



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

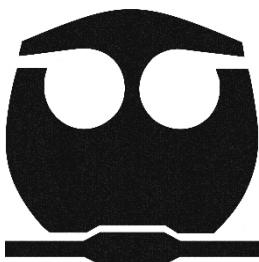
**Combinación de antifúngicos en la
sensibilidad/resistencia *in vitro* en aislados clínicos de
*Fusarium spp.***

T E S I S

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

PRESENTA:

VERÓNICA TORALES SERNA



MÉXICO, D.F.

2014



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 GUTIERREZ RAMOS

VOCAL: Profesor: JOSE ALEXANDRO BONIFAZ TRUJILLO

SECRETARIO: Profesor: ANGELES PATRICIA MANZANO GAYOSSO

1er. SUPLENTE: Profesor: EDUARDO BONILLA ESPINOSA

2° SUPLENTE: Profesor: BEATRIZ RUIZ VILLAFAN

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE MICOLOGÍA MÉDICA, DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y
PARASITOLOGÍA, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

M. EN C. MARÍA DE LOS ANGELES PATRICIA MANZANO GAYOSSO

SUSTENTANTE (S):

VERÓNICA TORALES SERNA

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Micología Médica del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Apoyo financiero del presupuesto otorgado a la Dra. Patricia Manzano Gayosso.

Agradezco a las siguientes instituciones por proporcionar los aislados de *Fusarium* con los que se realizó este trabajo.

- Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social.
- Hospital de la ceguera “Dr. Luis Sánchez Bulnes”.
- Hospital “Dr. Darío Fernández Fierro”, Instituto de Seguridad y Servicios Sociales para los trabajadores del Estado.
- Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”.

ÍNDICE

I.	ANTECEDENTES DEL GÉNERO <i>Fusarium</i>	1
1.1	Historia.	1
1.2	Agente etiológico.	2
1.2.1	Ecología.	2
1.2.2	Taxonomía.	3
1.2.3	Morfología macroscópica.	4
1.2.4	Morfología microscópica.	5
1.3	Infecciones causadas por <i>Fusarium</i> spp.	7
1.3.1	Epidemiología.	12
1.3.2	Diagnóstico.	13
1.3.3	Tratamiento.	14
1.4	Antifúngicos.	15
1.4.1	Clasificación.	15
1.4.2	Estructura química.	16
1.4.3	Mecanismo de acción.	19
1.5	Resistencia a los antifúngicos.	23
1.5.1	Resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos.	24
1.5.2	Mecanismos de resistencia.	25
1.6	Pruebas de sensibilidad antifúngica.	26
1.6.1	Método de difusión en disco.	26
1.6.2	Métodos comercializados.	27
1.6.3	Métodos de microdilución en caldo.	27
1.6.4	Método de microdilución en caldo M38-A2.	28
1.7	Combinaciones antifúngicas <i>in vitro</i> .	28
1.7.1	Tablero de ajedrez.	29
1.7.2	Curvas de letalidad.	31
II.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	37
III.	OBJETIVOS	38
IV.	MATERIAL Y MÉTODOS	39
4.1	Identificación de especies.	39
4.2	Estudio de sensibilidad a los antifúngicos.	42
4.2.1	Preparación de la solución madre de antifúngico.	43

4.2.2	Preparación de las placas con el antifúngico.	43
4.2.3	Preparación del inóculo.	44
4.2.4	Inoculación de placas.	44
4.2.5	Lectura e interpretación de los resultados.	44
4.3	Combinación de antifúngicos.	50
4.3.1	Preparación de placas con los antifúngicos.	50
4.3.2	Preparación del inóculo y llenado de placas.	51
4.3.3	Lectura e interpretación de los resultados.	52
V.	RESULTADOS	54
VI.	DISCUSIÓN	67
VII.	CONCLUSIONES	71
VIII.	BIBLIOGRAFÍA	72
IX.	APÉNDICE	84
	Apéndice A. Tabla de abreviaturas.	84
	Apéndice B. Medios de cultivo.	85

I. ANTECEDENTES

1.1 Historia.

La primera descripción del género *Fusarium* la realizó Link JHF en 1809, en un aislado obtenido de plantas. Doce años (1821) después *Fusarium* spp. se ubicó dentro de Fungi Imperfecti Hyphomycetes ⁽⁸²⁾. Más de 1000 especies de este género fueron clasificadas por sus características observadas en los cultivos. Sin embargo, debido al aumento de las enfermedades en plantas causadas por especies de *Fusarium*, surgió la necesidad de crear un sistema de clasificación. Fue hasta 1935, que Wollenweber y Reinking publicaron un estudio (*Die Fusarien*) en el cual clasificaron las especies de *Fusarium* dentro de 16 secciones (*Eupionnotes*, *Macroconia*, *Spicarioides*, *Submicrocera*, *Pseudomicrocera*, *Arachnites*, *Sporotrichiella*, *Roseum*, *Arthrosporiella*, *Gibbosum*, *Discolor*, *Lateritium*, *Liseola*, *Elegans*, *Martiella*, *Ventricosum*), que contenían 65 especies, 55 variedades y 22 formas ^(84,85). Ellos se basaron en las características de los conidios como son tamaño, forma, número de septos y la forma de las células basal y apical. Además, en las características de las colonias (tipo de micelio aéreo, presencia de pigmento en el medio, ausencia de esporulación, entre otras) ⁽⁶¹⁾. Desde entonces ha sufrido modificaciones a lo largo del tiempo, llevadas a cabo por Gerlach y Nirenberg, Booth, Joffe, Synder y Hansen, Messiaen y Cassini. Hasta la clasificación taxonómica actual ⁽⁸⁵⁾.

