



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Frecuencia de queratitis micótica en pacientes del Servicio de
Oftalmología y sensibilidad antifúngica de los aislados.**

TESIS

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

PRESENTA

MARIANA MANZANO CASARRUBIAS



MÉXICO, D.F.

2015



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: ABEL GUTIERREZ RAMOS
VOCAL: JOSE ALEXANDRO BONIFAZ TRUJILLO
SECRETARIO: LUIS JAVIER MENDEZ TOVAR
1er. SUPLENTE: MISAEL GONZALEZ IBARRA
2° SUPLENTE: EDUARDO BONILLA ESPINOSA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

1) LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN DERMATOLOGÍA Y MICOLOGÍA U.M.A.E., HOSPITAL DE ESPECIALIDADES, CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI, IMSS; 2) LABORATORIO CENTRAL. U.M.A.E. HOSPITAL DE ESPECIALIDADES, CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI, IMSS.

ASESOR DEL TEMA:

DR. LUIS JAVIER MÉNDEZ TOVAR

SUSTENTANTE:

MARIANA MANZANO CASARRUBIAS

ÍNDICE

Resumen.....	1
Lista de abreviaturas.....	3
1. Antecedentes.....	4
1.1 Queratitis.....	4
1.2 Queratitis micótica.....	6
1.3 Historia.....	7
1.4 Epidemiología.....	9
1.4.1 Distribución geográfica.....	9
1.4.2 Fuente de infección y hábitat.....	10
1.4.3 Mecanismo de infección.....	10
1.4.4 Sexo y edad.....	11
1.4.5 Ocupación.....	11
1.4.6 Periodo de incubación.....	11
1.5 Patogenia.....	12
1.6 Diagnóstico diferencial.....	12
1.7 Diagnóstico de laboratorio.....	13
1.7.1 Toma de muestra.....	13
1.7.2 Exámenes en fresco y tinciones.....	13
1.7.3 Cultivos.....	14
1.7.4 Biopsia.....	14
1.7.5 Técnicas moleculares.....	15
1.8 Agente etiológicos.....	15
1.9 Tratamiento.....	17
1.10 Sensibilidad antifúngica.....	18

2. Planteamiento del problema.....	22
3. Justificación.....	22
4. Hipótesis.....	22
5. Objetivos	23
5.1 Objetivos generales	23
5.2 Objetivos particulares.....	23
6. Material y métodos	23
6.1 Criterios de inclusión.....	23
6.2 Especímenes	24
6.3 Aislamiento de agentes.....	25
6.4 Frotis.....	25
6.5 Examen directo	25
6.6 Identificación de los aislados	25
6.7 Pruebas de sensibilidad antifúngica.....	25
7. Resultados	26
7.1 Casos de queratitis micótica:	26
7.2 Sensibilidad antifúngica de los aislados.....	30
8. Discusión.....	32
9. Conclusiones.....	36
10. Bibliografía	37
11. Apéndice	42
11.1 Medios de cultivo	42
11.2 Tinción Gram.....	43
11.3 Microcultivos	44
11.4 Técnicas.....	44

11.4.1 Reacción en cadena de la polimerasa	44
11.4.2 Estudios de sensibilidad antifúngica	46
11.5 Resultados de sensibilidad antifúngica	48

Resumen

Antecedentes: Queratitis es la inflamación corneal. Las causas son diversas como: contacto con sustancias químicas; traumatismos con materiales diversos; infecciones bacterianas, virales o fúngicas e incluso hay queratitis por parásitos. De acuerdo con Ferrer y cols., aproximadamente 28% de las queratitis tienen un origen micótico, aunque dependiendo de la casuística esta cifra varía entre 6% a 53%. Clínicamente los pacientes presentan: ardor, dolor, fotofobia y en ocasiones puede presentarse una ulceración corneal con disminución de la agudeza visual pérdida de la vista. En México hay pocos estudios acerca de la frecuencia de queratitis micótica, sus agentes y la sensibilidad antifúngica de los aislados. El Servicio de Oftalmología del Hospital de Especialidades del CMN Siglo XXI, atiende a gran número de pacientes con queratitis y hasta el momento no se ha realizado ningún estudio para determinar la importancia de los hongos en esta patología.

Objetivos: Determinar la frecuencia de queratitis micótica, sistematizar las características demográficas de la población con queratitis micótica y los factores predisponentes. Determinar la frecuencia de los agentes aislados y establecer el perfil de sensibilidad antifúngica *in vitro*.

Metodología: El estudio es de tipo observacional, prospectivo, transversal y analítico. Incluyó todas las muestras de pacientes con queratitis enviadas al Laboratorio de Micología Médica durante el periodo de 1 abril a 30 septiembre de 2013. A cada espécimen se le realizó: examen directo, frotis teñido con Gram, cultivo y en los casos que se obtuvo desarrollo de hongos, a éstos se les investigó el perfil de sensibilidad antifúngica por la técnica de microdilución en caldo siguiendo los lineamientos de los documentos **M38-A2** y **M27-A3** del Clinical and Laboratory Standards Institute (**CLSI**). La identificación de los agentes se realizó por medio de estudios microbiológicos y técnicas moleculares.

Resultados: Se estudiaron 30 muestras y se obtuvo desarrollo fúngico en 4 (13.3%), tres aislados fueron del género *Fusarium*; el primer aislado de *Fusarium* sp., no se desarrolló en los subcultivos, de los otros tres uno fue *F. oxysporum*; otro fue *F. solani*. El cuarto aislado fúngico, únicamente presentó micelio sin estructuras de reproducción útiles para su identificación o para hacer estudios de sensibilidad, sin embargo, por PCR presuntivamente se trata de *Pestalotiopsis Microspora*. Las pruebas de sensibilidad antifúngica, sólo se aplicaron a los dos aislados de *Fusarium* con crecimiento e identificación precisa; ambos presentaron resistencia a: fluconazol, itraconazol, posaconazol, y sensibilidad a voriconazol y anfotericina B.

Conclusiones: Más del 10% de las queratitis estudiadas fueron causadas por hongos. Tres de los cuatro casos de las QM estuvieron asociadas al género *Fusarium*. Las cepas de *Fusarium* aisladas presentaron resistencia a la mayoría de los azoles: itraconazol, posaconazol, fluconazol, pero sensibilidad a voriconazol, y anfotericina B. La dificultad que se tiene para identificar a los agentes etiológicos hace indispensable el uso de técnicas moleculares, los resultados de sensibilidad demuestran la importancia de hacer estudios de susceptibilidad antimicótica antes de prescribir el tratamiento.

Lista de abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AMB: Anfotericina B

ANF: Anidulofungina

ASD: Agar destroxa Saboraud

ASD-A: Agar dextrose Saboraud

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

CMI: Concentración mínima inhibitoria

CMN: Centro Médico Nacional

CSF: Caspofungina

DMSO: Dimetil-sulfóxido

FDA: Food and Drug Administration

ITZ: Itraconazol

KOH: Hidróxido de potasio

KTZ: Ketoconazol

MQ: Mili-Q®

PZC: Posaconazol

QM: Queratitis micótica

SO: Servicio de Oftalmología

TRB: Terbinafina

VRZ: Voriconazol

1. Antecedentes

1.1 Queratitis

La queratitis es el término empleado para referirse a la inflamación de la córnea.

Estructura resistente, transparente, que carece de vascularización; esta se encuentra inmediatamente debajo de la conjuntiva ocular.

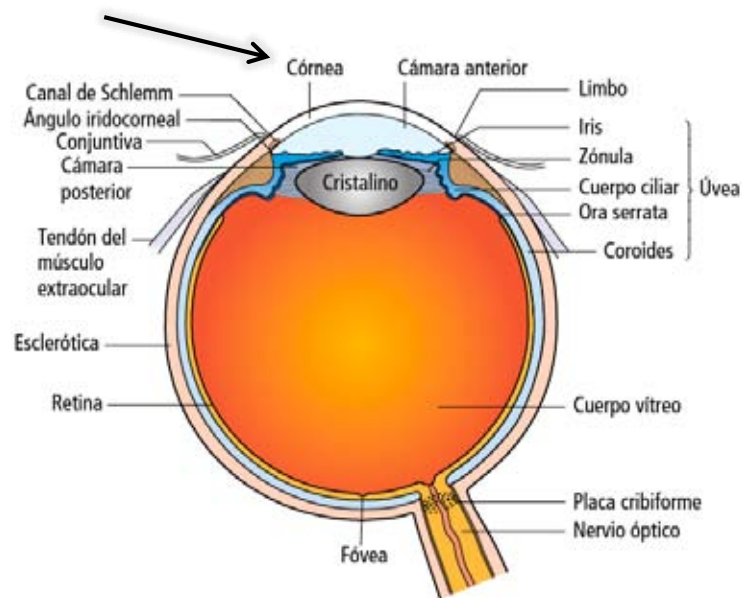


Figura 1 Anatomía del ojo, ubicación de la córnea (tomado de ref. 20).

La córnea está formada por cinco capas que son: 1) epitelio una capa escamosa no queratinizada engrosada periféricamente; 2) la membrana de Bowman capa acelular clara; 3) el estroma subyacente de fibrillas de colágeno, sustancia basal y fibroblastos; 4) la membrana de Descemet que constituye una lámina basal del endotelio corneal; y 5) el endotelio formada por una monocapa de células no regenerativas que controla la hidratación del estroma ⁽⁴¹⁾. En caso de defectos en el epitelio, el estroma o la capa de Bowman la córnea queda expuesta a infecciones por microorganismos y con ello puede comprometer la visión ^(20, 25, 42, 44).

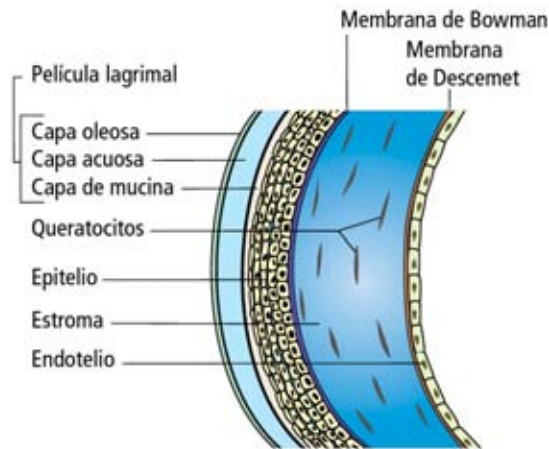


Figura 2 Estructura de la córnea (tomado de ref. 20)

La inflamación corneal puede ser originada por causas como: traumatismos, contacto con sustancias químicas e infecciones que incluye agresiones por bacterias, virus, hongos e incluso parásitos. Las principales manifestaciones clínicas son ardor, dolor y fotofobia ⁽²⁵⁾.

La queratitis puede clasificarse por parámetros como: a) **profundidad** y entonces puede ser superficial o intersticial; b) **evolución clínica** y se describe como leve, moderada o severa; y finalmente c) **tiempo de evolución** denominándose aguda si tiene menos de 30 días o crónica pasado ese tiempo ⁽²⁵⁾.

