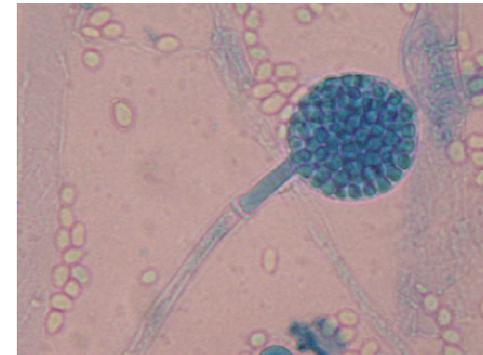
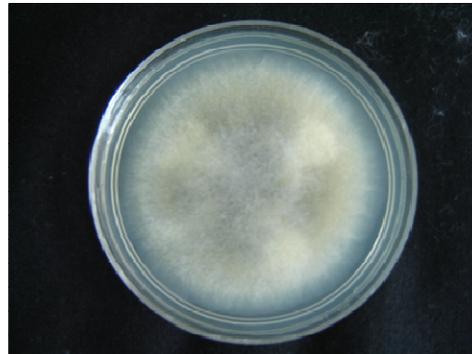
Esporangio: 27-45 μ m

Esporangiosporas: 4-7.5 μ m

Rizoides: Ausentes

Clamidoconidios: Abundantes (19-30 μ m)

Clave	28°C	37°C	45°C	60°C
HGM-Z-09	C	C	x	x



Identificación preliminar: *Mucor indicus*

HGM-Z-10

Cultivo (ADS): Color naranja-amarillo en la parte de abajo, micelio naranja, con puntos grises, llena toda la caja.

Morfología

Esporangióforo: Ramificado, mayor a $750\mu\text{m}$

Columnela: $15-30\mu\text{m}$

Esporangio: $30-60\mu\text{m}$

Esporangiosporas: $3-7.5\mu\text{m}$

Rizoides: Ausentes

Clamidoconidios: Abundantes ($15-23\mu\text{m}$)

Clave	28°C	37°C	45°C	60°C
HGM-Z-10	C	C	x	x



Identificación preliminar: *Mucor indicus*

HGM-Z-11

Cultivo (ADS): Color naranja-amarillo en la parte de abajo, micelio naranja, con puntos grises, llena toda la caja.

Morfología

Esporangióforo: Ramificado, mayor a $930\mu\text{m}$

Columnela: $11\text{-}26\mu\text{m}$

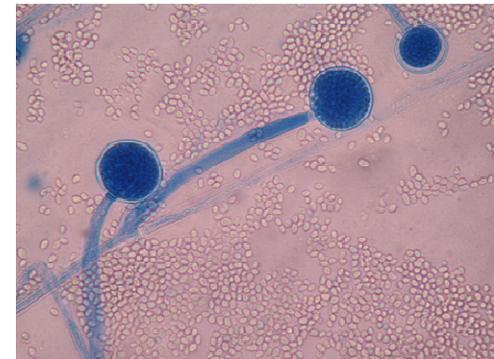
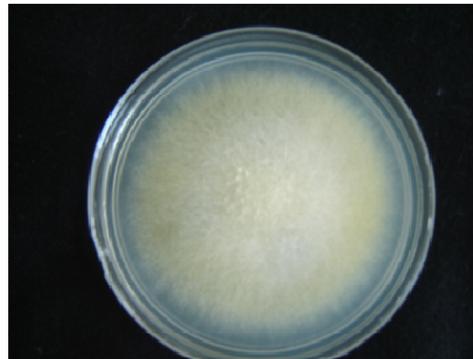
Esporangio: $27\text{-}60\mu\text{m}$

Esporangiosporas: $5\mu\text{m}$

Rizoides: Ausentes

Clamidoconidios: Abundantes ($27\text{-}38\mu\text{m}$)

Clave	28°C	37°C	45°C	60°C
HGM-Z-11	C	C	x	x



Identificación preliminar: *Mucor indicus*

HGM-Z-12

Cultivo (ADS): Color naranja-amarillo en la parte de abajo, micelio naranja, con puntos grises, llena toda la caja.

Morfología

Esporangióforo: Ramificado, mayor a 1050 μ m

Columnela: 15-26 μ m

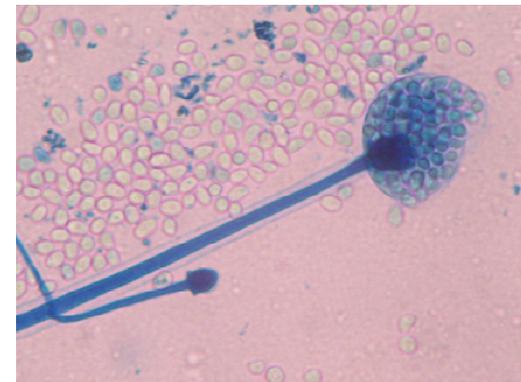
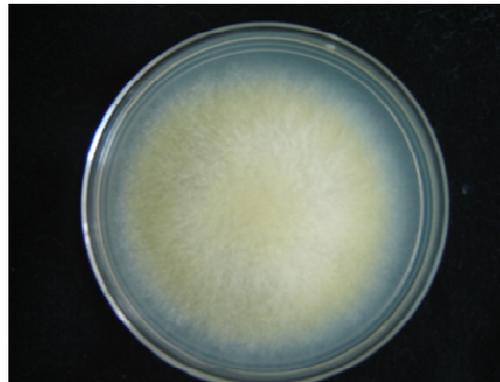
Esporangio: 42-60 μ m

Esporangiosporas: 4-6 μ m

Rizoides: Ausentes

Clamidoconidios: Abundantes, formando cadenas de hasta cuatro (15-23 μ m)

Clave	28°C	37°C	45°C	60°C
HGM-Z-12	C	C	x	x



Identificación preliminar: *Mucor indicus*

HGM-Z-13

Cultivo (ADS): Color naranja-amarillo en la parte de abajo, micelio naranja, con puntos grises, llena toda la caja.

Morfología

Esporangióforo: Ramificado, mayor a 900 μ m

Columnela: 15-26 μ m

Esporangio: 19-45 μ m

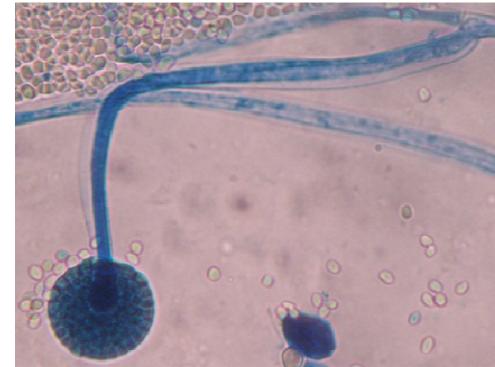
Esporangiosporas: 3-4 μ m

Rizoides: Ausentes

Clamidoconidios: Abundantes (23-38 μ m)

Clave	28°C	37°C	45°C	60°C
HGM-Z-13	C	C	x	x

Identificación preliminar: *Mucor indicus*



HGM-Z-14

Cultivo (ADS): Micelio blanco que llena toda la caja.