Respecto a las infecciones causadas por especies del género *Fusarium*, denominadas fusariosis, éstas sólo se mostraban en plantas y animales. A partir de 1964, comenzaron a presentarse casos de queratitis en humanos producidas por *Fusarium* spp., y más tarde (1971) onicomycosis ^(68,76,97,109).

El primer caso descrito de infección diseminada por *Fusarium* fue reportado en 1973, en un niño con leucemia linfocítica aguda ⁽⁵⁹⁾. Posteriormente, el número de casos se han ido incrementando, llegando a constituir la segunda causa más frecuente de infección por hongos filamentosos después de *Aspergillus* spp. ⁽⁹¹⁾.

La descripción de Whiteside en 1991 fue un hecho relevante acerca de la lluvia amarilla observada durante la guerra en Vietnam, donde la caída del polvo extraño amarillo del cielo fue un producto de la guerra biológica de los soviéticos. El polvo se identificó como *Fusarium tricinctum* ⁽¹³⁵⁾.

1.2 Agente etiológico.

1.2.1 Ecología.

El significado etimológico de la palabra *Fusarium* viene del latín *fuscus* que significa “huso” y del sufijo *arium* “poseedor”, en alusión a la forma en huso de los macroconidios ⁽¹²⁷⁾.

Fusarium es un género que incluye 70 especies, las cuales presentan una amplia distribución mundial, en áreas templadas, tropicales, desérticas y árticas, además pueden crecer y sobrevivir en diversos sustratos como en la materia orgánica, hojas secas, así como permanecer en el suelo y dentro de las semillas hasta por 15 meses ^(60,82). El aire es un factor que ha influido en la diseminación de los conidios hasta una distancia de 400 km. Este hongo tiene la capacidad de resistir aguas salinas y la profundidad del mar ^(85,115). Por la capacidad de dispersarse y colonizar la parte aérea de las plantas tienen gran importancia agro-económica, ya que son los principales hongos fitopatógenos ⁽⁸⁵⁾. Algunas de las especies son altamente patógenos de plantas y productores de micotoxinas que contaminan los alimentos. Entre los diversos cultivos que puede afectar están: algodón, tomate, melón, garbanzo, papa y cereales como son: arroz, trigo, maíz y avena ⁽¹³⁶⁾.

Debido a que puede crecer en diversos sustratos, en el laboratorio, tiene buen desarrollo en los medios de cultivo convencionales, excepto en agar dextrosa de Sabouraud con cicloheximida ⁽⁸⁹⁾. La temperatura en la cual alcanza la velocidad máxima de crecimiento es a 25°C y con una humedad relativa de 60-70% ^(1,113). Mientras que requiere de una baja concentración de CO₂ para la formación de conidios ⁽¹²⁶⁾.

En el humano, en la población sana se ha aislado de la orofaringe, también puede colonizar el saco conjuntival, sobre todo en ojos que presentan alguna alteración patológica como queratoconjuntivitis alérgica, cirugía refractiva incisional, úlceras neurotróficas y queratoplastia ^(4,47).

De las 70 especies descritas hasta la fecha, sólo 15 han sido causa de infecciones en animales y en los humanos (Tabla1). De las más frecuentes están *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. incarnatum*, *F. chlamydosporum* y *F. dimerum* ^(2,133).

Tabla 1. Frecuencia de infecciones causadas por especies de *Fusarium*.

Especie	Frecuencia (%) o número de casos	Referencia
<i>F. solani</i>	40-50	Nucci & Anaissie; Alastruey-Izquierdo y cols. ^(2,89)
<i>F. oxysporum</i>	20-30	Nucci & Anaissie; Alastruey-Izquierdo y cols. ^(2,89)
<i>F. verticilloides</i>	20	Nucci & Anaissie; Alastruey-Izquierdo y cols.; Hernández-Cruz y cols. ^(2,51,89)
<i>F. incarnatum</i>	18-20*	Azor y cols. ⁽¹²⁾
<i>F. chlamyosporum</i>	15-17*	Azor y cols. ⁽¹²⁾
<i>F. dimerum</i>	13*	Azor y cols. ⁽¹²⁾
<i>F. proliferatum</i>	18*	Alastruey-Izquierdo y cols.; Azor y cols. ^(2,12)
<i>F. moniliforme</i>	10	Nucci & Anaissie ⁽⁸⁹⁾ .
<i>F. sacchari</i>	8-10*	Azor y cols. ⁽¹²⁾
<i>F. nygamai</i>	13-15*	Azor y cols. ⁽¹²⁾
<i>F. napiforme</i>	5-7*	Azor y cols. ⁽¹²⁾
<i>F. equiseti</i>	2-5*	Alastruey-Izquierdo y cols. ⁽²⁾
<i>F. reticulatum</i>	1-2*	Alastruey-Izquierdo y cols. ⁽²⁾
<i>F. antophilum</i>	No especificado	
<i>F. subglutinans</i>	No especificado	

* Casuística regional.