La causa más frecuente de queratitis son las infecciones (45.3 % y 71.9%) ^(4, 18). La inflamación corneal, es una patología muy importante ya que causa lesión ocular y puede resultar en pérdida visual, en algunos centros médicos, esta es una de las causas más común de ceguera. Las bacterias son la primera causa de infección, los más frecuentes son los cocos Gram positivos como: *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, bacterias del Orden Actinomicetales como *Nocardia spp.* y *M. fortuitum-chelonei*. Entre las bacterias Gram negativas es importante mencionar a *Pseudomonas aeruginosa* que en años recientes ha aumentado su incidencia. Entre los virus, destacan por su importancia herpes simple y herpes zoster. Dentro de los

parásitos, los protozoarios acuáticos del género *Acanthamoeba* son causa frecuente de lesión corneal (4, 24,25).

1.2 Queratitis micótica

La queratitis infecciosa micótica tiene como factores predisponentes: **traumatismos** con material vegetal contaminado con hongos; **tratamiento de inflamaciones oculares** con antibacterianos de amplio espectro o corticoesteroides; utilización de **lentes de contacto** contaminados. Finalmente puede ser un problema oftalmológico primario en personas que **trabajan al aire libre** principalmente en zonas tropicales donde el aire presenta una gran cantidad de conidios y el contacto frecuente favorece la infección. De acuerdo con muchos trabajos a la QM se le puede denominar de distintas formas: oculomicosis, queratitis fúngica, úlcera corneal micótica o queratomicosis (7).

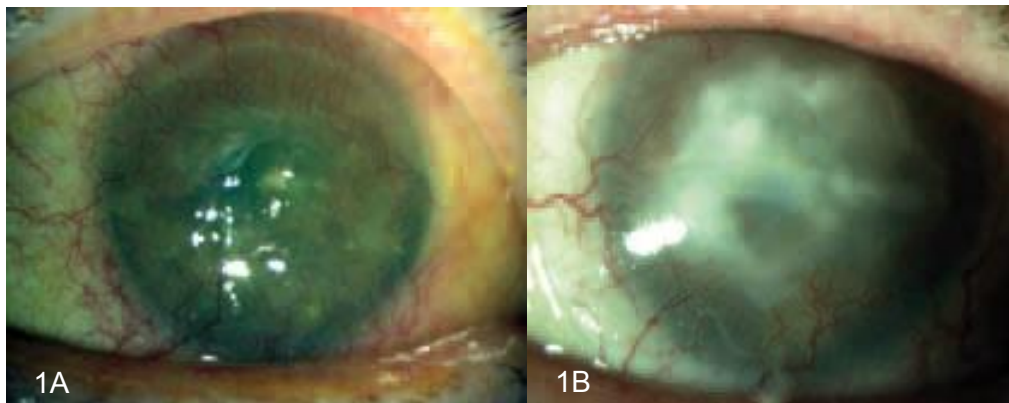


Figura 3 Queratitis micótica causada por el género *Aspergillus* inicialmente no diagnosticada. 1B. Evolución de queratitis fúngica de la figura 1A (tomado de ref. 21).

En los servicios de oftalmología, además de diagnosticar y tratar todo tipo de queratitis, también se realizan cirugías oculares diversas como: el colgajo conjuntival, la queratoplastia penetrante, la queratoplastia lamelar, y en casos

extremos la enucleación y evisceración del órgano que potencialmente pueden infectarse y evolucionar hacia una queratitis (34, 40, 41).

De acuerdo a Ferrer y cols., aproximadamente 28% de los casos de queratitis ulcerativa tiene un origen micótico, aunque esta cifra puede variar de 6% a 53% dependiendo de la ciudad y el centro de atención donde se realice la casuística. Como ejemplo de estas variaciones tenemos que en el Norte de la India, dos estudios presentaron frecuencias de 38% y 42% respectivamente mientras que, en Ibadan, Nigeria esta fue solo de 8.4% (12, 13, 22, 23, 34).

1.3 Historia

En la antigüedad, probablemente los primeros casos de queratitis fueron de tipo traumático y estuvieron relacionados con actividades cotidianas como la caza, la pesca o el cultivo agrícola, sin embargo, no hay registros al respecto. En los albores de la era moderna, se obtuvieron gran número de sustancias ácidas o alcalinas que fueron utilizadas ampliamente en las actividades humanas; posiblemente el contacto accidental del ojo con estas sustancias ocasionó también gran número de lesiones corneales de manera que actualmente es obligatorio el uso de anteojos o gafas especiales por las personas que manejan sustancias líquidas de estas características para protegerse.

Entre los agentes infecciosos (virus, bacterias, parásitos y hongos), la primera descripción de probable afección corneal por hongos la realizó Leber, quien en 1879 estudio el caso de un agricultor, que se lesionó con un grano de avena y posteriormente desarrolló una úlcera grave de la córnea e hipopion. El tratamiento no tuvo ningún éxito y la úlcera se cubrió con una membrana gris, el examen microscópico mostró una masa de elementos fúngicos, que después de realizar los cultivos correspondientes se identificó al agente como *Aspergillus glaucus*. Después de estos hallazgos Leber experimento en conejos y comprobó que este hongo puede crecer rápidamente en la córnea viva, produciendo una queratitis purulenta severa.

Tiempo después, Baumgarden describió los aspectos de un globo ocular que había sido enucleado; el cual había recibido un traumatismo nueve meses antes. La córnea tenía un color gris-verde y la cámara anterior estaba llena de sangre. La histología de la córnea mostró infiltrados densos empaquetados que refractaban la luz. Los cultivos no tuvieron éxito quizás por la inexperiencia de Baumgarden o tal vez las condiciones del tejido lo desvitalizaron en el momento de la enucleación.

También se menciona en 1882 el caso de un paciente que se lesionó la córnea un año antes y el cual resultó en una severa queratitis con hipopion. No presentó ulceración pero una porción de la córnea tenía un color gris-amarillento y con un volumen mayor que el resto de la misma. En la examinación microscópica se observaron masas densas de micelio en el tejido necrosado. Sin embargo, no se realizaron cultivos por lo cual este caso y el mencionado anteriormente de Baumgarden están sujetos a algunas objeciones ^(6, 15, 35, 37).

En el siglo pasado el reporte publicado por Paulter, Roberts y Bearmer en 1955, presentan el primer caso de úlcera corneal micótica causada por *Monosporium apiospermum* (*Scedosporium apiospermum*) en un granjero. En 1959 Gordon y colaboradores informaron sobre un segundo caso por el mismo hongo en otro paciente el cual fue tratado con nistatina y anfotericina B, logrando curación ⁽³²⁾. Para 1967 Naumann, Green y Zimmerman realizaron estudios histopatológicos en 73 pacientes con este padecimiento y lograron aislar el hongo de 11 casos. Otros investigadores que realizaron aportaciones importantes fueron Jones, Sexten y Rebell en 1970, aislando 38 cultivos de úlceras corneales micóticas y de ellas 29 producidas por *Fusarium spp.* En Argentina, Zapater, comunica en 1975 dos casos. Además hace una revisión bibliográfica mundial, señalando 112 casos originados por *Fusarium*. En México se describen los primeros casos de queratitis micótica por Machado en 1950 y De Buen en 1963 ^(3, 7).

En la actualidad las infecciones fúngicas como causa de lesión corneal han alcanzado una incidencia elevada en algunos países, como en la India

ciertos estudios muestran esta frecuencia 26.4% y 39.08%, en Pakistán la casuística es similar (36.8%). En México hay una la incidencia baja 10.91% ⁽¹⁸⁾. En el mundo, los agentes descritos con mayor frecuencia son *Fusarium* y *Aspergillus*, aunque *Candida* es un género que se reporta cada vez con mayor constancia como agente etiológico ^(12, 17, 18, 26, 30).

1.4 Epidemiología

1.4.1 Distribución geográfica

Esta enfermedad tiene distribución mundial, pero es más frecuente en los países subdesarrollados, principalmente en los que exista humedad elevada que podría incrementar el desarrollo de hongos contaminantes y en consecuencia el número de conidios en el ambiente. En Asia se presentan la mayor cantidad de casos, predominan en Nepal, Bangladesh, India, Sri Lanka, Tailandia, Singapur y Hong Kong. En América existen pocos reportes, y generalmente se refieren a casos clínicos únicos habiendo una carencia de casuísticas que permitan determinar la gravedad del problema sin embargo como lo menciona Leck el número de enfermos va en aumento ^(7, 23). En México particularmente se tiene una carencia de datos casi total, debido a que, ninguna micosis es de reporte obligatorio, en relación a queratitis fúngica se tienen sólo tres casuísticas publicadas una por Miroslava Villegas-Flores y cols. en 2012 en la cual se incluyeron 86 pacientes, otra por Virgina Vazzini Zago y cols. en 2010 quienes estudiaron 219 casos y la más antigua por Olvera-Elizalde y cols. en 2000 realizada en los principales Hospitales de Zona del IMSS que atienden oculopatías en Veracruz con 21 expedientes de pacientes con diagnóstico de úlcera corneal micótica ^(27, 41, 43).

1.4.2 Fuente de infección y hábitat

La mayoría de los agentes que causan la QM son hongos ambientales. Como se mencionó en párrafos anteriores, estos microorganismos proliferan mejor en climas cálidos y húmedos; también, se han registrado gran número de infecciones en pacientes que usan lentes de contacto, en estos casos, generalmente, las levaduras del género *Candida* son los agentes principales; pero también ha habido infecciones de lentes de contacto por hongos filamentosos por el uso de líquidos para limpieza, por ejemplo Laboratorios Bausch & Lomb puso a la venta un lote de solución limpiadora contaminada que ocasionó algunos casos de QM en EUA causadas por *Fusarium* sp (Fig 4) ^(3,7).

La Jornada
de ciencias

MARTES • 16 • MAYO • 2006 • CIENCIAS 3a

■ Algunos compuestos aumentan riesgo de infección asociada a un hongo

Retira Bausch & Lomb solución para lentes de contacto que causa ceguera

■ REUTERS

CHICAGO, 15 DE MAYO. La estadounidense Bausch & Lomb Inc. dijo el lunes que amplió una orden de retiro inmediato del líquido para lentes de contacto ReNu, con Moisture-Loc, en todos sus mercados alrededor del mundo.

La compañía de productos oftalmológicos manifestó que algunos compuestos del producto podrían estar aumentando el riesgo de una infección grave, denominada *Queratitis fusarium*, que si bien es poco común puede llegar a causar ceguera.

Bausch (BOL.N) sostuvo que algunos aspectos de la fórmula MoistureLoc podrían aumentar el riesgo de la infección causada por el hongo *Fusarium*, en circunstancias inusuales.

Los ejecutivos de la empresa pensaron en un principio que la infección podría estar relacionada con una posible contaminación en su planta de Greenville, en el estado de Carolina del Sur.