Morfología

Esporangióforo: Ramificado

Columnela: No visible

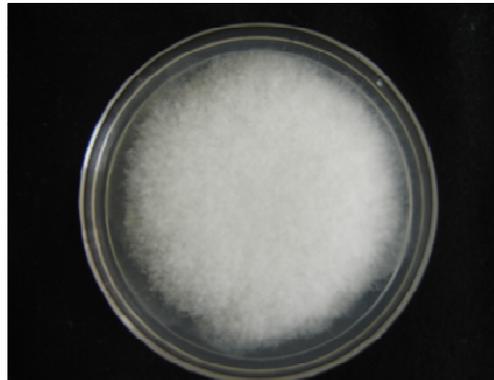
Esporangio: 23 μ m-50 μ m

Esporangiosporas: 5 μ m

Rizoides: Pequeños muy pobremente desarrollados

Clamidoconidios: Abundantes (15-20 μ m)

Clave	28°C	37°C	45°C	60°C
HGM-Z-14	C	C	x	x



Identificación preliminar: *Rhizomucor* spp.

HGM-Z-15

Cultivo (ADS): Micelio blanco que llena toda la caja.

Morfología

Esporangióforo: Ramificado

Columnela: No visible

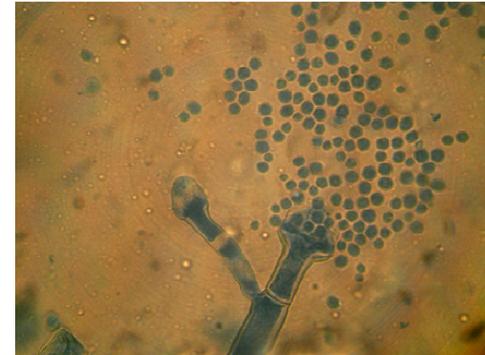
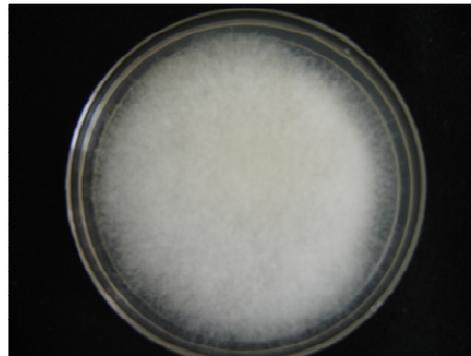
Esporangio: 42µm-105µm

Esporangiosporas: 5µm

Rizoides: Pequeños, pobremente desarrollados

Clamidoconidios: Abundantes

Clave	28°C	37°C	45°C	60°C
HGM-Z-15	C	C	x	x



Identificación preliminar: *Rhizomucor* spp.

HGM-Z-16

Cultivo (ADS): Micelio blanco al principio, tomando al centro un ligero color verde, en el reverso se ve ligeramente surcado, llena casi toda la caja.

Morfología

Esporangióforo: Ramificado (300 μ m x 7.5 μ m), nace arriba de estolones.

Columnela: Piriforme (15-26 μ m de ancho)

Esporangio: Piriforme (23-42 μ m de largo)

Esporangiosporas: 3-7.5 μ m

Rizoides: Pocos, pobremente desarrollados

Clamidoconidios: Ausentes

Clave	28°C	37°C	45°C	60°C
HGM-Z-16	C	x	x	x



Identificación preliminar: *Absidia* spp.

HGM-Z-17

Cultivo (ADS): Micelio blanco confluyente (en partes se ve que no hay micelio y en otras partes se nota el micelio junto) llena toda la caja.

Cultivo (Czapec Dox): Escaso micelio blanco pegado al agar.

Morfología (Czapec Dox):

Esporangióforo: 147 μ m x 4 μ m-695 μ m x 4 μ m

Columnela: No visible

Esporangio: Piriforme (19-26 μ m de largo)

Apófisis: Muy marcada en forma de copa

Esporangiosporas: Cilíndricas (7.5 μ m x 4 μ m)

Rizoides: Pocos, pobremente desarrollados

Clamidoconidios: Ausentes

Clave	28°C	37°C	45°C	60°C
HGM-Z-17	C	C	C	x



Identificación preliminar: *Apophysomyces elegans*

HGM-Z-18

Cultivo (ADS): Micelio blanco que llena toda la caja posteriormente se torna beige.

Morfología

Esporangióforo: Ramificado

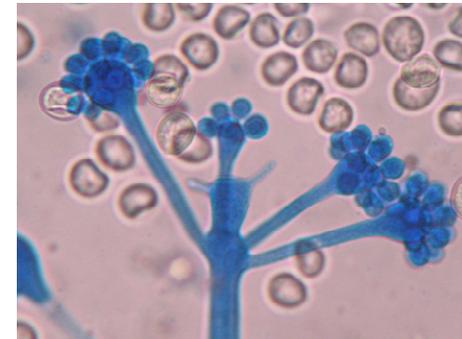
Vesícula: Principales: 15-27 μ m,
Laterales: 11-15 μ m

Esporangios: 4 μ m x 4 μ m-11 μ m x 11 μ m

Rizoides: Ausentes

Clamidoconidios: Ausentes

Clave	28°C	37°C	45°C	60°C
HGM-Z-18	C	C	x	x



Identificación preliminar: *Cunninghamella bertholletiae*

HGM-Z-19

Cultivo (ADS): Micelio blanco al principio después gris oscuro con un ligero brillo.

Morfología

Esporangióforo:	Ramificado
Vesícula:	Piriforme (38-87µm de largo)
Merosporangio:	19-45µm
Merosporangiosporas:	Cuadradas (4µm x 4µm)
Rizoides:	Pocos, pobremente desarrollados
Clamidoconidios:	Ausentes

Clave	28°C	37°C	45°C	60°C
HGM-Z-19	C	C	PC	x



Identificación preliminar: *Syncephalastrum racemosum*

HGM-Z-20

Cultivo (ADS): Micelio blanco al principio después gris oscuro con un ligero brillo.

Morfología

Esporangióforo:	Ramificado
Vesícula:	Piriforme (41-65µm de largo)
Merosporangio:	15-42µm
Merosporangiosporas:	Cuadradas (4µm x 4µm)
Rizoides:	Pocos, pobremente desarrollados
Clamidoconidios:	Ausentes

Clave	28°C	37°C	45°C	60°C
HGM-Z-20	C	C	PC	x



Identificación preliminar: *Syncephalastrum racemosum*

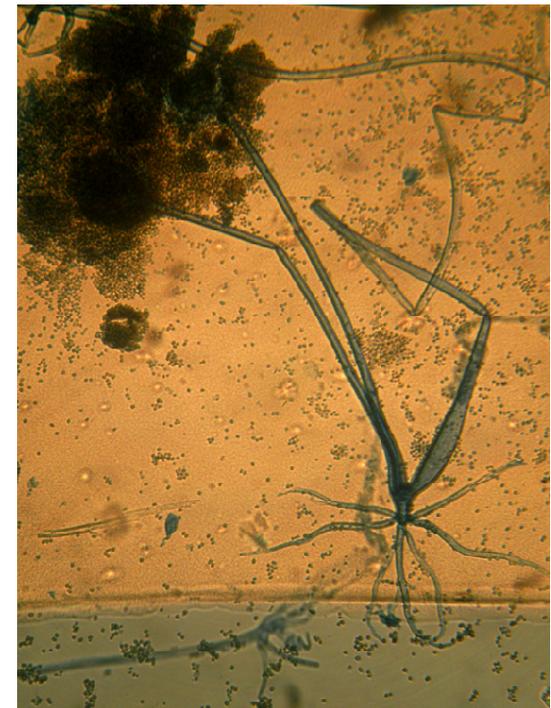
HGM-Z-21

Cultivo (ADS): Micelio blanco al principio, después se observan pequeños puntos negros (esporangios) a lo largo del cultivo.