1.2.2 Taxonomía.

La clasificación taxonómica de acuerdo con la descripción de Thomas G. Mitchell (2005) se muestra en la tabla 2 ⁽⁷⁷⁾.

Tabla 2. Ubicación taxonómica del género *Fusarium*.

Reino	Phylum	Clase	Orden	Familia	Género	Especies
<i>Eumycota</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Euascmycetes</i>	<i>Hypocreales</i>	<i>Hypocreaceae</i>	<i>Fusarium</i>	<i>F. oxysporum</i> <i>F. solani</i> <i>F. subglutinans</i>

1.2.3 Morfología macroscópica.

Para los fines de este trabajo se describirá únicamente la morfología de las especies incluidas. La mayoría de las colonias de las especies de *Fusarium* crecen rápidamente (40-80 mm durante 7-10 días), aunque algunas como *Fusarium dimerum* tienen una velocidad de crecimiento menor (20 mm en 7-10 días). La textura de la colonia es variada, generalmente es algodonosa o lanosa. Inicialmente las colonias son de color blanco, pero al pasar los días se van oscureciendo adoptando color “beige”, rosa, morado, rojo o amarillo. Al reverso, en los cultivos maduros se aprecia producción de pigmento de diversas tonalidades como morado, rojo, verde, azul y marrón (Tabla 3)^(17, 59).

Tabla 3. Características morfológicas macroscópicas de tres especies del género *Fusarium* (59,78).

Especie	Textura	Crecimiento (mm)	Color de la colonia	Pigmento al reverso
<i>F.oxysporum</i>	Colonia lisa y algodonosa.	50 mm/7 días	Blanco, salmón, zona central púrpura.	Púrpura-violeta que difunde al medio.
<i>F. solani</i>	Colonia lisa y algodonosa.	30 mm/7 días	Blanco, crema, ocre, rosa o púrpura.	No presenta o es de color crema.
<i>F.subglutinans</i>	Colonia algodonosa.	50 mm/7 días	Rosa, vino o violeta.	Naranja.

1.2.4 Morfología microscópica.

Las hifas son hialinas, septadas, de diámetro de 3-8 μm . Por lo general se ramifican en ángulo recto o agudo. Generan tres tipos de conidios: macroconidios, microconidios y blastoconidios ⁽⁵⁹⁾.

Los macroconidios se producen en una estructura especializada llamada esporodoquio, o también pueden ser producidas en monofiálides o polifiálides en el micelio aéreo. Una monofiálide es una fiálide con una sola abertura o poro por el cual salen los endoconidios, mientras que una polifiálide tiene dos o más fiálides (Tabla 4) (Fig. 1).