Sin embargo, tras amplia investigación, concluyeron que "no hay evidencia de contaminación, alteración, falsificación o falla de esterilidad en el producto", señaló en un comunicado Ronald Zarrella, presidente ejecutivo de Bausch.

Por su parte, la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA, por su siglas en inglés) de Estados Unidos dijo el lunes que apoyaba la decisión de Bausch de retirar el producto y agregó que la agencia daría a conocer los resultados de la inspección a la planta de la empresa "de manera inmediata".

Las acciones de Bausch subían 5.06 dólares, o 11.4 por ciento, a 49.50 dólares, en la Bolsa de Nueva York.

La empresa había retirado el producto en Estados Unidos y Asia, después que fuera vinculado con un brote de las infecciones de hongos.

Bausch señaló que el retiro inmediato del producto se amplió inclusive a países donde la compañía no registró tendencias inusuales en infecciones del hongo *Fusarium*, como China, Europa, Medio Oriente y África.

Bausch dijo que no ha hecho una estimación del impacto financiero del retiro.

La compañía recomendó a los usuarios de MoistureLoc cambiar por ReNu MultiPlus o ReNu Multi-Purpose, que tienen una fórmula diferente a la del producto retirado.

La FDA dijo que, por el momento, los datos que posee no señalan problemas con las marcas de Bausch ReNu MultiPlus o ReNu Multi-Purpose.

Figura 4 Publicación en un diario de circulación nacional de infección ocular debida a líquido para limpiar lentes contaminados con hongos.

1.4.3 Mecanismo de infección

Los agentes etiológicos llegan a la córnea generalmente por traumatismos con material vegetal (fragmentos de madera, hojas, polvo, etc.). En la mayoría de casos, los pacientes no solicitan consultas por esos accidentes y si desarrollan conjuntivitis se aplican antibacterianos y esteroides lo que facilita el desarrollo de hongos. Otras formas en la que puede afectarse la córnea y facilitar la infección

micótica es por infecciones virales como el herpes zoster o parasitosis diversas, como pueden ser las causadas por *Acanthameba* ⁽⁷⁾.

1.4.4 Sexo y edad

La queratitis micótica se presenta en individuos de cualquier edad y sexo, sin embargo, el periodo de mayor incidencia coincide con el etapa de productividad esto es entre la 3ª y 5ª década de vida, también son más numerosos los casos en hombres y esto probablemente asociado con actividades laborales o descuidos ^(12, 26).

1.4.5 Ocupación

La enfermedad la puede adquirir cualquier persona que sufra algún traumatismo corneal, pero los más susceptibles son los trabajadores al aire libre como: campesinos, granjeros, leñadores, jardineros y trilladores ⁽⁷⁾.

1.4.6 Periodo de incubación

El intervalo de tiempo a partir del traumatismo y hasta que inician las manifestaciones clínicas puede ser corto de 24 a 48 horas pero también puede ser largo, como de 10 a 21 días. Esto dependerá entre otros factores del género del microorganismo, virulencia del agente, el tamaño del inóculo y la resistencia del individuo ^(2, 7, 27).

1.5 Patogenia

El ojo cuenta con mecanismos de defensa que incluyen funciones mecánicas enzimáticas e inmunológicas, que lo protegen. Entre las mecánicas tenemos el movimiento de los párpados y el barrido de partículas por las lágrimas. Además, el epitelio corneal es una estructura firme y resistente a la invasión de microorganismos ⁽²⁵⁾. De las enzimas es importante mencionar la lisozima que es capaz de destruir las paredes tanto de bacteria como de algunos hongos que llegan a la conjuntiva. La inflamación local es un mecanismo inmunológico inespecífico, pero también es posible que a partir de agentes depositados en el ojo se inicie una respuesta inmune adaptativa.

Generalmente los hongos que invaden la córnea, aprovechan debilidades locales o alteración de los mecanismos de defensa para instalarse. Una vez que han penetrado o invadido la superficie corneal, tanto mohos como levaduras liberan enzimas como: proteasas, colagenasas, fosfolipasas y otros productos extracelulares que facilitan su penetración en el estroma corneal. Estas enzimas, los antígenos fúngicos y las toxinas liberadas en la córnea que causan inflamación, pueden ocasionar necrosis y daño de su arquitectura comprometiendo así la integridad y función del ojo ⁽²⁵⁾.

1.6 Diagnóstico diferencial

Las queratitis micóticas, se pueden confundir con úlceras corneales bacterianas y virales, además de las causadas por *Acanthamoeba*, y también con las úlceras secundarias a parálisis facial, úlceras serpiginosas y de Mooren, queratitis herpética, queratitis dendrítica ⁽²⁵⁾.

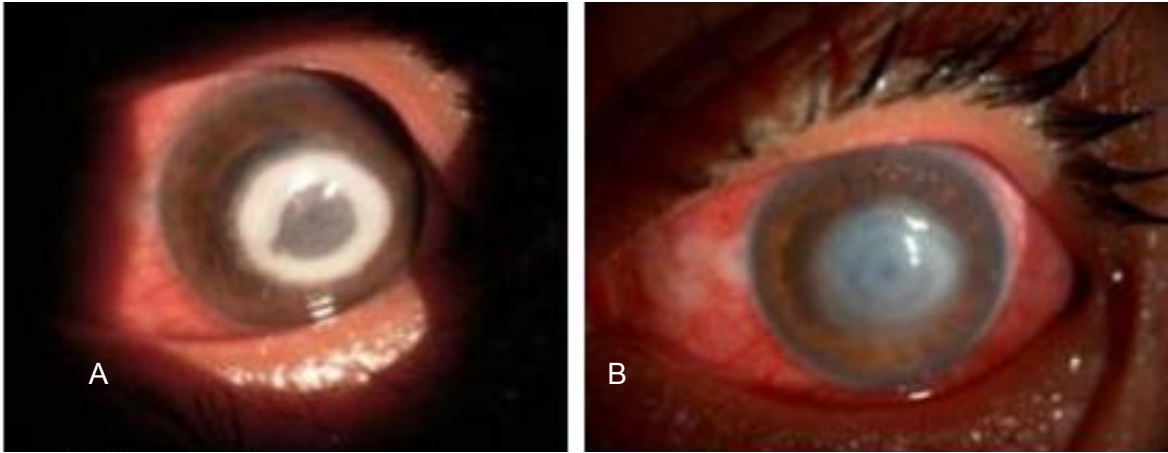


Figura 5 Ejemplo de úlcera corneal por *S. aureus*. A: Imagen al momento de ingreso; y B: 9 días después del tratamiento (tomado de ref. 8).

1.7 Diagnóstico de laboratorio

1.7.1 Toma de muestra

Es recomendable que la muestra sea obtenida por un oftalmólogo, ya que es un procedimiento muy delicado. Primero se debe anestésiar localmente el ojo, con unas gotas de propacaína, clorhidrato de tetracaína al 0,5%, o bien, xilocaína 4%; con una espátula de Kimura o con una hoja de bisturí se raspa la úlcera corneal tanto en los bordes como en el centro con el fin de obtener escamas o exudados. La muestra obtenida se divide en dos porciones, una para realizar el cultivo y la otra para las observaciones microscópicas ^(33, 40).

1.7.2 Exámenes en fresco y tinciones

Examen en fresco. El material es colocado entre portaobjetos y cubreobjetos con KOH al 10% y se observa al microscopio; otra forma de hacerlo es agregando al material una gota de azul de algodón lactofenol y se procede a buscar las hifas o levaduras ^(23, 40).

Frotis. El material se extiende en un portaobjetos, se fija de acuerdo a la tinción deseada, entre otras técnicas: Gram, Giemsa, PAS, Grocott, o Papanicolaou. Si se cuenta con microscopio de fluorescencia, también se puede utilizar blanco de calcoflúor o anaranjado de acridina. Con cualquiera de estas técnicas se observan hifas que pueden ser hialinas u oscuras, anchas, tortuosas e irregulares, generalmente tabicadas y poco ramificadas que pertenecen a diversos hongos filamentosos como *Aspergillus* spp, y *Fusarium* spp., *Alternaria* spp, *Phialophora* spp, etc. En los casos de queratitis por *Candida* spp., se pueden observar blastoconidios y pseudohifas o hifas^(7, 28).

1.7.3 Cultivos

Debido a que los agentes etiológicos son microorganismos contaminantes y oportunistas, la muestra se debe sembrar en medios sin antibióticos como agar dextrosa Sabouraud (ADS) y también en ADS adicionado con cicloheximida y cloranfenicol (ADS-A). Además de esos medios primarios, se pueden sembrar en: agar papa dextrosa, agar extracto de levadura, agar sangre, agar chocolate, caldo tioglicolato o agar BHI^(11, 25, 33).

Los cultivos, se incuban a 25°C y a 37°C. En algunos casos, a partir de 72h se puede observar crecimiento algunos agentes tienen un periodo de adaptación mayor, por lo tanto, los cultivos deben conservarse al menos tres semanas, este retraso en el desarrollo también ocurre si el paciente está recibiendo tratamiento^(7,25).

1.7.4 Biopsia

Cuando los exámenes directos han sido negativos, la biopsia es de gran utilidad para detectar y en su caso aislar e identificar el agente etiológico. Para este fin, es necesario que el material se tiña con PAS o Grocott y si hay suficiente espécimen,

se debe colocar una parte en solución salina estéril mezclarlo y posteriormente sembrarlo en los medios indicados ⁽¹⁴⁾.

1.7.5 Técnicas moleculares

En los últimos años se han incorporado nuevas herramientas de diagnóstico con capacidad de detección e identificación del material genético en cualquier tipo. El diagnóstico molecular se basa en la detección del ácido desoxirribonucleico (ADN) por la reacción de la cadena de polimerasa (PCR) en muestras oculares. El primer reporte de esta técnica en fue hecho por Alexandrakis en 1996 y en 1998 Lohmann publicó el primer trabajo basado en “*primers*” universales ⁽¹³⁾.

1.8 Agentes etiológicos

Esta infección puede tener una etiología diversa y amplia, se han reportado más de 60 géneros de hongos; que pueden ser filamentosos ya se hialinos como *Fusarium*, *Aspergillus*, *Acremonium*, *Penicillium* o dematiáceos como: *Curvularia*, *Alternaria*, *Cladosporium* y desde luego, también levaduras principalmente las del género *Candida* ^(7,25).

Hialohifomicetos	Feohifomicetos	Levaduras
<i>Fusarium</i> spp.	<i>Alternaria</i> spp.	<i>Candida</i> spp.
<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Curvularia</i> spp.	<i>Cryptococcus</i> spp.
<i>Penicillium</i> spp.	<i>Dreschlera</i> spp.	<i>Trichosporon</i> spp.
<i>Acremonium</i> spp.	<i>Cladosporium</i> spp.	<i>Rhodotorula</i> spp.
<i>Scedosporium</i> spp.	<i>Phialopora</i> spp.	<i>Geotrichum</i> spp.
<i>Verticillium</i> spp.	<i>Bipolaris</i> spp	
<i>Rhizopus</i> spp.	<i>Lecytophora</i> spp.	