Morfología

Esporangióforo: 525-1520 μ m
Apófisis: Ausente
Columnela: Globosa
Esporangio: 135-165 μ m
Esporangiosporas: Estriadas 6-7.5 μ m
Rizoides: Bien desarrollados
Clamidoconidios: Ausentes

Clave	28°C	37°C	45°C	60°C
HGM-Z-21	C	C	PC	x



Identificación preliminar: *Rhizopus oryzae*

HGM-Z-22

Cultivo (ADS): Micelio blanco al principio, después se observan pequeños puntos negros (esporangios) en la parte superior del cultivo.

Morfología

Esporangióforo: 750-2000 μ m
Apófisis: Ausente
Columnela: Globosa 75-90 μ m
E esporangio: 105-180 μ m
E esporangiosporas: Estriadas 4-7.5 μ m
Rizoides: Medio desarrollados (150 μ m)
Clamidoconidios: Ausentes



Clave	28°C	37°C	45°C	60°C
HGM-Z-22	C	C	C	x

Identificación preliminar: *Rhizopus oryzae*

Tabla 2. Comparativo de termotolerancia entre observadores.

Clave	Observador A				Observador B			
	28°C	37°C	45°C	60°C	28°C	37°C	45°C	60°C
HGM-Z-01	C	x	x	x	C	x	x	x
HGM-Z-02	C	x	x	x	C	C	PC	x
HGM-Z-03	C	C	PC	x	C	x	PC	x
HGM-Z-04	C	x	x	x	C	PC	PC	x
HGM-Z-05	C	C	PC	x	C	C	PC	x
HGM-Z-06	C	C	PC	x	C	C	PC	x
HGM-Z-07	C	C	PC	x	C	C	PC	x
HGM-Z-08	C	C	PC	x	C	C	PC	x
HGM-Z-09	C	C	x	x	C	C	x	x
HGM-Z-10	C	C	x	x	C	C	x	x
HGM-Z-11	C	C	x	x	C	C	x	x
HGM-Z-12	C	C	x	x	C	C	x	x
HGM-Z-13	C	C	x	x	C	C	x	x
HGM-Z-14	C	C	x	x	C	x	x	x
HGM-Z-15	C	C	x	x	C	C	x	x
HGM-Z-16	C	x	x	x	C	x	x	x
HGM-Z-17	C	C	C	x	C	C	C	x
HGM-Z-18	C	C	x	x	C	C	x	x
HGM-Z-19	C	C	PC	x	C	C	PC	x
HGM-Z-20	C	C	PC	x	C	C	PC	x
HGM-Z-21	C	C	PC	x	C	C	PC	x
HGM-Z-22	C	C	C	x	C	C	C	x

C: El hongo creció adecuadamente.

PC: Se observa crecimiento limitado del hongo.

x: El hongo no creció

Tabla 3. Comparativo de identificación morfológica entre-observadores.

Clave	Observador A	Observador B
HGM-Z-01	<i>Rhizopus stolonifer</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>
HGM-Z-02	<i>Rhizopus stolonifer</i>	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>
HGM-Z-03	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>
HGM-Z-04	<i>Rhizopus stolonifer</i>	<i>Mucor circinelloides</i>
HGM-Z-05	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>
HGM-Z-06	<i>Rhizopus oryzae</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>
HGM-Z-07	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>
HGM-Z-08	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>
HGM-Z-09	<i>Mucor indicus</i>	<i>Mucor indicus</i>
HGM-Z-10	<i>Mucor indicus</i>	<i>Mucor indicus</i>
HGM-Z-11	<i>Mucor indicus</i>	<i>Cunninghamella bertholletiae</i>
HGM-Z-12	<i>Mucor indicus</i>	<i>Cunninghamella bertholletiae</i>
HGM-Z-13	<i>Mucor indicus</i>	<i>Mucor ramosissimus</i>
HGM-Z-14	<i>Rhizomucor</i> spp.	<i>Rhizomucor</i> spp.
HGM-Z-15	<i>Rhizomucor</i> spp.	<i>Cokeromyces recurvatus</i>
HGM-Z-16	<i>Absidia</i> spp.	<i>Absidia</i> spp.
HGM-Z-17	<i>Apophysomyces elegans</i>	<i>Apophysomyces elegans</i>
HGM-Z-18	<i>Cunninghamella bertholletiae</i>	<i>Cunninghamella bertholletiae</i>
HGM-Z-19	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	<i>Syncephalastrum racemosum</i>
HGM-Z-20	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	<i>Syncephalastrum racemosum</i>
HGM-Z-21	<i>Rhizopus oryzae</i>	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>
HGM-Z-22	<i>Rhizopus oryzae</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>

Identificación del género *Rhizopus* $\kappa= 0.91$

Identificación del género *Mucor* $\kappa= 0.84$

Identificación de *Rhizomucor* inadecuada, debida al azar.

Identificación de *Absidia* coincidió en ambos observadores.

Identificación de *Apophysomyces elegans* coincidió en ambos observadores.

Identificación de *Cunninghamella bertholletiae* inadecuada, debida al azar.

Identificación de *Syncephalastrum racemosum* coincidió en ambos observadores.

Tabla 4. Comparativo de identificación observador A-molecular

Clave	Observador A	Identificación molecular (*)
HGM-Z-01	<i>Rhizopus stolonifer</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>
HGM-Z-02	<i>Rhizopus stolonifer</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>
HGM-Z-03	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>
HGM-Z-04	<i>Rhizopus stolonifer</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>
HGM-Z-05	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>
HGM-Z-06	<i>Rhizopus oryzae</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>
HGM-Z-07	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>
HGM-Z-08	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>
HGM-Z-09	<i>Mucor indicus</i>	<i>Mucor indicus</i>
HGM-Z-10	<i>Mucor indicus</i>	<i>Mucor indicus</i>
HGM-Z-11	<i>Mucor indicus</i>	<i>Mucor indicus</i>
HGM-Z-12	<i>Mucor indicus</i>	<i>Mucor indicus</i>
HGM-Z-13	<i>Mucor indicus</i>	<i>Mucor indicus</i>
HGM-Z-14	<i>Rhizomucor</i> spp.	<i>Rhizopus oryzae</i>
HGM-Z-15	<i>Rhizomucor</i> spp.	<i>Rhizopus oryzae</i>
HGM-Z-16	<i>Absidia</i> spp.	-
HGM-Z-17	<i>Apophysomyces elegans</i>	-
HGM-Z-18	<i>Cunninghamella bertholletiae</i>	<i>Cunninghamella bertholletiae</i>
HGM-Z-19	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	<i>Syncephalastrum racemosum</i>
HGM-Z-20	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	<i>Syncephalastrum racemosum</i>
HGM-Z-21	<i>Rhizopus oryzae</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>
HGM-Z-22	<i>Rhizopus oryzae</i>	-

(*) La identificación molecular fue realizada en la Unidad de Micología. Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud Universitat Rovira i Virgili, Reus, Tarragona, España por J. Guarro con la técnica de secuenciación de la región ITS de ADN ribosomal.

Identificación del género *Rhizopus*

Sensibilidad: 80%

Especificidad: 100%

Valor Predictivo Positivo: 100%

Valor Predictivo Negativo: 83.3%

Identificación de *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* (n=4) coincidió en ambas pruebas.

Identificación de *Rhizopus stolonifer* incorrecta.

Identificación de *Rhizomucor* incorrecta.

Identificación de género y especie de *Mucor* (n=5) coincidió en ambas pruebas.

Identificación de *Cunninghamella bertholletiae* (n=1) coincidió en ambas pruebas.