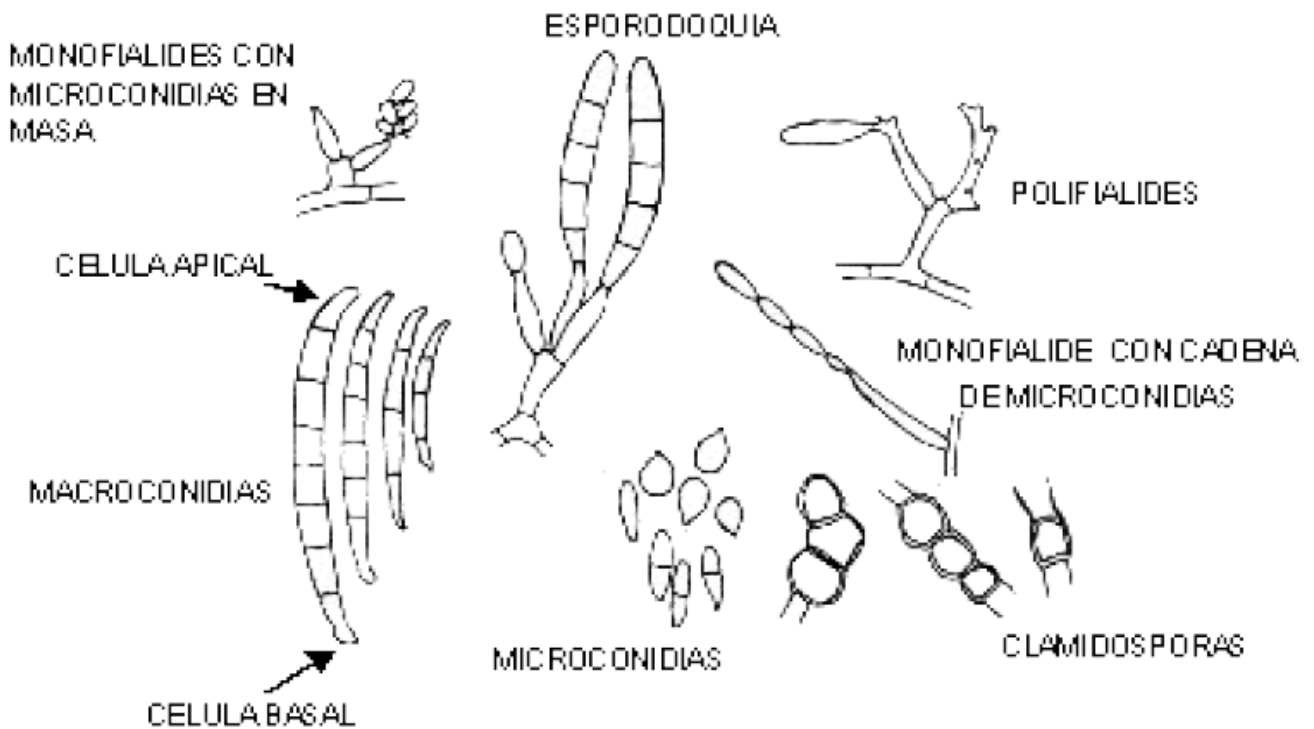


Figura 1. Características morfológicas microscópicas del género *Fusarium* (Tomada de Monzón, 2000) ⁽⁷⁸⁾.

Tabla 4. Características morfológicas microscópicas de tres especies del género *Fusarium* (17,59,78).

Especie	Microconidios	Macroconidios	Estructuras especiales	Clamidoconidios
<i>F. oxysporum</i>	Ovoides o en forma de “riñón”. Tamaño de 5-12x2.3-3.5 μm . La mayoría no tiene septos. Dispuestos en masas (simulan “cabezas”), nunca catenulada.	Fusiformes, ligeramente curvados. La célula apical es afilada y la basal en forma de “pie”, aunque ambos extremos pueden ser afilados. Miden de 23-54x3.0-4.5 μm . Tienen de 3 a 5 septos.	Monofiálides cortas, únicas, laterales a la hifa, al final en forma de racimo o ramificados.	Terminales o intermedios, hialinos, de 5-13 μm de diámetro, de pared lisa o rugosa.
<i>F. solani</i>	Numerosos, ovoides, de 8-16x2.0-4.5 μm , con un septo.	Menos numerosos que los microconidios. Forma de “media luna”, la superficie ventral y dorsal paralelas en la mayor parte de su longitud. La célula apical es corta y redondeada y la basal en forma de “pie” o redondeada. De 28-65x4-6 μm , con 3 a 5 septos.	Monofiálides cortas, ramificadas, se desprende lateralmente de la hifa. En la punta se afilan y collaretes poco definidos. Forman esporodoquio.	Aisladas o en pares, terminales o intermedias. De 6 a 10 μm de diámetro, pared lisa o rugosa.
<i>F. subglutinans</i>	Ovoides o elipsoidales, de 4-20x1.5-4.5 μm . Disposición en masas o “cabezas”.	Numerosos, de forma recta, con célula basal y apical diferentes. De 3 a 5 septos, de 27-73x3.4-5.2 μm .	Polifiálides rectas, ramificadas, terminan con microconidios dispuestos en masas o “cabezas”. Presenta blastoconidios ligeramente curvos con 2 a 3 septos.	Ausentes.

Algunos conidios son intermedios, tienen tamaño y forma similar a los macroconidios, con ausencia de la célula basal o “célula pie”, son individuales y se producen generalmente en polifiálides, se les denomina mesoconidios. Éstos se encuentran principalmente en *F. semitectum*, *F. avenaceum* y *F. subglutinans* ⁽⁸⁵⁾.

Los macroconidios son hialinos, septados (de uno a cinco septos), en forma fusiforme, es decir, alargada con una curva dorso-ventral, los polos en punta, semejante a una forma de “plátano” o “canao” (5-73x1.5-6µm). La célula apical es alargada y la basal tiene una forma de “pie” o muesca torso-lateral en el punto de unión con la fiálide (Fig.1). Se producen en sucesión basipeta a partir de las monofiálides ⁽⁷⁸⁾. La morfología es la clave de la identificación de las diferentes especies, ya que su forma es relativamente constante y estable cuando el hongo crece en sustratos naturales y condiciones estándar.

Los microconidios son unicelulares, hialinos, con tamaño (4-26x1.5-11µm) y forma variable (ovoides, elipsoidales, piriformes, etc.). Ocasionalmente tienen un septo y la base puede ser redondeada, apiculada o truncada. Los microconidios se producen en el micelio aéreo a partir de monofiálides o polifiálides y no en el esporodoquio. La disposición puede ser aislada, en masas o catenulada ⁽⁸⁵⁾.

Los clamidoconidios son formas de resistencia ante ambientes adversos que garantizan la propagación y supervivencia del hongo, generándose por modificación de un segmento de la hifa. La forma es esférica, de pared gruesa, lisa o rugosa; la disposición es aislada, en pares, en grupos o catenulada ⁽⁷⁸⁾. La presencia o ausencia de clamidoconidios y microconidios son características que se toman en cuenta para la identificación de la especie (Fig. 1). Estas estructuras pueden germinar por el estímulo de nuevos nutrientes y cambios en las condiciones del microambiente.

Los microconidios son las estructuras responsables del inicio del proceso de diseminación y progresión de la enfermedad en la planta hospedera, ya que pueden introducirse en el sistema vascular de la planta, germinan y surge la hifa que invadirá las células a través de los hoyuelos de las paredes a los vasos adyacentes ⁽¹¹⁵⁾.