<i>Pseudoallescheria boydii</i>	<i>Phoma spp.</i>	
<i>Paecilomyces spp.</i>	<i>Aereobasidium spp.</i>	

Tabla 1 Agentes etiológicos más frecuentes de la queratitis micótica.

La queratitis micótica más común es la causada por los hongos filamentosos hialinos como *Fusarium spp.* y *Aspergillus spp.* De ellos las especies más comunes de *Fusarium* son: *F. solani* y *F. oxysporum* y del género *Aspergillus* están: *A. fumigatus*, *A. flavus* y *A. niger*^(3,25).

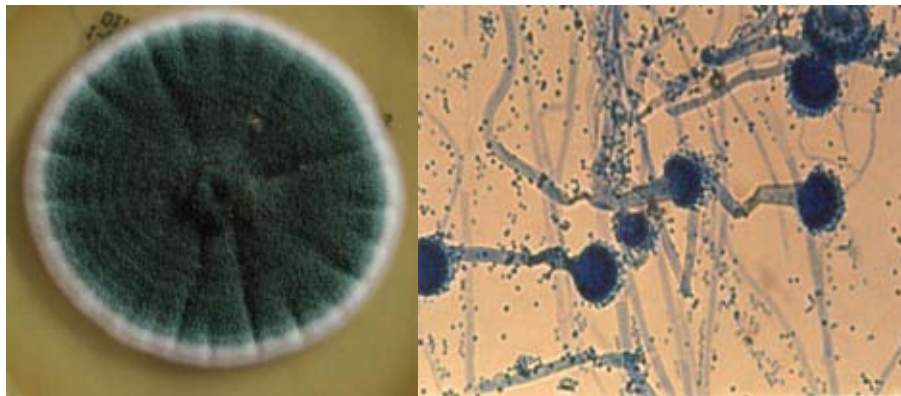


Figura 5 *Aspergillus fumigatus*.



Figura 6 *Fusarium sp.*

Es importante señalar que de acuerdo a varias publicaciones los hongos del género *Fusarium*, con frecuencia, son resistentes a varios tipos de antimicóticos, como son las equinocandinas, mientras que la susceptibilidad a anfotericina B, voriconazol y posaconazol es variable ⁽³⁸⁾.

1.9 Tratamiento

Los antimicóticos más utilizados para esta enfermedad son: **polienos** que incluye natamicina, nistatina y anfotericina B, son efectivos contra los hongos filamentosos y las levaduras, aunque estos penetran poco en el tejido ocular. La anfotericina B es el fármaco de elección para el tratamiento de la queratitis causada por *Candida*, este medicamento, también es eficaz con muchos hongos filamentosos, se aplican en solución tópica cada 30 minutos durante las primeras 24 horas y a continuación se disminuye la frecuencia de acuerdo a la evolución del paciente ^(25,36). Las concentraciones que se han empleado, presentan gran variabilidad van del 1.5mg/mL ^(5, 40) a 2,5 mg/mL⁽²¹⁾, aparentemente muchas ocasiones estas dependen de la opinión del médico tratante.

Otro grupo de medicamentos son los llamados **azoles** (imidazoles y triazoles) incluyen: ketoconazol, miconazol, fluconazol, voriconazol, posaconazol, itraconazol. Algunos de estos antimicóticos, además de su uso tópico se administran por vía bucal, alcanzando buenos niveles en la cámara anterior y la córnea y actualmente, son una herramienta muy importante para el tratamiento de la queratitis fúngica ^(25,36).

El último grupo de antimicóticos utilizados son las **pirimidinas fluoradas**, tales como 5-fluocitosina. Por lo general se administra en combinación con un azol o anfotericina B; ya que es sinérgica con estos medicamentos, se disminuye la resistencia y también, limita los efectos tóxicos de este poliénico. Se usa en la terapia de las infecciones por *Candida* ^(25,36).

1.10 Sensibilidad antifúngica

Los hongos al igual que las bacterias presentan diferente sensibilidad a los antimicóticos, para conocer la susceptibilidad a los antifúngicos, se han desarrollado diferentes técnicas hoy en día estandarizadas ⁽³¹⁾.

La mayoría de las técnicas para valorar sensibilidad *in vitro* están estandarizadas sólo para levaduras ⁽¹⁰⁾. Entre las más utilizadas tenemos: difusión en disco y dilución en caldo (macro y micro), también se cuenta con algunas técnicas más elaboradas como: Sensititre Yest One®, E-test® y Vitek 2®. A continuación se presenta una revisión breve de las más importantes:

Método de difusión en disco: esta técnica se basa en la formación de un halo de inhibición en un medio de cultivo sólido que contiene azul de metileno que facilita la lectura y mejora los límites de la zona de inhibición. La técnica es de gran utilidad para los antifúngicos hidrosolubles como son el fluconazol y la 5-fluorocitosina ^(9, 39,45).

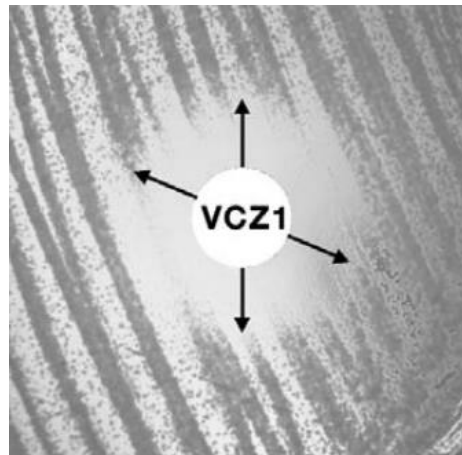


Figura 7 Muestra el halo de inhibición que presenta un hongo frente a voriconazol.

E-test®: es uno de los métodos más utilizados, este determina la sensibilidad de levaduras y hongos filamentosos a diferentes antifúngicos y tiene una buena correlación con los métodos de microdilución (M27-A3 Y M38-A2). En

algunos trabajos se menciona que esta técnica es la más adecuada para determinar la resistencia de los hongos filamentosos a itraconazol y de *Candida spp.* frente a anfotericina B. ^(9, 29). Consiste en inocular una placa que contiene medio de RPMI, sobre ella se inocula de manera homogénea el hongo a estudiar; posteriormente, en el centro de la caja se coloca una tira graduada y con concentración variable del antimicótico elegido. Se determina como grado de sensibilidad la cifra de la tira con antimicótico donde el hongo crece junto a ella, este resultado se compara con las cifras de resistencia proporcionadas por el fabricante.



Figura 8 Prueba de E-test de un hongo filamentosos. Se observa crecimiento vecino a una concentración de 0.032µg/mL en ketoconazol y ese es el punto de máxima sensibilidad.

Método de dilución en caldo: Con este método se mide la concentración mínima inhibitoria (CMI), que es la menor concentración del fármaco a la cual se reduce el crecimiento del hongo (documento M27-A3 de la CSLI), este determina la sensibilidad de las levaduras (*Candida spp.*)^(10,39, 45).

Para valorar la sensibilidad de hongos filamentosos el documento M38-A2, el cual se utiliza para aislados formadores de conidios como son: *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Rhizopus spp.*, *Pseudallesqueria boydi* y *Sporothrix schenkii* en la forma micelial ^(9, 39). Para realizarlo se utiliza una placa de 96 pozos

en la que en los 10 primeros pozos de cada fila se pone un antimicótico diferente a concentraciones conocidas de menor a mayor; el pozo número 11 se emplea como control de viabilidad y el número 12 como control de esterilidad. Posteriormente se aplica una suspensión del hongo a probar en los pozos de 1 al 11. En el pozo número 12 solo se aplican los reactivos sin ningún microorganismo.



Figura 9 Ejemplo de placa de microdilución. Consideramos sensible la última concentración de antimicótico donde no se detecta crecimiento

Una variable de este método es el **Sensitre Yest One®** aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) se basa en la técnica de microdilución en caldo y para facilitar aún más la lectura e interpretación, de la concentración mínima inhibitoria (CMI), utiliza un sustrato cromogénico. Este presenta un correlación (93.7-97.9%) ⁽³⁹⁾ con el método estandarizado por la CLSI, para evaluar la sensibilidad en especies de *Candida* contra anfotericina B, caspofungina, fluocitosina, fluconazol, itraconazol, posaconazol y voriconazol.

Existen métodos de dilución automatizados que muestran una gran reproductibilidad. Como ejemplo tenemos el **Vitek 2®** (Biomérieux), que está diseñado solo para levaduras y valora la CMI de algunos antifúngicos principalmente los azólicos ⁽⁴⁵⁾.



Figura 8 Vitek 2® Compact

2. Planteamiento del problema

En el Servicio de Oftalmología del Hospital de Especialidades CMN Siglo XXI, en las dos últimas décadas se documentan cada vez con mayor frecuencia queratitis fúngicas, mismas que, en muchas ocasiones llevan a la pérdida de la córnea y de la visión del ojo afectado.

Hasta el momento en el Hospital de Especialidades no se ha establecido la frecuencia de la infección micótica en los casos de queratitis, en consecuencia se desconocen también sus agentes y no se tiene un panorama completo de la respuesta a los tratamientos ni la sensibilidad antifúngica de los aislados, debido a que las afecciones se tratan de manera empírica. Conocer los aspectos mencionados previamente tendrá aplicación en la atención de los enfermos y seguramente se encontrarán diferencias a lo reportado en otras investigaciones.

3. Justificación

Necesitamos establecer las características de los pacientes con QM. Determinar con precisión la taxonomía de los agentes etiológicos y estudiar su sensibilidad antifúngica. Hacer del conocimiento de los oftalmólogos los resultados del estudio con el fin de que se apliquen estos conocimientos en el diagnóstico y tratamiento de los pacientes.

4. Hipótesis

Los hongos serán causa de queratitis entre el 25 y 40% de todos los casos, como se ha demostrado en otros estudios de países con condiciones socioeconómicas y ecológicas semejantes.

5. Objetivos

5.1 Objetivos generales

- Determinar la frecuencia de queratitis micótica.
- Determinar la frecuencia de tipos de agentes (levaduriformes o filamentosos)
- Establecer el perfil de sensibilidad antifúngica *in vitro* de los agentes.

5.2 Objetivos particulares

- Sistematizar las características de la población con QM y los posibles factores predisponentes.
- Determinar la frecuencia de cada uno los agentes aislados.
- Identificar las características demográficas y clínicas de los pacientes con queratitis micótica.

6. Material y métodos

Se realizó un estudio transversal, prospectivo, observacional y analítico de la frecuencia de queratitis micótica en pacientes del SO de CMNSXXI. La recepción de muestras se llevó a cabo en el periodo del 1 de abril del 2013 al 30 de septiembre de 2013. Los datos obtenidos de cada uno de los pacientes fueron registrados en una base de datos, se incluyeron: edad, género, factor predisponente asociado, tiempo de evolución del padecimiento y tratamiento previo.