Identificación de *Syncephalastrum racemosum* (n=2) coincidió en ambas pruebas.

Tabla 5. Reporte de susceptibilidad *in vitro*.

Identificación	CMI (µg/mL)(*)							
	ITC	ITC	VRC	VRC	PSC	PSC	AMB	AMB
<i>Rhizopus oryzae</i>								
HGM-Z-01	2	2	4	>8	1	2	0.5	1
HGM-Z-02	8	2	>8	>8	4	1	0.5	1
HGM-Z-04	4	2	4	>8	1	1	1	2
HGM-Z-06	4	4	>8	>8	1	2	0.25	1
HGM-Z-14	4	2	1	4	2	1	1	0.5
HGM-Z-15	2	2	4	1	2	1	1	1
HGM-Z-21	4	4	>8	>8	2	2	1	2
<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>								
HGM-Z-03	2	2	>8	>8	0.5	1	2	2
HGM-Z-05	4	4	>8	>8	2	0.5	1	1
HGM-Z-07	2	2	>8	1	1	0.5	0.5	1
HGM-Z-08	2	4	4	1	2	1	1	2
<i>Mucor indicus</i>								
HGM-Z-09	1	1	4	8	0.5	2	0.5	0.5
HGM-Z-10	2	4	8	8	1	1	1	1
HGM-Z-11	2	2	4	8	1	0.5	1	1
HGM-Z-12	2	2	2	4	1	1	1	1
HGM-Z-13	2	8	>8	4	1	1	0.5	1
<i>Absidia</i> spp								
HGM-Z-16	1	8	>8	>8	2	4	2	1
<i>Apophysomyces elegans</i>								
HGM-Z-17	0.5	4	2	2	1	0.5	2	2
<i>Cunninghamella bertholletiae</i>								
HGM-Z-18	4	2	4	4	2	2	2	0.5
<i>Syncephalastrum racemosum</i>								
HGM-Z-19	4	4	4	1	2	2	2	2
HGM-Z-20	2	4	4	2	1	0.5	1	2

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria. ITC: Itraconazol. VRC: Voriconazol. PSC: Posaconazol. AMB: Anfotericina B.

Los valores marcados en rojo son los asociados a resistencia.

(*) La determinación de las CMI's fue realizada en el Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey por la Doctora Gloria M. González con el método de microdilución en caldo (M38-A).

Discusión

Para la identificación de los mucorales, es necesario basarse en diversos conceptos: macromorfología colonial; micromorfología, que demuestra las formas de reproducción asexual o fases anamórficas, estas incluyen esporangiosporas (endosporas), esporangiolos y meroesporangiosporas, así como los tipos y modalidades de micelio; pruebas térmicas; y pruebas bioquímicas de degradación y/o utilización de carbohidratos, siendo estas muy irregulares, por lo que la mayoría de investigadores no lo utilizan.^{1, 3}

El reporte de la termotolerancia de los mucorales es de utilidad para la identificación de algunos de ellos, por ejemplo *Rhizopus stolonifer*, a diferencia de las otras especies del género *Rhizopus*, no crece a 37°C,³ también permite diferenciar a especies del género *Mucor* ya que ni *M. hiemalis* ni *M. racemosus* crecen a 37°C, a diferencia de *M. ramosissimus*, *M. indicus* y *M. circinelloides*.³ La prueba de termotolerancia también puede resultar de ayuda en la identificación de *Rhizomucor* dado que *Rhizomucor pusillus* (patógeno en humanos) puede soportar una temperatura de hasta 60°C. En la comparación entre observadores de los resultados de termotolerancia se hallan diferencias en cuatro de ellos: HGM-Z-02, HGM-Z-03, HGM-Z-04 y HGM-Z-14, esta diferencia pudo deberse a la manera de la siembra de los cultivos que se incubaron a las diferentes temperaturas (partiendo de una suspensión, en solución salina estéril, de las cepas) teniendo la posibilidad de que algunos medios no fueran bien inoculados y se reportara que el hongo no creció a determinada temperatura, esto también explica la identificación por ambos observadores de HGM-Z-01 como *R. stolonifer* cuando la biología molecular lo identificó como *R. oryzae*. Por dicha razón resulta apropiado realizar una suspensión homogénea del hongo o realizar la siembra directa de la colonia al medio de cultivo estéril con el fin de asegurarnos de sembrarlo adecuadamente. Tanto HGM-Z-02 como HGM-Z-03 fueron identificados por ambos observadores como pertenecientes al género *Rhizopus*, sin embargo presentan diferencias en el reporte de su crecimiento a 37°C, lo cual se ve reflejado en la posterior identificación de la especie de los respectivos mucorales.³

Para evitar el posible pleomorfismo fúngico en este estudio se realizó la siembra de los mucorales en medio de agar papa dextrosa, el cual es un medio que permite esporulación y conservación de hongos.¹ Ninguna de las veintidós cepas sufrió este fenómeno.

La medición y observación al microscopio de las estructuras en las cepas recolectadas en este trabajo permitió comprobar lo reportado en la literatura respecto a las características presentadas por los distintos géneros de mucorales.

Las diez cepas identificadas morfológicamente como *Rhizopus* presentan, en general, las características reportadas en la literatura³ presentan rizoides, esporangiosporas estriadas, la medida de los esporangios que abarca un rango de 45-195 μ m y de los esporangióforos con un rango de 255 a 2000 μ m, mientras que en la literatura se reportan de 50 a 275 μ m, y de 350 a más de 2000 μ m respectivamente.³

Las cinco cepas identificadas morfológicamente como *Mucor* no presentan rizoides, tienen esporangióforo ramificado, esporangios menores de 100 μ m, esporangiosporas lisas y abundantes clamidoconidios; a pesar de que se halló diferencia en las medidas de éstos con respecto a lo reportado en la literatura³ las cinco cepas fueron clasificadas como *M. indicus* de acuerdo a las otras características (morfológicas y de termotolerancia).

También fue posible identificar en HGM-Z-16 las características descritas del género *Absidia*, presentando rizoides simples, esporangióforo naciendo entre rizoides y columnela y esporangio piriformes.³

La cepa HGM-Z-17, identificada como *Apophysomyces elegans*, fue la única que se sembró en agar Czapec-Dox (debido a que en ADS no produjo estructuras de reproducción), y se incubó por 96 horas, después de ese tiempo, el cultivo muestra crecimiento de micelio apenas visible en las paredes del tubo de ensayo y pegado al agar, es importante tener en cuenta esta característica ya que al pasar a este hongo al medio pobre en nutrientes no presenta el crecimiento que caracteriza a los mucorales de llenar el tubo o caja en que fue

sembrado, pero aun con el escaso crecimiento en dicho medio, al realizar el examen directo se observan sus estructuras de reproducción, las medidas de sus estructuras coinciden con las reportadas para este mucoral, pero la medida de los esporangios encontrados fue menor que la reportada en la literatura.³

La cepa identificada como *Cunninghamella bertholletiae* (HGM-Z-18) presenta esporangióforos terminados en vesículas principales y vesículas laterales aunque estas estructuras tienen un diámetro menor al reportado en la literatura, la medida de los esporangiolos coincide.³

Las cepas identificadas como *Syncephalastrum racemosum* (HGM-Z-19 y HGM-Z-20) presentan esporangióforos ramificados terminados en vesículas sobre las cuales se encuentran los merosporangios y dentro de estos últimos las merosporangiosporas; las medidas de las vesículas y de las esporas coinciden con las reportadas en la literatura mientras que las de los merosporangios son un poco superiores.³

Las diferencias entre las medidas reportadas para los mucorales pueden deberse al tiempo de incubación después del cual se realiza el examen directo, los mucorales pueden crecer en un tiempo que varía de las 24 a 48 horas¹, sin embargo el examen directo de los mismos, para su posterior identificación, realizado a las 48 horas, no favoreció, en una cepa (HGM-Z-16) la aparición de estructuras suficientemente maduras. Debido a lo anterior esta prueba es solamente presuntiva.