1.3 Infecciones causadas por *Fusarium*.

Fusarium spp. está considerado como un hongo emergente que puede causar un amplio espectro de infecciones en el humano, denominadas hialohifomicosis, es decir, son infecciones causadas por hongos filamentosos hialinos, cuya estructura parásita en el tejido son hifas hialinas, septadas, ramificadas o ausencia de ramificaciones, ocasionalmente toruloidea y ausencia de pigmento en la pared ^(4,17,34).

Las vías de entrada de *Fusarium* spp. al organismo están determinadas por el estado inmunológico del hospedero, de tal manera que es fundamental conocer los factores de riesgo relacionados y factores de virulencia del microorganismo.

Los mecanismos de infección son a través del tracto respiratorio y gastrointestinal, los senos paranasales, las uñas y la piel, en esta última por medio de pequeñas heridas producidas por traumatismos (úlceras, quemaduras, cuerpos extraños y catéteres intravenosos). A nivel hospitalario es común que la fuente de infección sea a través del contacto con aguas contaminadas, por lo que es recomendable evitar el uso de agua de ducha para la higiene personal de los pacientes especialmente los neutropénicos ⁽⁶⁾.

Por otro lado, los factores de virulencia del hongo son la producción de toxinas, enzimas y la capacidad de adhesión ⁽⁸²⁾.

La clasificación clínica incluye infecciones superficiales, localizadas invasivas y diseminadas. También pueden ocasionar alergias (sinusitis) y micotoxicosis en humanos y animales debido a la ingesta de alimentos contaminados con las toxinas producidas por *Fusarium* spp. ⁽⁸⁹⁾.

Las infecciones superficiales (onicomicosis, queratitis y afecciones en la piel), localmente invasivas (neumonía, endoftalmitis, sinusitis), hasta las infecciones sistémicas o diseminadas, siendo estas últimas más comunes en pacientes inmunosuprimidos (Tabla 5) ^(89,17). Las especies que con más frecuencia están involucradas en la diversidad de infecciones son *F.solani* y *F.oxysporum* (Tabla 6) ⁽⁵⁶⁾.

En pacientes inmunocompetentes las infecciones por *Fusarium* son localizadas, principalmente afectan los ojos, la piel y las uñas ⁽⁵⁶⁾. Sin embargo, en pacientes inmunosuprimidos son diseminadas y de mal pronóstico.

Tabla 5. Relación de los factores de riesgo y la entidad clínica.

Entidad Clínica	Factores de riesgo	Referencias
<ul style="list-style-type: none"> Infecciones superficiales Queratitis	Traumatismos Lentes de contacto o soluciones oftálmicas contaminados Patología oftálmica previa Tratamientos tópicos Corticosteroides o antibióticos	Dignani, 2004 ⁽³⁴⁾ . Alvarado-Castillo, 2007 ⁽⁵⁾ . Nucci, 2007 ⁽⁸⁹⁾ .
Onicomicosis	Traumatismos Caminar descalzo Tomar duchas sin calzado Humedad excesiva	Monzón, 2000 ⁽⁷⁸⁾ . Dignani, 2004 ⁽³⁴⁾ . Morales, 2013 ⁽⁷⁹⁾ .

Entidad Clínica	Factores de riesgo	Referencias
Afecciones cutáneas	Heridas Quemaduras Humedad excesiva Neutropenia	Monzón, 2000 ⁽⁷⁸⁾ .
<ul style="list-style-type: none"> Infecciones localizadas invasivas Peritonitis por diálisis peritoneal	Tipo de enfermedad (diabetes, mieloma, etc.) Uso de corticosteroides Alteración de la microbiota por tratamiento antibiótico de larga duración	Rodríguez, 1988 ⁽¹⁰⁸⁾ .
Endoftalmitis	Traumatismo Cirugía ocular previa Queratitis Neutropenia Inmunosupresión	Dignani, 2004 ⁽³⁴⁾ .
Sinusitis	Infección nasosinusal progresiva Neutropenia prolongada Inmunosupresión	García-Ruiz, 2004 ⁽⁴³⁾ .
Neumonía	Neutropenia Alteraciones pulmonares preexistentes Cantidad de inóculo inhalado	García-Ruiz, 2004 ⁽⁴³⁾ .
<ul style="list-style-type: none"> Infecciones diseminadas Fungemia	Neoplasias malignas Leucemias mieloides o linfoides Trasplantes Neutropenia profunda Inmunosupresión Quimioterapia Tratamiento con corticosteroides	Payá, 2000 ⁽⁹²⁾ .
Fungemia asociada al catéter venoso central	Uso de catéter por tiempo prolongado Neutropenia transitoria	Payá, 2000 ⁽⁹²⁾ .
Afecciones cutáneas	Fungemia Inmunosupresión Neutropenia prolongada	Dignani, 2004 ⁽³⁴⁾ .

Tabla 6. Relación entre entidad clínica y especie de *Fusarium*.