6.1 Criterios de inclusión

Se aceptaron las muestras de los pacientes que presentaron ulcera corneal, con sospecha de queratitis micótica.

6.2 Especímenes

- Muestras procedentes del SO enviadas medio de transporte Stuart o en frasco estéril con solución salina.



Figura 8 Muestra en solución salina procedente del Servicio de Oftalmología

- Cultivos de pacientes con queratitis procedentes del Servicio de Bacteriología y que presentaron desarrollo de hongos.



Figura 9 Medio de Agar Sangre proveniente de la Sección de Bacteriología del Laboratorio Central.

6.3 Aislamiento de agentes

Los especímenes fueron inoculados en ADS, ADS-A, además agar papa sucrosa, se incubaron a 25°C durante cuatro semanas, revisando diariamente para detectar crecimiento.

6.4 Frotis

A todas las muestras biológicas se les realizó un frotis con tinción de Gram, revisándolas en el microscopio a 100X.

6.5 Examen directo

A los especímenes se les realizó examen directo con KOH al 10%, se observaron al microscopio a 40X.

6.6 Identificación de los aislados

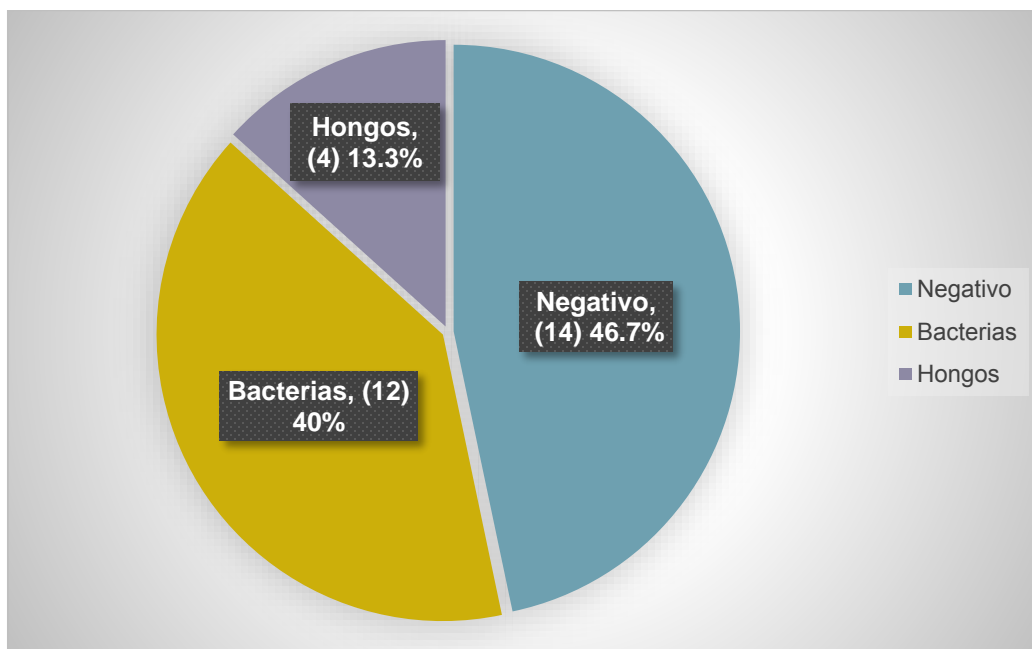
1. Se realizaron microcultivos por el método de Rivalier y Seidel. (Apéndice 11.3)
2. Técnicas moleculares: Realizada con la colaboración de la Unidad de Micología de la Facultad de Medicina. (Apéndice 11.4.1)

6.7 Pruebas de sensibilidad antifúngica

Esta prueba se realizó en la Unidad de Micología de la Facultad de Medicina UNAM. La técnica empleada fue **microdilución en caldo basada** en el método descrito por el CLSI, correspondiente al documento M38-A2 para hongos filamentosos (CLSI, 2008) y los antifúngicos empleados fueron: anfotericina B (AMB), caspofungina (CSF), anidulafungina (ANF), fluconazol (FLZ), itraconazol (ITZ), ketoconazol (KTZ), voriconazol (VRZ), posaconazol (PSZ), terbinafina (TRB). (Apéndice 11.4.2)

7. Resultados

A lo largo de los seis meses se recibieron treinta muestras de pacientes con sospecha de queratitis micótica. La mayoría de casos de queratitis infecciosa fueron causados por bacterias, pero en 4 casos (13.3%) fueron positivas a hongos. (Gráfica 1).



Gráfica 1. Porcentaje de agentes infecciosos causantes de queratitis en los 30 pacientes

7.1 Casos de queratitis micótica:

El primer agente micótico aislado correspondió a *Fusarium sp.*; se registró en la bitácora con el número 13-277. Esta muestra se obtuvo de un paciente masculino de 56 años procedente del Estado de Chiapas, de ocupación empleado en el campo, quien un mes antes sufrió un traumatismo con material vegetal (hoja de plátano) en el ojo izquierdo, posteriormente presentó dolor localizado, lagrimeo y sensación de cuerpo extraño. Se le trató con moxifloxacino tópico, tobramicina entre muchos otros. En las resiembras no se obtuvo crecimiento, por lo tanto, no se determinó la especie ni se estudió su sensibilidad antifúngica. Se solicitó una nueva muestra pero esta resultó negativa, debido a que el paciente ya había sido

tratado con anfotericina B, voriconazol y vancomicina, además se le realizó una queratoplastia.

El segundo caso fue un aislado del género *Fusarium* (registró número 13-362), por estudios morfológicos y moleculares correspondió a *F. oxysporum*. El espécimen se obtuvo de un paciente masculino de 55 años del Distrito Federal con antecedente de retinopatía diabética quien, sin causa aparente, presentó en ojo derecho, visión borrosa, conjuntivitis, ardor, sensación de cuerpo extraño, blefaroedema y una “mancha blanca” sobre la córnea. El tratamiento que recibió el paciente además de diversos antibacterianos (moxifloxacino, netilmicina), incluyó voriconazol, posteriormente se cambió a fluconazol sin mejoría y finalmente a itraconazol sin éxito. Se le realizó un colgajo conjuntival sin buenos resultados. Considerando que el trasplante corneal tectónico terapéutico era una posibilidad de salvar el órgano se le realizó ese procedimiento, sin embargo, hubo una mala respuesta del paciente y esto finalmente se perdió el órgano afectado.



Figura 10 Aislado 13-362. Se observa una colonia vellosa, blanquecina de crecimiento rápido

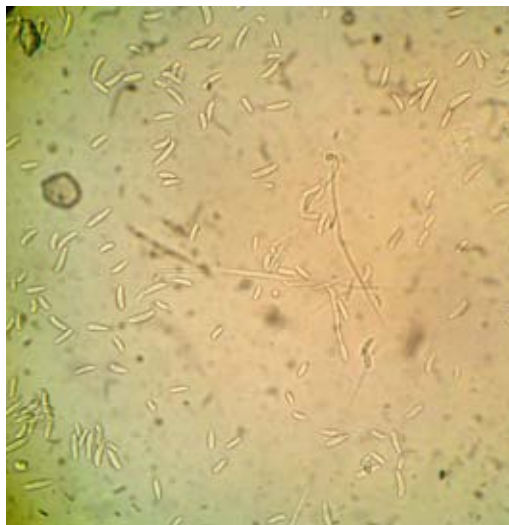


Figura 11 Examen directo de la cepa 13-362. Se observan algunos filamentos finos y los conidios curvos característicos de este género

El tercer caso correspondió al aislado registrado con el número 13-380, el agente se identificó mediante las técnicas moleculares como *F. solani*. Se obtuvo de un paciente masculino de 48 años de edad procedente del Estado de Guerrero, con antecedente de diabetes mellitus de ocupación albañil, quien refirió haber sufrido un traumatismo ocular con un fragmento metálico pequeño en el ojo derecho. El paciente presentó conjuntivitis y posteriormente exudado amarillento. Inicialmente fue tratado con antibacterianos (moxifloxacino y gatifloxacino), sin mejoría. Estudios posteriores reportaron el desarrollo de hongos no especificados a partir de los cultivos y fue tratado con voriconazol e itraconazol. Además se le realizó un injerto tectónico y lavado de cámara anterior; presentando una mejoría notable.

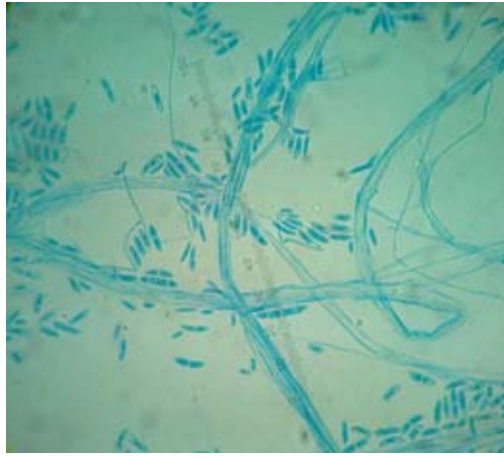


Figura 12. Identificación microscópica de la cepa 13-362 teñida con azul de algodón. Se observan haces de filamentos finos, conidióforos y conidias curvas con algunos septos.

El cuarto y último caso correspondió a un paciente, registrado con el número 13-446 el cultivo no se pudo identificar por examen directo ya que solamente presento micelio hialino estéril. Se sometió a estudio molecular dando un resultado probable de *Pestalotiopsis microspora*; este aislado se obtuvo de un paciente femenino de 70 años de edad de quien se ignoran los antecedentes por pérdida del expediente.

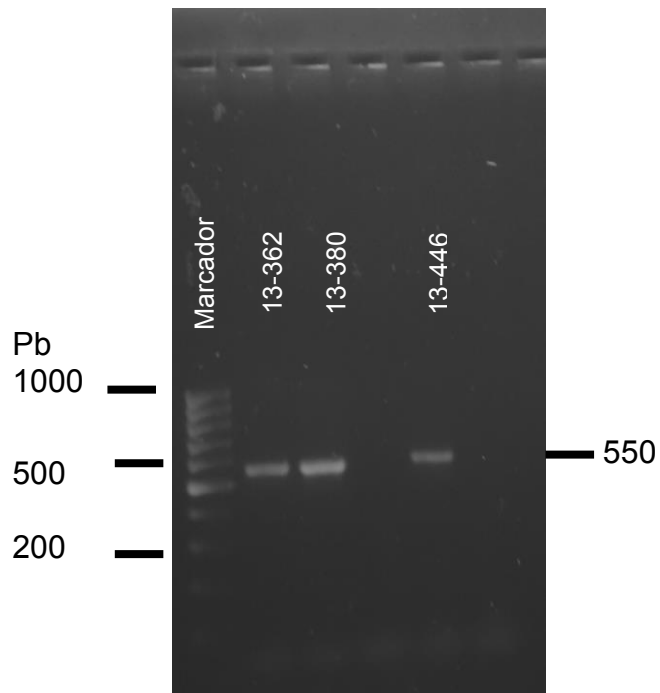


Figura 15 Gel de agarosa mostrando los fragmentos de amplificación de la Región ITS1-4

7.2 Sensibilidad antifúngica de los aislados

Como en el documento M38-A2 solo se establecen los puntos de corte para itraconazol, fluconazol, posaconazol, voriconazol y anfotericina B los resultados sólo expresan valores precisos para esos antifúngicos, sin embargo, en este estudio se incluyeron también los siguientes antimicóticos terbinafina, caspofungina y anidulafungina. Ambos aislados de *Fusarium* mostraron resistencia a itraconazol, fluconazol, posaconazol y solo fueron sensibles a voriconazol y anfotericina B. (Tabla 3).