En el examen directo realizado a las 72 horas, se comprobó la presencia de estructuras de reproducción maduras para todos los mucorales (a excepción de HGM-Z-17); al realizar el examen directo a las 96 horas las mediciones de las estructuras coincidían con el realizado a las 72 horas, sin embargo un examen directo realizado posteriormente (más de una semana) presenta envejecimiento de estructuras, tales como el esporangio, que dificulta su medición.

Al comparar la identificación, entre los observadores, de los mucorales a través del uso de los algoritmos planteados en este trabajo se observan diferencias. El mucoral con clave HGM-Z-04 es clasificado por un observador

como *Rhizopus* y por otro como *Mucor*. Esta discordancia presentada puede ser explicada por la realización de un inadecuado examen directo, en el caso de ser *Rhizopus* este debería presentar la modalidad de micelio en “rizoide”, sin embargo, es posible no observar dicha estructura en el directo por eso es necesario realizar más de un examen directo del hongo en cuestión así como una revisión minuciosa del mismo que permita encontrar las estructuras buscadas; otro dato que permite distinguir estos dos géneros es el tamaño de los esporangios que en *Rhizopus* suelen ser más grandes (100-200µm), mientras que en *Mucor* no suelen rebasar los 100µm; además las esporangiosporas que presenta el género *Rhizopus* muestran rugosidades, mientras que las presentadas por *Mucor* son más bien lisas.³ También se hallan diferencias en la identificación de la especie de los mucorales HGM-Z-08, HGM-Z-21 y HGM-Z-22, clasificados como *Rhizopus*, esto puede deberse a que, en los algoritmos aplicados, se plantea la medición del esporangióforo que puede resultar complicada si, al realizar el examen directo, no se obtiene la estructura completa (esporangio-esporangióforo-rizoide) en dado caso se puede realizar la medición de la estructura incompleta, es decir medición de la longitud del esporangióforo desde el esporangio aunque la terminación de rizoide no se encuentre. Es importante revisar varios campos en la preparación, con el fin de identificar los diferentes tamaños de las estructuras y asegurar la precisión de las mediciones, lo cual permitirá hacer un mejor uso de los algoritmos. También sería necesario contar con laminillas de referencia que nos permitan conocer la micromorfología de las estructuras que se buscan para cada mucoral.

En el caso de HGM-Z-10 y HGM-Z-11 que por un observador son clasificados como *Mucor* y por el otro como *Cunninghamella*, las estructuras que posee uno de ellos resulta totalmente distintas a las del otro, sin embargo los esporangios de *Mucor* pueden tener un ligero parecido a la formación madura de los esporangiolos en *Cunninghamella*¹ a pesar de ello existen otras características que nos permiten distinguir ambos géneros, el tamaño de las esporangiosporas de *Mucor*, que suelen ser ovaladas y medir de 3 a 5µm, resulta pequeño comparado con las que presenta *Cunninghamella* que son

redondas y suelen medir 11 μ m cuando se encuentran sueltas.³ Con respecto a HGM-Z-15 encontramos que existe diferencia en la identificación del género del hongo (entre ambos observadores), es probable que dicha diferencia sea debida al tiempo de crecimiento de las colonias a las cuales se les realizó el directo, si el análisis microscópico se realiza cuando el cultivo lleva más de una semana, es posible observar estructuras que resulten confusas, pues los esporangióforos pueden hallarse sobrepuestos y, en general, se hace difícil observar estructuras enteras, como el esporangio, lo cual genera errores en el uso adecuado de los algoritmos.

Al realizar un análisis de coeficiente de *kappa* interpretado con los criterios de Fleiss⁶⁰ es posible observar que en la identificación del género *Rhizopus* existe una coincidencia adecuada, no debida al azar ($\kappa= 0.91$). Con respecto a la identificación del género *Mucor* se obtiene también una coincidencia adecuada no debida al azar ($\kappa= 0.84$), sin embargo se encuentran diferencias en la identificación de la especie; tomando en cuenta que en los algoritmos se propone como factor importante la presencia o ausencia de clamidoconidios, resulta relevante saber diferenciar dichas estructuras y revisar varios campos de la laminilla con el fin de buscar de manera intencionada las estructuras deseadas. La identificación de los mucorales restantes *Rhizomucor* spp. (HGM-Z-14), *Absidia* (HGM-Z-16), *Apophysomyces elegans* (HGM-Z-17) y *Syncephalastrum racemosum* (HGM-Z-19 y HGM-Z-20) coincide entre ambos observadores. La realización del ensayo por duplicado nos da una idea de la reproducibilidad de la identificación usando los algoritmos elaborados, esta fue comprobada para los géneros *Rhizopus*, *Mucor*, *Absidia*, *Apophysomyces elegans* y *Syncephalastrum racemosum*, sin embargo no hay coincidencia para la especie (la cual resulta importante en caso de identificar a un mucoral como *Rhizopus* o como *Mucor*).

Al comparar los resultados de nuestro método con el estándar de oro (biología molecular), obtenemos en la identificación del género *Rhizopus* una sensibilidad del 80% lo que nos indica que, con el uso de los algoritmos, es posible identificar en un 80% como *Rhizopus*, a los mucorales pertenecientes a dicho género, sin embargo un 20% de mucorales puede ser clasificado en otro

género (en el caso del presente estudio *Rhizomucor*). La especificidad del 100% nos indica que los hongos que no pertenecen al género *Rhizopus* no son clasificados como pertenecientes al mismo. Sólo en el caso de las cepas identificadas como *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* se encuentra coincidencia total con la identificación molecular. En cuanto a *Mucor* la identificación de las cinco cepas coincidieron a nivel género y especie con la identificación molecular, lo cual nos indica la capacidad de identificar hasta nivel especie a los mucorales del género *Mucor*, sin embargo resultaría conveniente haber contado con distintas especies de *Mucor*, estudio que nos permitiría comprobar la identificación de las mismas, sobre todo tomando en cuenta que las especies de *Mucor* que más comúnmente se hallan como patógenas son *M. circinelloides* y *M. ramosissimus*.¹ Con respecto a los géneros restantes *Cunninghamella* y *Syncephalastrum* presentan también coincidencia, lo cual era esperado dado el hecho de que ambos géneros tienen estructuras muy características que permiten su identificación microscópica con relativa facilidad. Las cepas HGM-Z-14 y HGM-Z-15 fueron identificadas (por el observador A) como *Rhizomucor* spp., debido al hallazgo de ramificaciones en el esporangióforo y rizoides muy simples, sin embargo al comparar dichas identificaciones con la biología molecular no se obtiene una coincidencia si no que se reporta como *Rhizopus oryzae*, lo cual nos permite darnos cuenta que, a veces, el esporangióforo de *Rhizopus* puede encontrarse ramificado. La identificación molecular de las cepas HGM-Z-16 y HGM-Z-17 no fue posible por contaminación del material enviado, mientras que la cepa HGM-Z-22 se obtuvo de un paciente en una fecha en la cual el análisis molecular se había cerrado, motivo por el cual no se tiene su identificación por biología molecular.