Entidad clínica	Especie de <i>Fusarium</i>	Referencia
Queratitis	<i>F. oxysporum</i> y <i>F. solani</i>	Payá, 2000 ⁽⁹²⁾ . Alvarado-Castillo, 2007 ⁽⁵⁾ .
Onicomycosis	<i>F. oxysporum</i> y <i>F. solani</i>	Ballesté, 2003 ⁽¹³⁾ . Cavallera, 2006 ⁽²⁵⁾ . Hidalgo-Parra, 2008 ⁽⁵⁶⁾ .
Afecciones cutáneas	No especificado	
Endoftalmitis	<i>F. oxysporum</i>	Payá, 2000 ⁽⁹²⁾ .
Sinusitis	No especificado	
Neumonía	No especificado	
Fungemia	<i>F. solani</i>	Hidalgo-Parra, 2008 ⁽⁵⁶⁾ .

Infecciones superficiales:

- Queratitis o Queratomicosis.

El 36% de estas infecciones son producidas por el género *Fusarium*. Las causas más comúnmente asociadas son los traumatismos con ramas de árboles o plantas, por conidios aerosolizados en ambientes particularmente contaminados, por el uso de lentes de contacto o soluciones oftálmicas contaminadas o posterior a una cirugía ocular. Un factor de riesgo importante es la presencia de alguna patología corneal y la administración de corticosteroides tópicos o antibióticos ^(34,78). Las manifestaciones clínicas son inespecíficas, pueden incluir dolor ocular, conjuntivas congestivas y secreción. Histológicamente se presenta infiltrado estromal de bordes plumosos, con lesiones satélite, hipopión y reacción ciliar ^(44,47).

Un estudio realizado en México por Vanzzini y cols. (2010) ⁽¹²⁹⁾, mostraron una mayor frecuencia de queratitis por *Fusarium* spp. (37%) en los estados con clima cálido templado, como Puebla, Oaxaca, Michoacán y Veracruz, donde la población masculina fue la más afectada.

- Onicomicosis.

En las onicomicosis causadas por hongos filamentosos no dermatofitos se ha descrito la incidencia de *Fusarium* spp. del 10% al 50%, siendo *F. oxysporum* la especie más frecuente ^(37,138).

La mayoría de estas infecciones predominan en las uñas de los pies. Las dos formas clínicas más comunes son la onicomicosis subungueal proximal (con o sin paroniquia) y la onicomicosis blanca superficial. Se caracteriza por la aparición de manchas blancas en la base de la uña que se extienden hacia el extremo libre, ocasionando opacidad total de la uña, engrosamiento de su borde y si progresa, destrucción de una parte o en su totalidad ^(34,78).

Los factores de riesgo asociados a la onicomicosis por *Fusarium* spp. son el uso de zapato tipo sandalia o caminar descalzos, ya que este hongo es común que sea aislado del suelo. Por lo que las personas que se dedican a la agricultura, jardinería o algún trabajo que implique el contacto con la tierra, pueden adquirir fácilmente esta infección ⁽¹¹¹⁾.

Generalmente la onicomicosis en personas sanas es una infección localizada y superficial; sin embargo, en pacientes inmunosuprimidos puede llegar a ser una vía de entrada para causar una infección invasiva diseminada.

Infecciones invasivas localizadas:

- Infecciones cutáneas.

La piel es el principal sitio de infección por *Fusarium* spp., pueden afectar cualquier región anatómica, principalmente miembro pélvico, con una evolución de uno a cinco días. El hongo ingresa al organismo por diferentes mecanismos: a) Inoculación traumática en la piel; b) Establecimiento secundario a quemaduras; c) Por la diseminación hematógena en el 55%, principalmente en pacientes inmunosuprimidos. Las características clínicas son polimorfas manifestadas como celulitis (12%), granulomas, úlceras, nódulos, ampollas, necrosis, paniculitis, intertrigo y micetoma. Mientras que en las diseminadas pueden ser múltiples pápulas o nódulos eritematosos con necrosis central; en ocasiones rodeadas por un anillo eritematoso de uno a tres cm de diámetro. También se ha descrito afección muscular, caracterizada por mialgias y faceitis ^(34,53,88,89).

- Peritonitis por diálisis peritoneal.

La peritonitis secundaria a diálisis peritoneal continua ambulatoria fue descrita por Mc Nelly y cols. en 1981; estos autores reportaron dos casos en los cuales se aisló *Fusarium* spp. del líquido de diálisis. Las manifestaciones de la infección son inespecíficas, caracterizadas por dolor abdominal, fiebre y disminución del flujo de drenaje, por obstrucción progresiva de la luz del catéter ⁽⁴⁴⁾.

- Fungemia asociada al catéter venoso central (CVC).

La colonización del catéter es un factor relacionado con las fungemias en los pacientes inmunosuprimidos o en aquéllos con episodios de neutropenia transitoria, en general presentan un buen pronóstico, con el establecimiento de las medidas terapéuticas adecuadas y oportunas. En la literatura mundial se ha descrito un pequeño número de pacientes portadores de CVC sin afectación específica de algún órgano, en quienes se ha aislado diversas especies de *Fusarium* de hemocultivos ⁽⁹²⁾.

- Endoftalmitis.