De los otros antimicóticos probados, aunque parecen resultados promisorios, al carecer de los puntos de corte definitivos no son concluyentes.

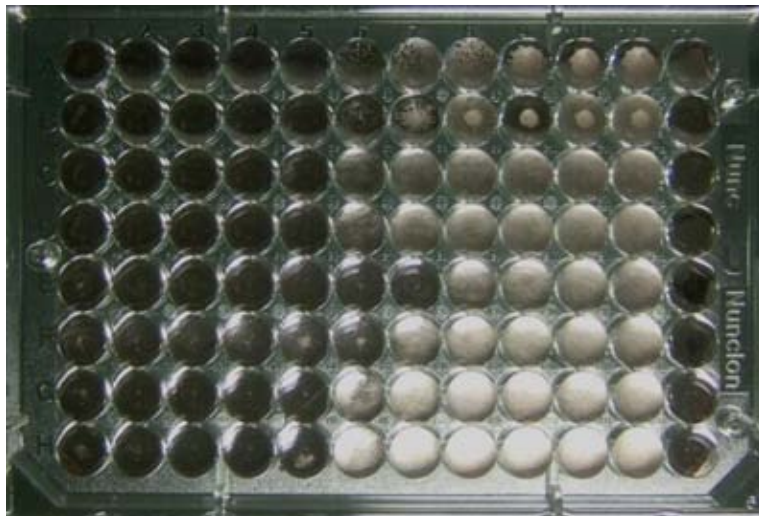


Figura 16 Muestra del crecimiento en los pozos de la prueba de sensibilidad antifúngica.

Antifúngico	Resistencia	Cepa 13-362	Cepa 13-380
Fluconazol	≥ 64 µg/mL	≥ 64 µg/mL	≥ 64 µg/mL
Ketoconazol*	-	8.0 µg/mL	≥ 16 µg/mL
Itraconazol	> 8.0 µg/mL	≥ 16 µg/mL	≥ 16 µg/mL
Posaconazol	> 8.0 µg/mL	16 µg/mL	≥ 16 µg/mL
Voriconazol	> 8.0 µg/mL	2.0 µg/mL	4.0 µg/mL
Caspofungina *	-	16 µg/mL	16 µg/mL
Anidulafungina*	-	≥ 32µg/mL	≥ 32 µg/mL
Anfotericina B	≥ 2.0 µg/mL	1.0 µg/mL	1.0 µg/mL
Terbinafina *	-	8.0 µg/mL	8.0 µg/mL

Tabla 2 Sensibilidad antifúngica de los aislados. * No se han determinado los puntos de corte para estos antifúngicos.

8. Discusión

La ceguera es una patología frecuente, es muy importante por la limitación que ocasiona en todos los ámbitos. Una causa muy frecuente de pérdida de la visión es la queratitis, cuya etiología puede ser micótica en gran número de casos. En los hospitales del IMSS la frecuencia no se ha establecido, aunque se considera que debido a la morbilidad que presentan los pacientes puede ser elevada. En el mundo, hay reportes de queratitis micótica con frecuencias variables que van desde 6% hasta 60% ⁽²⁴⁾. En este estudio, la frecuencia encontrada fue 13.3% que si bien, no es muy elevada es importante porque algunos de los pacientes perdieron la visión del ojo afectado y en consecuencia fueron incapaces de realizar las actividades profesionales que desempeñaban.

La frecuencia de esta patología en pacientes del IMSS de otros estados de la República Mexicana debe ser elevada como lo demuestran los datos publicados de un solo trabajo previo realizado en el Estado de Veracruz donde una revisión de 5 años, permitió documentar 21 casos de QM, la mayoría de ellos causadas por *Fusarium spp* y *Aspergillus spp*. ¿Pero qué pasa en otros estados de la República Mexicana con climas tropicales y condiciones socioeconómicas similares como pueden ser Chiapas, Quintana Roo o los estados situados en la costa del Océano Pacífico? Como ejemplo de dicha importancia, en un estudio realizado en el “Hospital Asociación para Evitar la Ceguera en México” en un lapso de 23 años, se diagnosticaron 219 casos de queratitis micótica lo que da una media de 9.5 pacientes por año. Del total de pacientes 43 (19.63%), procedían del estado de Guerrero ⁽²⁷⁾.

Comparando casuísticas de otros países, la frecuencia es mayor en gran parte de Asia, por ejemplo: Jadhav S.V. y cols., reportaron en un hospital de la India en un periodo de 4 años, 436 casos de queratitis, 117 (26.83%) fueron causados por hongos, esto nos da una media de 29.25 casos por año ⁽¹⁹⁾.

Otro estudio en la misma región geográfica se registraron 110 casos de QM tan solo en un año, una frecuencia muy elevada en comparación con la reportada en

los tres trabajos publicados en México ⁽³⁴⁾. Un factor que pudo haber influido en el bajo número de casos registrados en este estudio es la administración temprana de antifúngicos por prescripción médica o por iniciativa del paciente mismo que pudieron haber ocasionado cultivos negativos aún con infección fúngica inicial.

En otro estudio realizado en Buenos Aires, revisando 232 casos de infección ocular, se encontraron 167 (71.9%) casos de queratitis micótica en un periodo de 42 meses, lo cual muestra que en esta parte de América Latina es más alta que en nuestro país, o bien, se hizo un diagnóstico preciso de las causas de queratitis ⁽⁴⁾. En este mismo estudio se observaron las características de los pacientes en los que la proporción es hombre:mujer 3:1, que es la misma proporción que encontramos en este estudio, aunque desde luego, hay que considerar el bajo número de pacientes que revisamos ⁽⁴⁾.

Es importante señalar que la toma de muestra realizada por el personal médicos del SO HE en casos de queratitis parece ser incorrecta ya que se obtiene pasando un hisopo sobre la córnea, pero la mayoría de publicaciones acerca del diagnóstico de esta patología refiere que se utiliza un bisturí con el que se frota suavemente la superficie afectada y el material obtenido es enviado para estudio.

En relación a la etiología de las 30 muestras revisadas en este trabajo; en 12 casos se aislaron bacterias; en 4 se aislaron hongos y en 14 no se aisló ningún agente. En los pacientes sin aislamiento, las queratitis pudieron haber sido causadas por virus, sustancias químicas, reacciones inmunológicas o incluso traumatismos de los que el enfermo no tuviera un recuerdo preciso.

Los porcentajes para cada tipo de agente, son similares a los obtenidos por Hernández-Camarena y cols., quienes en un estudio realizado a lo largo de 2012 en el "Hospital Conde de la Valenciana" a partir de 120 muestras obtuvieron 55 aislados microbianos: 49 fueron bacterias (40.83%) y 6 hongos (5%) el resto 65 casos fueron negativos para el cultivo ⁽¹⁸⁾; en esa investigación las bacterias predominantes fueron *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomona aeruginosa*, en nuestro estudio no se hizo la determinación bacteriana precisa y en los registros de los 12 pacientes con aislado bacteriano sólo se reporta un caso de *P. aeruginosa*.

Con respecto a los aislados fúngicos en este estudio solo se obtuvieron cuatro cultivos positivos tres correspondieron a *Fusarium* y uno más fue un hongo filamentoso hialino que no produce estructuras de reproducción identificables pero que resultados preliminares sugieren podría tratarse de *Pestalotiopsis microspora*. Se trata de un hongo del cual no hay reportes de su asociación a patología humana como se constató al revisar todos los registros publicados en Pubmed, donde aparecen 13 artículos pero en ninguno menciona que este asociado a casos clínicos. Las tipificaciones se realizaron utilizando además de criterios morfológicos la técnica molecular de PCR amplificando el material nuclear con el iniciador ITS 1-4 y posterior secuenciación. Otros investigadores mexicanos recuperan géneros como: *Aspergillus*, *Penicillium* y *Candida*. Vanzinni y cols, además de *Fusarium* aislaron *Acremonium*, *Scedosporium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus* y otros ⁽⁴¹⁾. Alvarado–Castillo y cols., publicaron un caso de queratitis micótica en un paciente del Hospital General de México causado por *A. flavus* ⁽²⁾.

En las últimas décadas, el género *Fusarium* ha incrementado notablemente su frecuencia como agente etiológico de queratitis, varias especies de este género muestran gran capacidad de adaptación a las condiciones ecológicas del humano (temperatura, pH, humedad, etc.). Los primeros reportes de infección por este género en cualquier localización, se referían generalmente a *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides*; sin embargo, es posible que la elevada frecuencia de estos agentes se debiera a una mala clasificación taxonómica, ya que desde el advenimiento de las técnicas moleculares, se reportan nuevas especies causantes de infecciones, como el caso reportado por Al-Hatmi y cols., acerca de un paciente mexicano con queratitis, en quien el agente etiológico, mediante una prueba de PCR, fue identificado como *Fusarium temperatum*, hongo que no había sido relacionado con queratitis ni con otras patologías en el humano ⁽¹⁾.

En la mayoría de las tipificaciones de hongos en trabajos nacionales se utilizaron sólo estudios morfológicos, que como se ha demostrado en los últimos años, presentan limitantes en cuanto a precisión. Sin embargo, más allá de la

técnica de tipificación, la diferencia en cuanto a los agentes etiológicos que aparecen en otros trabajos nacionales probablemente sea debida a las regiones geográficas de procedencia de los enfermos, ya que los pacientes de nuestro estudio habitan principalmente en zonas urbanas, mientras que los enfermos de los trabajos referidos como comparativos provienen tanto de zonas urbanas como de rurales.

Un hecho para el que no tenemos explicación es la ausencia en esta investigación de QM causadas por *Candida*, ya que las infecciones por este agente se asocian con frecuencia a diabetes mellitus o uso de lentes de contacto, factores presentes en la población atendida en el Hospital de Especialidades, y sin embargo, ninguno de los 4 casos fue causado por levaduras.

La importancia de aislar y determinar con precisión la etiología es porque la resistencia a los antimicóticos es variable y en principio, no basta saber que la queratitis es causada por bacterias o por hongos para prescribir el mejor tratamiento, por ejemplo es un hecho conocido que *Candida krusei* tiene resistencia primaria a fluconazol, por lo tanto, el empleo de este antifúngico en casos de infecciones por ese agente, conduciría a una falla terapéutica.