En el trabajo de Álvarez *et al.*²² se reporta la comparación de identificación morfológica de 190 cepas de mucorales *versus* biología molecular obteniendo una correlación de 92.6% a nivel género y especie y 100% a nivel género incluyendo los géneros *Rhizopus*, *Mucor*, *Lichtheimia*, *Cunninghamella*, *Rhizomucor*, *Apophysomyces*.²² Estos resultados nos indican la posibilidad de una identificación bastante adecuada para los distintos mucorales productores de mucormicosis siempre y cuando el observador adquiera experiencia en la observación e identificación de las estructuras fúngicas así como una más

completa elaboración de algoritmos que nos permitan tener mayor certeza en la identificación tanto a nivel de género como de especie.

Para analizar la susceptibilidad de las cepas de acuerdo a las CMI's reportadas se usaron los siguientes criterios (extrapolando lo encontrado en levaduras, a falta de información semejante en hongos filamentosos).⁶¹

Tabla 6. Criterios de susceptibilidad de antimicóticos

Antimicótico	CMI (µg/mL)		
	Susceptibilidad	Susceptibilidad dosis-dependiente	Resistencia
Anfotericina B	≤ 1	-	≥ 2
Itraconazol	≤ 0.125	0.25-0.5	≥ 1
Voriconazol	≤ 1	2	≥ 4
Posaconazol	No determinado	No determinado	No determinado

El reporte de sensibilidad *in vitro* de las cepas de mucorales muestra que anfotericina B es el antimicótico que presenta mejor actividad frente a este tipo de hongos (con las CMI's menores), seguido de posaconazol; por otra parte, voriconazol es el antimicótico que presenta menos actividad frente a los mucorales de este estudio con una CMI mayor a 2µg/mL todo lo cual coincide con lo reportado en la literatura.^{10, 19, 23, 24, 37, 40}

La susceptibilidad hacia anfotericina B es similar en las cepas identificadas como *R. oryzae*, sin embargo algunas muestran resistencia (CMI 2µg/mL), lo mismo ocurre con las cepas identificadas como *R. microsporus* var. *oligosporus*, lo que no nos proporciona un patrón definido para asociar resistencia o susceptibilidad, una vez determinados el género y la especie.

Todas las cepas de *Mucor indicus* fueron susceptibles frente anfotericina B. Mientras que las cepas HGM-Z-16, HGM-Z-17, HGM-Z-18, HGM-Z-19 y HGM-Z-20; *Absidia* spp. *A. elegans* (ambas sin comprobación por biología molecular), *C. bertholletiae*, *S. racemosum* y *S. racemosum* respectivamente, presentan resistencia hacia anfotericina B. De las cepas mencionadas HGM-Z-17 presenta hacia posaconazol la CMI más baja (0.5µg/mL). A diferencia de lo hallado en el presente estudio, en la literatura se reporta susceptibilidad de

Absidia,¹⁸ y *S. racemosum*²² hacia anfotericina B; sin embargo, coincidiendo con lo encontrado en los reportes, *A. elegans* presentó resistencia hacia anfotericina B (2µg/mL) mientras que presenta susceptibilidad hacia posaconazol (0.5µg/mL);^{10, 19} la resistencia *in vitro* hacia anfotericina B también se ha demostrado para cepas de *C. bertholletiae*.^{10, 19, 24}

Frente a posaconazol, los valores de CMI encontrados son iguales o superiores a los encontrados frente anfotericina B, a pesar de ello en las cepas HGM-Z-03, HGM-Z-17 y HGM-Z-20, *R. microsporus* var. *oligosporus*, *A. elegans* y *S. racemosum* respectivamente, se hallaron valores de CMI de posaconazol inferiores a los de anfotericina B. Las CMI de posaconazol muestran valores semejantes entre los diferentes mucorales estudiados, sin embargo en la literatura posaconazol presenta valores de CMI mayores en *Mucor* que en otros mucorales.¹³

Comparando las CMI de posaconazol frente a las especies de *Rhizopus* se encontraron valores menores para *R. microsporus* (0.5, 1, 2µg/mL) que para *R. oryzae* (1, 2, 4µg/mL), este dato también se halla reportado en la literatura.¹⁰

Itraconazol no presenta una buena actividad ante las cepas de mucorales estudiados (CMI= 2, 4, 8µg/mL), excepto para HGM-Z-17 *A. elegans* (CMI 0.5µg/mL). En la literatura itraconazol presenta buena acción contra cepas de *Lichtheimia*^{10, 19, 24, 37, 40} y *Rhizomucor*^{10, 19, 24, 40} sin embargo para *Rhizopus* spp. el rango varía de 0.25 a > 32µg/mL.¹⁹ En este estudio, sin embargo se obtuvo resistencia hacia itraconazol de la única cepa identificada como *Absidia*.

En la identificación inter-observadores se obtuvo una coincidencia en la identificación de los géneros *Rhizopus*, *Mucor*, *Absidia*, *Apophysomyces* y *Syncephalastrum*, pero no coincidió la identificación a nivel de especie en el caso de *Rhizopus*, y solo en dos cepas, en el caso de *Mucor*.

En comparación con la identificación molecular se obtuvo sensibilidad 80% y especificidad 100% para la identificación del género *Rhizopus* y una coincidencia a nivel de especie en la identificación de *Rhizopus microsporus*

var. *oligosporus*, *Mucor indicus*, *Syncephalastrum racemosum* y *Cunninghamella bertholletiae*,

Es necesario, por lo tanto desarrollar algoritmos más específicos para la diferenciación del género *Rhizopus* con género *Rhizomucor*, así como para la identificación a nivel especie de *Rhizopus*.

La técnica más apropiada para la identificación de mucorales, como de muchos hongos, es el análisis de las secuencias de ADN (especialmente el ribosomal),²² sin embargo su realización rutinaria en el laboratorio de micología es, por ahora, inalcanzable, por lo que resulta de utilidad conocer y dominar las características microscópicas que nos permitan diferenciarlos con materiales disponibles en el laboratorio.

Conclusiones

- El uso de los algoritmos planteados en este trabajo presenta una concordancia no debida al azar que permite una identificación igual entre observadores para los géneros *Rhizopus* ($\kappa=0.91$), *Mucor* ($\kappa=0.84$), *Lichtheimia* (*Absidia*), *Apophysomyces* y *Syncephalastrum*.
- Existe concordancia entre la identificación del género del mucoral encontrado, a través de los algoritmos planteados en este trabajo, comparado con la identificación molecular del mismo (89.4%), sin embargo no para la identificación a nivel especie del género *Rhizopus* (62.5%), lo que nos indica la necesidad de desarrollar algoritmos más explícitos respecto a las características de las especies que conforman el género *Rhizopus*.
- En la identificación correcta de los mucorales es importante el tiempo de incubación previo a la realización del examen directo con el fin de tener una observación precisa de las estructuras.
- Para la identificación de la especie de los mucorales es necesario conocer la micromorfología de las estructuras (esporangióforo, esporangiosporas, esporangiolos y clamidoconidios) así como una búsqueda y medición de las más representativas.
- El reporte de susceptibilidad *in vitro* nos muestra, para los mucorales estudiados, la mejor actividad para la anfotericina B, seguida de posaconazol; sin embargo muestra resistencia hacia voriconazol y hacia itraconazol.
- Los valores de CMI mostrados para *Apophysomyces elegans* (HGM-Z-17) y *Cunninghamella bertholletiae* (HGM-Z-18) nos muestran su resistencia hacia anfotericina B, por lo tanto la identificación de alguno de estos dos mucorales como agente causal de mucormicosis nos debe advertir de una posible respuesta inadecuada hacia el tratamiento de elección (anfotericina B), y sugerir el uso de posaconazol como terapia alternativa.