Esta entidad es considerada una complicación de la queratitis en pacientes inmunocompetentes o que han tenido alguna cirugía ocular (extracción de cataratas); sin embargo, en individuos inmunosuprimidos es secundario a una diseminación hematógena o denominada endoftalmitis endógena. Tamez-Peña y cols. en 2010 ⁽¹²⁰⁾, presentaron un caso en el cual se describió este tipo de infección endógena por la diseminación de *Fusarium* spp. de un foco de onicomycosis causada por este agente.

- Sinusitis.

En pacientes inmunocompetentes, *Fusarium* spp. puede producir sinusitis alérgica o crónica invasiva (6%), pero en caso de inmunosupresión puede propiciar una infección diseminada (20%). Los síntomas son similares a los descritos para aspergilosis, como son: obstrucción nasal, cefalea y rinorrea, o más graves como necrosis del paladar, celulitis periorbitaria y paranasal^(44,89).

- Neumonía.

Esta patología se presenta en pacientes inmunosuprimidos con infección diseminada. Las manifestaciones clínicas son inespecíficas similares a aspergilosis invasiva, con tos seca, dolor torácico pleurítico y disnea.

Infecciones diseminadas.

Estas infecciones ocurren en pacientes con diversos factores de riesgo como enfermedades hematológicas y tratamientos con inmunosupresores. Los factores de riesgo más comunes son neutropenia prolongada (mayor a 10 días), inmunodeficiencia de células T y disfunción macrofágica; presentes en aproximadamente el 70% de los casos de las infecciones diseminadas por *Fusarium* spp.⁽¹⁰⁶⁾. La mortalidad de esta variedad clínica se presenta en el 50-80% de los pacientes con neutropenia y se incrementa al 100% con la asociación de varios factores de riesgo^(4,53,56,130).

La infección diseminada puede afectar cualquier órgano, los más comunes son: pulmón, riñón, bazo, hígado, médula ósea y tracto gastrointestinal. La entrada de los conidios es por vía aérea, de tal manera que el principal órgano afectado es el pulmón (31-42%). Otra vía de llegada es por diseminación hematológica⁽²¹⁾.

Las manifestaciones clínicas son inespecíficas incluyendo fiebre continua, neutropenia y una baja o nula respuesta al tratamiento terapéutico. Cuando se ve afectado el pulmón, hay dolor pleurítico, fiebre, tos y hemoptisis, por lo que se puede confundir con aspergilosis pulmonar. Sin embargo, a diferencia de la aspergilosis, la infección por *Fusarium* spp. está asociada con numerosas lesiones cutáneas y hemocultivo positivo^(4,34).

1.3.1 Epidemiología.

Mundialmente se ha reportado que de los hongos filamentosos, *Fusarium* spp. ocupa el segundo lugar como agente causal de las infecciones diseminadas después de *Aspergillus* spp.

Las especies de *Fusarium* pueden afectar diversos órganos: la piel y uñas en el 75% de los casos, seguido por el pulmón en el 31-42% y la nariz en el 22%. En menor proporción, el riñón en el 15%, tracto gastrointestinal en el 9%, ojos en el 7% y el sistema nervioso central en el 5% ⁽⁸²⁾.

En México se han realizado algunos estudios clínicos epidemiológicos enfocados a conocer la frecuencia de infecciones micóticas en pacientes inmunosuprimidos (7,8,18,22,47,51,52,54,66,72-74,120,129). En el estudio realizado por Hernández-Hernández y cols. ⁽⁵²⁾, no se describió ningún caso de infección por especies de *Fusarium*. Sin embargo, se han reportado casos en todos los continentes, lo que demuestra su amplia distribución geográfica. De acuerdo con la revisión de Girmenia y cols. en 2000 ⁽⁴⁶⁾, el mayor número de casos (50%) se presentaron en Estados Unidos.

Los factores de riesgo asociados a las infecciones invasivas o diseminadas por especies de *Fusarium* son las neoplasias malignas hematológicas, neutropenias prolongadas, trasplantes de órganos, tratamientos con corticosteroides (Tabla 5). En pacientes con el virus de inmunodeficiencia humana, las infecciones por *Fusarium* spp. son raras y se presentan asociadas a una neoplasia hematológica, diabetes mellitus, neutropenia, terapia con esteroides y uso prolongado con antibióticos ⁽¹³¹⁾.

También se pueden presentar infecciones nosocomiales como señala Raad y cols. ⁽¹⁰⁵⁾ en un estudio epidemiológico, donde el 24% de las infecciones nosocomiales en pacientes con diversas enfermedades inmunosupresoras fueron causadas por especies de *Fusarium*.

1.3.2 Diagnóstico.

La infección se confirma por el aislamiento de especies de *Fusarium* de los diversos especímenes biológicos (sangre, fragmento de tejido, raspado de córnea, esputo, lavado bronquial, etc.), tomando en cuenta la historia clínica del paciente.

Dos características importantes para el diagnóstico de la infección diseminada por *Fusarium* en pacientes inmunosuprimidos, son las lesiones cutáneas y el resultado positivo del hemocultivo.