En esta investigación, a las cepas de *Fusarium* obtenidas se les realizó el perfil de sensibilidad mediante la técnica de microdilución en placa, el cual mostro que las cepas obtenidas eran sensibles a AMB y VRZ. En la mayoría de los trabajos revisados, no se determina la sensibilidad antifúngica y el tratamiento se elige basado en reportes de la literatura lo que probablemente incrementa los casos de falla terapéutica. En un caso de QM diagnosticada en México, inicialmente, se administró itraconazol, pero una vez realizado el antimicograma se mostró que la cepa de *Fusarium solani* aislada era multiresistente, con esta información se cambió el tratamiento a voriconazol, antifúngico al cual la cepa tenía ligera susceptibilidad ⁽¹⁶⁾.

9. Conclusiones

- ❖ Más del 10% de las queratitis fueron causadas por hongos.
- ❖ El 75% de las QM estuvieron asociadas al género *Fusarium*, hongo hialino contaminante ambiental.
- ❖ Las cepas de *Fusarium* aisladas presentaron resistencia a la mayoría de los azoles: itraconazol, posaconazol, fluconazol y sensibilidad únicamente a voriconazol, además de la anfotericina B.
- ❖ La dificultad que se tiene para identificar y tratar algunas micosis justifica la realización de identificaciones basadas en técnicas moleculares y también la necesidad de hacer estudios de sensibilidad antifúngica.

10. Bibliografía

1. Al-Hatmi A, Bonifaz A, Sybren de Hoog G, Vazquez-Maya L, Garcia-Carmona K, Meis JF, D van Diepeningen A. Keratitis by *Fusarium temperatum*, a novel opportunist. *BMC Infectious Diseases*. 2014; 14:588.
2. Alvarado- Castillo B, Vázquez-Maya L, Tenorio G, Bonifaz A, Rodriguez- Reyes AA. Queratitis micótica por *Aspergillus flavus* asociada a uso de lente de contacto. Informe de un caso. *Rev Med Hosp Gen Mex*. 2007; 70: 36-42.
3. Arenas GR. Micología médica ilustrada. *Mc Graw Hill*. México, 2008; pp. 118-122.
4. Arrúa M, Laspina F, Samudio M, Fariña N, Cibils D, Sanabria R, Carpinelli L, Stanley J, Kaspar H. Queratitis infecciosas. Características clínicas y microbiológicas. Período 2003-2006. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud*. 2008; 6: 5-14.
5. Badiee P. Mycotic Keratitis, a State-of-the-Art Review. *Jundishapur J of Microbiology*. 2013; 6:e8561.
6. Behrens-Baumann W. Mycosis of the Eye and Its Adnexa. *Karger*. Suiza, 1999; 71-91
7. Bonifaz JA. Micología Médica Básica. *Mc Graw Hill*. México, 2012; pp. 467-475.
8. Cambas A, Parapar SI, González RO, Guerra AM, Prada SC, Lora DK. Suero autólogo al 50 % en las queratitis bacterianas. *Rev Cub Oftalmol*. 2014; 27:70-78
9. Cantón E, Martín E, Espinel-Ingroff A. Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38- A y M44-A). *Rev Iberoam Micol*. 2007; 15a, 15b: 15a1-15a17, 15b1-15b6.

10. Clinical and Laboratory Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast fungi; approved standard, 3rd ed, M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne PA, 2007.
11. Das S, Sharma S, Kar S, Sahu SK, Samal B, Mallick A. Is inclusion of Sabouraud dextrose agar essential for the laboratory diagnosis of fungal keratitis? *Indian J Ophthalmol.* 2010; 58:281-285
12. Fayemiwo SA, Ogunleye VO, Ashaye AO, Oladele R, Alli AJ, Bakare RA. Causative agents of keratomycosis in Ibadan: review of laboratory reports. *Afr. J. Clin. Exper. Microbiol.* 2013; 14: 105-108
13. Ferrer C, Alió JL. Evaluation of molecular diagnosis in fungal keratitis. Ten years of experience. *J Ophthal Inflamm Infect.* 2011; 1:15–22.
14. Ficker L, Kirkness C, McCartney A, Seal D. Microbial Keratitis-the False Negative. *Eye.* 1991; 5:549-559
15. Grossmann MDK, Smith P, Story JB. The ophthalmic review a monthly record of ophthalmic science. *Library University of Toronto*, 1883; 2: 369-372.
16. Gómez-Valcárcel M, Rodríguez-Reyes A, Vanzzini-Zago V, Angel-Muñoz E. Queratitis infecciosa mixta secundaria a trauma con piedra de cocaína. Caso clínico. *Rev Mex Oftalmol.* 2009; 83: 116-118.
17. Gugnani HC, Talwar RS, Njoku-Obi AN, Kodilinye HC. Mycotic keratitis in Nigeria A study of 21 cases. *Brit. J. Ophthal.* 1976; 60:607-613.
18. Hernández-Camarena JC, Bautista-de Lucio VM, Chirinos-Saldaña P, Navas A, Ramírez-Miranda A, Climent-Flores A, Ortiz-Casas M, López-Espinosa NL, Gaona-Juárez C, Bautista-Hernández LA, Graue-Hernández EO. Queratitis infecciosas: tendencias microbiológicas y sensibilidad a antibióticos. Segundo Reporte Anual del Grupo de Estudio de Microbiología Ocular del Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana”. *Rev Mex Oftalmol.* 2013; 87:100-109. James B, Bron A. Oftalmología: diagnóstico y tratamiento. *Manual Moderno.* México, 2012; pp. 1-7, 104-112.

19. Jadhav SV, Gandham NR, Misra RN, Ujagare MT, Sharma M, Sardar M. Prevalence of fungal keratitis from tertiary care hospital from western part of India. *International Journal of Microbiology Research*. 2012; 4: 207-210.
20. James B, Bron A. Oftalmología: diagnóstico y tratamiento. *Manual Moderno*. México, 2012; pp. 1-7, 104-112.
21. Kaswin G, Labetoulle M. Mycoses oculaires: quand faut-il y penser? *réalités ophtalmologiques*. 2012; 190: 1-5.
22. Klotz SA, Penn CC, Negvesky GJ, Butrus SI. Fungal and Parasitic Infections of the Eye, *Clinical Microbiology reviews*. 2000; 13: 662–685.
23. Leck AK, Thomas PA, Hagan M, Kaliyamurthy J, Ackuaku E, John M, Newman MJ, Codjoe FS, Opintan JA, Kalavathy CM, Essuman V, Jesudasan CAN, Johnson GJ, Aetiology of suppurative corneal ulcers in Ghana and south India, and epidemiology of fungal keratitis. *Br J Ophthalmol* 2002; 86:1211–1215.
24. Mellado F, Rojas T, Cumsille C. Queratitis fúngica: revisión actual sobre diagnóstico y tratamiento. *Arq Bras Oftalmol*. 2013; 76:52-6
25. Mravičić ID, Gabrić N, Romac I, Glavota V, Mlinarić- Missoni E. An Overview of Fungal Keratitis and Case Report on Trichophyton Keratitis, Keratitis. *In Tech*. 2012; 1-14
<http://www.intechopen.com/books/keratitis/fungal-keratitis>
26. Narsani AK, Nangdev PR, Surhio SA, Kumar M, Jatoi SM. Demographic Pattern, Risk Factors, Clinical and Microbiological Characteristics of Fungal Keratitis *Jlumhs*. 2012; 11: 42-46.
27. Olvera- Elizalde ML, Hernández PS, Aguilar-Irene RM, Valdez ME. Úlcera corneal micótica. Estudio multicéntrico. *Rev Med IMSS* 2000; 38: 437-445.
28. Peggy-Chang H-Y, Chodosh J. Diagnostic and Therapeutic Considerations in Fungal Keratitis, *International Ophthalmology Clinics*. 2011; 51:33–42.
29. Pfaller MA, Messer SA, Mills K, Bolmström A. In vitro susceptibility testing of filamentous fungi: comparison of Etest and reference microdilution methods for determining itraconazole MICs. *J Clin Microbiol*. 2000; 38: 3359-3361.

30. Rautaraya B, Sharma S, Kar S, Das S, Sahu SK. Diagnosis and Treatment Outcome of Mycotic Keratitis at a Tertiary Eye Care Center in Eastern India. *BMC Ophthalmology*. 2011; 11: 1-8.
31. Rex JH, Pfaller MA, Rinaldi MG, Polak A, Galgiani JN. Antifungal susceptibility testing. *Clin. Microbiol. Rev.* 1993; 6: 367-381.
32. Rippon JW. Tratado de Micología Médica. *Mc Graw Hill*. México. México, 1988; pp. 720-721.
33. Saha R, Das S. Mycological profile of infectious Keratitis from Delhi. *Indian J Med Res*, 2006; 123:159-164.
34. Saha S, Banerjee D, Khetan A, Sengupta J. Epidemiological profile of fungal keratitis in urban population of West Bengal, *India*. *Om J Ophthal* 2009; 2: 114-118.
35. Simonsz HJ. Keratomycosis caused by *Acremonium Recifei*, treated with keratoplasty, Miconazole and Ketoconazole. *Documenta Ophthalmologica*. 1983; 56: 131-135.
36. Singh D. Fungal keratitis treatment & Management. *Medscape Reference*. 2013; 1-6.
37. Siva-Reddy P, Satyendran OM, Satapathy M, Vijaya- Kumar H, Ranga-Reddy P. Mycotic keratitis. *Indian J Ophthalmol*. 1972; 20:101-108.
38. Spader TB, Venturini TP, Rossato L, Denardi LB, Cavalheiro PB, Botton SA, Santurio JM, Hartz-Alves S. Synergism of voriconazole or itraconazole with other antifungal agents against species of *Fusarium*, *Rev Iberoam Micol*. 2013; 30:200–204.
39. Tapia P CV. An update on antifungal susceptibility testing. *Rev Chil Infect*. 2009; 26: 144-150.
40. Tilak R, Singh A, Singh Maurya OP, Chandra A, Tilak V, Gulati AK. Mycotic keratitis in India: a five-year retrospective study. *J Infect Dev Ctries* 2010; 4:171-174.
41. Vanzzini-Zago V, Manzano-Gayosso P, Hernández-Hernández F, Méndez-Tovar LJ, Gómez-Leal A, López Martínez R. Queratomicosis en un centro

- de atención oftalmológica en la Ciudad de México. *Rev IberoamMicol.*2010; 27:57–61.
42. Vaughan DG, Asbury T. Oftalmología general. *Mc Graw Hill.* México, 2012; pp. 124-148.
43. Villegas-Flores M, Castellanos-González MA, Díaz- de la Vega FB. Análisis de queratitis micóticas en un hospital de tercer nivel. *Rev Mex Oftalmol,* 2012; 86:231-239.
44. Yanoff M, Duker JS, Augsburger JJ. *Ophthalmology.* Mosby. St. Louis, Missouri, 2004; pp. 163-167.
45. Zapata-González F, Cardona-Castro N. Lo que debemos saber sobre los métodos de sensibilidad a los antifúngicos. *Rev CES Med.* 2012; 26:7-18.