- El valor en las CMI's hacia anfotericina B y posaconazol, varían incluso entre las cepas que pertenecen al mismo género y especie, sin embargo lo obtenido en este trabajo, nos permite, comprobar las diferencias que existen entre los distintos agentes etiológicos de la mucormicosis y nos hace ver la necesidad de realizar estudios similares con una mayor cantidad y variedad de cepas que permitan generalizar un comportamiento con respecto a la susceptibilidad a los antifúngicos disponibles que permitan, en ausencia de la susceptibilidad de la cepa, elegir el tratamiento más adecuado.

Bibliografía

1. Bonifaz A. *Micología Médica Básica*. 3ra ed. Ed. Mc Graw Hill. D.F., México, 2009.
2. Roden MM, Zaoutis TE, Buchanan WL, Knudsen TA, Sarkisova TA, Schaufele RL, Sein M, Sein T, Chiou CC, Chu JH, Kontoyiannis DP, Walsh TJ. Epidemiology and outcome of zygomycosis: a review of 929 reported cases. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 634-653.
3. Ribes JA, Vanover-Sams CL, Baker DJ. *Zygomycetes* in human disease. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 236-301.
4. Abramson E, Wilson D. Rhinocerebral phycomycosis in association with ketoacidosis. *Ann Inter Med* 1967; 66: 737-742.
5. Reed C, Ibrahim A, Edwards JE Jr, Walot I, Spellberg B. Deferasirox, an iron-chelating agent, as salvage therapy for rhinocerebral mucormycosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 3968-3969.
6. Mastroianni A. Paranasal sinus mucormycosis in an immunocompetent host: efficacy and safety of combination therapy with liposomal amphotericin B and adjuvant rHuGM-CSF. *Infez Med* 2004; 12: 278-283.
7. Gil-Lamaignere C, Simitsopoulou M, Roilides E, Maloukou A, Winn RM, Walsh TJ. Interferon-gamma and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augment the activity of polymorphonuclear leukocytes against medically important *Zygomycetes*. *J Infect Dis* 2005; 191: 1180-1187.
8. García-Díaz JB, Palau L, Pankey GA. Resolution of rhinocerebral zygomycosis associated with adjuvant administration of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 145-150.
9. Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, *et al*. A higher level phylogenetic classification of the fungi. *Mycol Res*. 2007; 111: 509-547.
10. Alastruey-Izquierdo A, Castelli MV, Cuesta I, Monzon A, Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL. Activity of posaconazole and other antifungal agents against *Mucorales* strains identified by sequencing of internal transcribed spacers. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 1686-1689.

11. Del Palacio A, Ramos MJ, Pérez A, Arribi A, Amondarain I, Alonso S, Ortiz MC. Zygomicosis. A propósito de cinco casos. *Rev Iberoam Micol* 1999; 16: 50-56.
12. Ibrahim AS, Spellberg B, Avanesian V, Fu, Y, Edwards JE Jr. *Rhizopus oryzae* adheres to, is phagocytosed by, and damages endothelial cells *in vitro*. *Infect Immun* 2005; 73: 778-783.
13. Khan ZU, Ahmad S, Brazda A, Chandy, R. *Mucor circinelloides* as a cause of invasive maxillofacial zygomycosis: an emerging dimorphic pathogen with reduced susceptibility to posaconazole. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 1244-1248.
14. Belfiori R, Terenzi A, Marchesini L, Repetto A. *Absidia corymbifera* in an immune competent accident victim with multiple abdominal injuries: case report. *BMC Infect Dis* 2007; 7:46-51.
15. Garcia-Hermoso D, Hoinard D, Gantier JC, Grenouillet F, Dromer F, Dannaoui E. Molecular and phenotypic evaluation of *Lichtheimia corymbifera* (formerly *Absidia corymbifera*) complex isolates associated with human mucormycosis: rehabilitation of *L. ramosa*. *J Clin Microbiol*. 2009; 47: 3862-3870.
16. Álvarez E, Stchigel AM, Cano J, Sutton DA, Fothergill AW, Chander J, Salas V, Rinaldi MG, Guarro J. Molecular phylogenetic diversity of the emerging mucoralean fungus *Apophysomyces*: proposal of three new species. *Rev Iberoam Micol* 2010; 27: 80-89.
17. Liang KP, Tleyjeh IM, Wilson WR, Roberts GD, Temesgen Z. Rhino-orbitocerebral mucormycosis caused by *Apophysomyces elegans*. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 892-898.
18. Chakrabarti A, Ghosh A, Prasad GS, David JK, Gupta S, Das A, Sakhuja V, Panda NK, Singh SK, Das S, Chakrabarti T. *Apophysomyces elegans*: an emerging *Zygomycete* in India. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 783-788.
19. Dannaoui E, Meletiadis J, Mouton JW, Meis JF, Verweij PE. *In vitro* susceptibilities of *Zygomycetes* to conventional and new antifungals. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 45-52.

20. Munipalli B, Rinaldi MG, Greenberg SB. *Cokeromyces recurvatus* isolated from pleural and peritoneal fluid: case report. J Clin Microbiol 1996; 34: 2601-2603.
21. Ryan LJ, Ferrieri P, Powell R, Zeki S, Pambuccian S. Fatal *Cokeromyces recurvatus* pneumonia: report of a case highlighting the potential for histopathologic misdiagnosis as *Coccidioides*. Int J Surg Pathol. 2009; 19: 373-376.
22. Álvarez E, Sutton DA, Cano J, Fothergill AW, Stchigel A, Rinaldi MG, Guarro J. Spectrum of *Zygomycete* species identified in clinically significant specimens in the United States. J Clin Microbiol. 2009; 47:1650-1656.
23. Torres-Narbona N, Guinea J, Martínez Alarcón J, Peláez T, Bouza E. *In vitro* activities of amphotericin B, caspofungin, itraconazole, posaconazole, and voriconazole against 45 clinical isolates of *Zygomycetes*: comparison of CLSI M38-A, Sensititre YeastOne, and the Etest. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51: 1126-1129.
24. Almyroudis NG, Sutton DA, Fothergill AW, Rinaldi MG, Kusne S. *In vitro* susceptibilities of 217 clinical isolates of *Zygomycetes* to conventional and new antifungal agents. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51: 2587-2590.
25. Zeilender S, Drenning D, Glauser FL, Bechard D. Fatal *Cunninghamella bertholletiae* infection in an immunocompetent patient. Chest 1990; 97: 1482-1483.
26. Wilson PA. Zygomycosis due to *Saksenaea vasiformis* caused by a magpie peck. Med J Aust 2008; 189: 521-522.
27. Baradkar VP, Mathur M, Taklikar S, Rathi M, Kumar S. Fatal rhino-orbito-cerebral infection caused by *Saksenaea vasiformis* in an immunocompetent individual: first case report from India. Indian J Med Microbiol 2008; 26: 385-387.
28. Schlebusch S, Looke DF. Intraabdominal zygomycosis caused by *Syncephalastrum racemosum* infection successfully treated with partial surgical debridement and high-dose amphotericin B lipid complex. J Clin Microbiol 2005; 43: 5825-5827.
29. Arenas R, Micología Médica Ilustrada. 3ra ed. Ed. Mc Graw Hill. D.F., México, 2008.