11. Apéndice

11.1 Medios de cultivo

AGAR DEXTROSA SABOURAUD

Fórmula g/L de agua destilada

Peptona	10g
Dextrosa	40g
Agar	15g

pH: 5,6±0,2

Rehidratar 65g del medio en un litro de agua destilada. Reposar 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo. Distribuir en tubos en alícuotas de 7mL y esterilizar en autoclave a (121°C/15lbs de presión) durante 15 minutos. Inclinar los tubos

AGAR MYCOSEL®

Fórmula para un litro

Harina de soja digerida por enzimas papaícas	10g
Dextrosa	10g
Agar	15,5g
Cicloheximida	0,4g
Cloranfenicol	0,05g

pH final: 6,9±0,2

Suspender 36g del polvo en 1L de agua destilada. Mezcle bien. Calentar agitando frecuentemente, justo hasta que hierva el medio para disolver completamente el

polvo. Vaciar en tubos alícuotas de 7mL y esterilizar en autoclave a (121°C/15lbs de presión) durante 15 minutos. Inclinar los tubos.

AGAR PAPA-SUCROSA O DEXTROSA PARA *Fusarium*

Infusión de papa	500mL
Sucrosa o glucosa	20g
Agar	20g
Agua destilada	1000mL

Pelar y partir en cuadritos 200g de papas. Añadir las papas a 500mL de agua destilada. Calentar durante 1 hora. Filtrar a través de gasa. Obtener un volumen final de 500mL con agua destilada. Añadir resto de ingredientes. Llevar a ebullición. Vaciar en tubos en alícuotas de 7mL y esterilizar a 15 libras por 15min. Inclinar los tubos

11.2 Tinción Gram

Se hace un frotis y se fija a la flama. Se tiñe con cristal violeta durante un minuto y se lava con agua corriente. Cubrir con lugol durante un minuto y se lava con agua corriente. Se decolora con alcohol-acetona y se lava ligeramente con agua corriente. Se cubre con el colorante de contraste safranina durante un minuto y se lava con agua. Dejar secar y observar al microscopio.

11.3 Microcultivos

Técnica

1. Se realiza la resiembra de las cepas tomando un fragmento de la colonia o masas filamentosas, con el asa de alambre, esterilizada previamente a la flama y colocando por medio de picadura.
2. Se hacen los microcultivos de la siguiente forma siguiendo condiciones estrictas de esterilidad.
 - a) Con un bisturí fragmentar el medio de cultivo en cuadros (cubo) de aproximadamente 1.5x1.5cm
 - b) Se coloca un cubo del medio sobre un portaobjetos
 - c) Sembrar el hongo por los cuatro lados del medio de cultivo y cubrir con otro portaobjetos
 - d) Agregar a una caja Petri de 10 a 15mL de agua estéril
 - e) Colocar los portaobjetos dentro de la caja y sellarla con cinta adhesiva
 - f) Incubar el hongo dependiendo de sus características de crecimiento (8 días a 20°C)

11.4 Técnicas

11.4.1 Reacción en cadena de la polimerasa

Técnicas moleculares: De cada uno de los aislados en este estudio se realizó un cultivo monospórico, por el método de dilución y aislamiento por estría de la siguiente manera:

- a) Se realizaron subcultivos a partir del cultivo original en agar dextrosa Sabouraud (ADS) en tubo, incubando por un periodo de 5 a 8 días a temperatura ambiente.
- b) Posteriormente se preparó una suspensión de conidios en 1mL de solución salina 0.85mM más 5 μ L de Tween 80. Se determinó el número de conidios en suspensión.
- c) Con ella se realizaron diluciones para tener 20 a 40 conidios en un volumen de 10 μ L, distribuyendo el inóculo en placas de ADS.
- d) Estas placas se mantuvieron a temperatura ambiente y se revisaron, de este se eligió una colonia para ser resembrada en tubo. Este subcultivo se utilizó para realizar los estudios.
- e) La purificación y extracción del ADN se realizó utilizando la metodología propuesta por Blin & Stafford, el cual consistió en inocular 100mL de caldo dextrosa Sabouraud con una suspensión de conidios preparada a partir de un subcultivo, se incubó a 26°C. una vez que se observó suficiente crecimiento, se separó la masa fúngica.
- f) Se macero la masa fúngica, para romper la pared celular en un mortero estéril con nitrógeno líquido. El polvo obtenido se transfirió a un tubo de 1.5 mL y se trató con buffer de lisis y proteinasa K, para digerir los componentes proteicos.
- g) Esta mezcla se incubó 65°C/ 1hr. Y posteriormente se adicionó Fenol-cloroformo- alcohol isoamílico, se agito vigorosamente hasta obtener mezcla homogénea, se centrifugo y se transfirió la fase acuosa a otro tubo.
- h) Se le añadió 0.1 volumen de acetato de sodio y 2 volúmenes de etanol al 100%. Se agito por inversión, precipitando el ADN, se centrifugo y se decantó el sobrenadante y el sedimento fue lavado con etanol al 70%, para después centrifugar; se decantó nuevamente el sobrenadante y se dejó secar el ADN a temperatura ambiente en condiciones de esterilidad.
- i) Una vez seco, se agregó un volumen de agua mili-Q proporcional a la cantidad de ADN obtenido y se adiciono una solución de 100mg/mL de ARNasa incubándose a 37°C/1h.

- j) Se realizaron diluciones 1:500 de cada muestra, por duplicado. Se realizaron lecturas de absorbancia, para determinar la concentración de ADN.
- k) Se amplificó una región de los genes ribosomales de eucariotes, con los iniciadores ITS1 e ITS4. Los productos amplificados se aplicaron en geles de agarosa y luego se visualizaron las bandas en una fuente de luz UV.
- l) Se cortaron para someterse a limpieza para corroborar que la amplificación correspondía al fragmento.
- m) Se purificó el ADN y se realizó la secuenciación. Una vez obtenidas las secuencias, se hizo la alineación; con la finalidad de construir un árbol filogenético, se procedió a alinear estas con las de especies similares reportadas en el Genbank para la determinación de distancias génicas y su filogenia.

11.4.2 Estudios de sensibilidad antifúngica

Microdilución en placa: se llevó a cabo de la siguiente manera: se preparó una solución madre pesando el antifúngico para obtener la concentración más alta a ensayar y se disolvió en 10mL de agua ultrapura (milli-Q®) (MQ) para los antifúngicos solubles, FLZ, CSF. Y para los antifúngicos insolubles AMB, ANF; ITZ, KTZ, PSZ, VRZ y TRB se utilizó como solvente dimetil sulfóxido (DMSO). Posteriormente se esterilizó por filtración y se distribuyó en alícuotas de 500 µL, conservadas a -20°C hasta su uso. A partir de la solución madre se preparó la serie de diluciones utilizando como diluyente RPMI 1640 para los antifúngicos solubles en agua y DMSO para los insolubles. Después se realizó una dilución 1:5 para los antifúngicos solubles en agua MQ y una dilución 1:50 para los insolubles, añadiendo a todos los tubos RPMI. En cada pozo de la placa se colocaron 100 µL de las diluciones decrecientes. Para los antifúngicos solubles el control se llenó con 100 µL de RPMI y en el caso de los insolubles en agua, se llenó con 100µL de RPMI con 2% de DMSO.

Se obtuvo un inóculo a partir de un cultivo monocelular de cinco días de crecimiento. Se colocó 1 mL de solución salina 0.85% estéril y con una asa se tocó el micelio aéreo para desprender conidios, se realizó un conteo de los conidios con la cámara de Neubauer para calcular la concentración. Se llenaron los pozos con 100 μ L del inóculo, de cada uno de los aislados y se incubaron a 35°C por 48 h. posteriormente se realizó la lectura a las 24 y 48 horas, utilizando un espejo invertido, comparando la turbidez con los pozos de control, para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI). Sin embargo el CSLI no ha establecido los puntos de corte para los hongos filamentosos, pero con el análisis de diversos estudios se han asignado “arbitrariamente” algunos puntos de corte antifúngicos.

11.5 Resultados de sensibilidad antifúngica



Laboratorio de Micología Médica
Departamento de Microbiología y Parasitología
Facultad de Medicina, UNAM
Teléfono 5 623 24 58
Fax: 5 623 23 55

RESULTADOS DE ESTUDIO SENSIBILIDAD ANTIFUNGICA

Nombre del paciente:

No. exp:

Aislamiento enviado: 13-362 (*Fusarium sp*)

Hospital de procedencia: Micología del Hospital de especialidades CMN, Siglo XXI, IMSS

Sensibilidad antifúngica a ketoconazol, itraconazol, fluconazol, voriconazol, pozaconazol, anfotericina B, caspofungina y anidulofungina:

Método microdilución en caldo

Resultados de la concentración mínima inhibitoria (CMI) en $\mu\text{g/ml}$

KTZ: 8.0 $\mu\text{g/ml}$ ITZ: ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$ FLZ: ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$

VRZ: 2.0 $\mu\text{g/ml}$ PZC: 16 $\mu\text{g/ml}$ AMB: 1.0 $\mu\text{g/ml}$

CSF: 16 $\mu\text{g/ml}$ ANF: ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$ TRB: 8.0 $\mu\text{g/ml}$

Atentamente
Dra. Patricia Manzano-Gayosso



Laboratorio de Micología Médica
Departamento de Microbiología y Parasitología
Facultad de Medicina, UNAM
Teléfono 5 623 24 58
Fax: 5 623 23 55

RESULTADOS DE ESTUDIO SENSIBILIDAD ANTIFUNGICA

Nombre del paciente:

No. exp:

Aislamiento enviado: 13-380 (*Fusarium sp*)

Hospital de procedencia: Micología del Hospital de especialidades CMN, Siglo XXI, IMSS

Sensibilidad antifúngica a ketoconazol, itraconazol, fluconazol, voriconazol, pozaconazol, anfotericina B, caspofungina y anidulofungina:

Método microdilución en caldo

Resultados de la concentración mínima inhibitoria (CMI) en $\mu\text{g/ml}$

KTZ: $\geq 16 \mu\text{g/mL}$

ITZ: $\geq 16 \mu\text{g/mL}$

FLZ: $\geq 64 \mu\text{g/mL}$

VRZ: $4.0 \mu\text{g/mL}$

PZC: $\geq 16 \mu\text{g/mL}$

AMB: $1.0 \mu\text{g/mL}$

CSF: $16 \mu\text{g/mL}$

ANF: $\geq 32 \mu\text{g/ml}$

TRB: $8.0 \mu\text{g/mL}$

Atentamente
Dra. Patricia Manzano-Gayosso