30. Dannaoui E, Schwarz P, Slany M, Loeffler J, Jorde AT, Cuenca-Estrella M, Hauser PM, Shrief R, Huerre M, Freiburger T, Gaustad P, Rodriguez-Tudela JL, Bille J, Denning DW, Bretagne S, Lortholary O. Molecular detection and identification of *Zygomycetes* species from paraffin-embedded tissues in a murine model of disseminated zygomycosis: a collaborative European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Fungal Infection Study Group (EFISG) evaluation. *J Clin Microbiol*. 2010; 48: 2043-2046.
31. Machouart M, Larché J, Burton K, Collomb J, Maurer P, Cintrat A, Biava MF, Greciano S, Kuijpers AF, Contet-Audonneau N, de Hoog GS, Gérard A, Fortier B. Genetic identification of the main opportunistic *Mucorales* by PCR-restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 805-810.
32. Hata DJ, Buckwalter SP, Pritt BS, Roberts GD, Wengenack NL. Real-time PCR method for detection of *Zygomycetes*. *J Clin Microbiol*. 2008; 46: 2353-2358.
33. Ibrahim AS, Avanesian V, Spellberg B, Edwards JE. Liposomal amphotericin B, and not amphotericin B deoxycholate, improves survival of diabetic mice infected with *Rhizopus oryzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3343-3344.
34. Spellberg B, Walsh T, Kontoyiannis D, Edwards J, Ibrahim A. Recent advances in the management of mucormycosis: from bench to bedside. *Clin Infect Dis* 2009; 48: 1743-1751.
35. Ibrahim A, Bowman J, Avanesian V, et al. Caspofungin inhibits *Rhizopus oryzae* 1,3- β -D-glucan synthase, lowers burden in brain measured by quantitative PCR, and improves survival at a low but not a high dose during murine disseminated zygomycosis. *Antimicrob Agent Chemother* 2005; 49: 721-727.
36. Reed C, Bryant R, Ibrahim AS, Edwards J Jr, Filler SG, Goldberg R, Spellberg B. Combination polyene-caspofungin treatment of rhino-orbital-cerebral mucormycosis. *Clin Infect Dis* 2008; 47: 364-371.
37. Sun QN, Fothergill AW, McCarthy DI, Rinaldi MG, Graybill JR. *In vitro* activities of posaconazole, itraconazole, voriconazole, amphotericin B, and

- fluconazole against 37 clinical isolates of *Zygomycetes*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1581-1582.
38. Sun QN, Najvar LK, Bocanegra R, Loebenberg D, Graybill JR. *In vivo* activity of posaconazole against *Mucor* spp. in an immunosuppressed-mouse model. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 2310-2312.
39. Gil-Lamaignere C, Hess R, Salvenmoser S, Heyn K, Kappe R, Müller FM. Effect of media composition and *in vitro* activity of posaconazole, caspofungin and voriconazole against *Zygomycetes*. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55: 1016-1019.
40. Sabatelli F, Patel R, Mann PA, Mendrick CA, Norris CC, Hare R, Loebenberg D, Black TA, McNicholas PM. *In vitro* activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50: 2009-2015.
41. Cuenca-Estrella M, Gómez-López A, Mellado E, Buitrago MJ, Monzon A, Rodríguez-Tudela JL. Head-to-head comparison of the activities of currently available antifungal agents against 3,378 Spanish clinical isolates of yeasts and filamentous fungi. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 917-921.
42. Stark D, Milliken S, Marriott D, Harkness J. *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* sinus-orbital zygomycosis in an immunosuppressed patient: successful treatment with posaconazole after a complicated clinical course. *J Med Microbiol* 2007; 56: 699-701.
43. Greenberg RN, Mullane K, van Burik JA, Raad I, Abzug MJ, Anstead G, Herbrecht R, Langston A, Marr KA, Schiller G, Schuster M, Wingard JR, Gonzalez CE, Revankar SG, Corcoran G, Kryscio RJ, Hare R. Posaconazole as salvage therapy for zygomycosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 126-133.
44. Yoon YK, Kim MJ, Chung YG, Shin Y. Successful treatment of a case with rhino-orbital-cerebral mucormycosis by the combination of neurosurgical intervention and the sequential use of amphotericin B and posaconazole. *J Korean Neurosurg Soc* 2010; 47: 74-77.

45. Tobón AM, Arango M, Fernández D, Restrepo A. Mucormycosis (zygomycosis) in a heart-kidney transplant recipient: recovery after posaconazole therapy. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 1488-1491.
46. Van Burik JA, Hare RS, Solomon HF, Corrado ML, Kontoyiannis DP. Posaconazole is effective as salvage therapy in zygomycosis: a retrospective summary of 91 cases. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 61-65.
47. Paul S, Marty FM, Colson YL. Treatment of cavitary pulmonary zygomycosis with surgical resection and posaconazole. *Ann Thorac Surg* 2006; 82: 338-340.
48. Rutar T, Cockerham KP. Periorbital zygomycosis (mucormycosis) treated with posaconazole. *Am J Ophthalmol* 2006; 142: 187-188.
49. Almaslamani M, Taj-Aldeen SJ, Garcia-Hermoso D, Dannaoui E, Alsoub H, Alkhal A. An increasing trend of cutaneous zygomycosis caused by *Mycocladius corymbifer* (formerly *Absidia corymbifera*): report of two cases and review of primary cutaneous *Mycocladius* infections. *Med Mycol* 2009; 47: 532-538.
50. Vigouroux S, Morin O, Moreau P, Méchinaud F, Morineau N, Mahé B, Chevallier P, Guillaume T, Dubruille V, Harousseau JL, Milpied N. Zygomycosis after prolonged use of voriconazole in immunocompromised patients with hematologic disease: attention required. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 35-37.
51. Marty FM, Cosimi LA, Baden LR. Breakthrough zygomycosis after voriconazole treatment in recipients of hematopoietic stem-cell transplants. *N Engl J Med* 2004; 350: 950-952.
52. Trifilio SM, Bennett CL, Yarnold PR, McKoy JM, Parada J, Mehta J, Chamilos G, Palella F, Kennedy L, Mullane K, Tallman MS, Evens A, Scheetz MH, Blum W, Kontoyiannis DP. Breakthrough zygomycosis after voriconazole administration among patients with hematologic malignancies who receive hematopoietic stem-cell transplants or intensive chemotherapy. *Bone Marrow Transplant* 2007; 39: 425-429.
53. National Committee for Clinical and Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi.

Approved standard M 38-A. National Committee for Clinical and Laboratory Standards, Wayne PA, 2002.

54. <http://www.zygomycetes.org/index.php?id=97>
55. <http://www.mycobank.org/MycoTaxo.aspx?Link=T&Rec=107231>
56. <http://www.mycobank.org/MycoTaxo.aspx?Link=T&Rec=177331>
57. http://www.dipbot.unict.it/sistematica_es/Rhizopu.html
58. http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Zygomycetes/Saksenaea/
59. http://www.doctorfungus.org/imageban/images/DSutton_06june/Rhizopus_schipperae_1.jpg
60. Mendoza-Núñez VM, Sánchez-Rodríguez MA (eds.). Análisis y difusión de resultados científicos. 1ª edición: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM; 2001.
61. González GM, Elizondo M, Ayala J. Trends in species distribution and susceptibility of bloodstream isolates of *Candida* collected in Monterrey, Mexico, to seven antifungal agents: results of a 3-year (2004 to 2007) surveillance study. *J Clin Microbiol.* 2008; 46: 2902-2905.