El crecimiento de las colonias de las especies de *Fusarium* en un medio de cultivo sin cicloheximida, es relativamente rápido y se puede identificar por las características macroscópicas y micromorfología. Además del hallazgo de la estructura parasitaria en el estudio histopatológico, por técnicas de anticuerpos fluorescentes policlonales, hibridación *in situ* o por la reacción en cadena de la polimerasa, la cual es más rápida, específica y sensible ^(34,89).

1.3.3 Tratamiento.

Los tratamientos empleados en las infecciones causadas por el género *Fusarium* han sido con algunos antifúngicos; en general, la respuesta ha sido pobre y no existe algún fármaco de elección. Las especies son consideradas multi-resistentes a la mayoría de estos agentes ⁽¹¹⁾.

La indicación del antifúngico depende de la localización de la infección por *Fusarium* spp. En la queratitis generalmente es tratada con natamicina. En casos diseminados, los principales antifúngicos utilizados fueron los triazoles (fluconazol e itraconazol) y anfotericina B. En la última década los pacientes han presentado mejor respuesta a la administración de voriconazol ^(30,110). La anfotericina B ha mostrado buena respuesta en las infecciones invasivas; sin embargo, debido a su baja tolerabilidad, se han empleado otras alternativas ^(12,38,67).

En la peritonitis secundarias a infecciones diseminadas o fungemias por *Fusarium* spp. y asociadas a catéter es imprescindible retirar el dispositivo médico (diálisis, hemodiálisis y CVC), tratar con antifúngicos y la recuperación de la neutropenia o cualquier otro factor de riesgo ^(4,34,44).

El tratamiento de la onicomycosis por *Fusarium* spp., generalmente presenta un 25% de fracaso terapéutico, debido a varios factores como la farmacocinética de los antifúngicos, incumplimiento del tratamiento por parte del paciente, a reinfecciones y a la resistencia a los antifúngicos ^(13,69). El uso de itraconazol ha mostrado buenos resultados; aunque la terapia combinada (vía oral y administración tópica) ha presentado mayor éxito. Entre los antifúngicos utilizados en esta modalidad de terapia son: crema de isoconazol al 1% con itraconazol, laca de amorolfina al 5% con terbinafina o itraconazol ^(13,25). Tosti y cols. ⁽¹²⁵⁾ demostraron que la combinación en la terapia (aplicación del antifúngico tópico más avulsión de la uña de forma física o química) ha mostrado un aumento en la curación en la mayoría de los pacientes inmunocompetentes ⁽⁶⁹⁾

La combinación de antifúngicos podría considerarse en pacientes que presenten múltiples factores de riesgo y una baja respuesta a la monoterapia ^(57,128). En ocasiones se combina el tratamiento para los pacientes neutropénicos, con factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos o GM-CSF, ya que la recuperación del recuento de neutrófilos es importante para aumentar la supervivencia de los pacientes ^(34,64).

1.4 Antifúngicos.

En este capítulo se tratará algunas de las características de los antifúngicos utilizados en este trabajo: clasificación, estructura química y mecanismos de acción.

En la década de los 50's, Brown y Hazen, descubrieron los polienos. En 1955 se desarrolló la anfotericina B, siendo comercializada para uso parenteral a partir de 1961. Desde entonces ha sido utilizada para tratar la mayoría de las infecciones fúngicas invasivas. Sin embargo, por su alta toxicidad, se buscaron otras alternativas terapéuticas. En 1957 fue descubierta la flucitosina y comercializada, utilizada para infecciones producidas por el género *Candida* y *Cryptococcus*, pero se generó resistencia secundaria a este fármaco.

A finales de los años 60 se comercializaron los primeros azoles (clotrimazol, ketoconazol). En 1990 se inició el uso de los triazoles, fluconazol y posteriormente itraconazol; así como las nuevas formulaciones lipídica de anfotericina B menos tóxicas; alilaminas y antifúngicos de uso tópico (amorolfina y ciclopiroxolamina). A partir del 2000, la introducción de equinocandinas como caspofungina y triazoles de segunda generación como voriconazol. Finalmente, las nuevas generaciones de antifúngicos aún no comercializados son: ravuconazol, albaconazol y aminofungina ^(24,93).

1.4.1 Clasificación.

Los antifúngicos se clasifican principalmente por dos criterios; el primero es por su estructura química (Tabla 7) y el segundo por su mecanismo de acción (Tabla 8). Otros parámetros que en ocasiones son tomados en cuenta son: A) origen: sustancias producidas por organismos vivos o sintéticos; B) espectro de acción (amplio o restringido); C) la forma farmacéutica ^(3,48).

Tabla 7. Clasificación de los antifúngicos por su estructura.

Estructura química	Antifúngicos
Polienos	Natamicina, anfotericina B.
Azoles	Imidazol: ketoconazol. Triazoles primera generación: fluconazol, itraconazol. Triazoles segunda generación: voriconazol, posaconazol.
Alilaminas	Terbinafina, amorolfina.
Equinocandinas	Caspofungina, anidulafungina.
Otros	Bromuro de cetiltrimetilamonio.

Tabla 8. Clasificación de los antifúngicos por su sitio de acción o diana.

Membrana citoplasmática:	Polienos Azoles Alilaminas
Pared celular:	Equinocandinas

1.4.2 Estructura química.

Polienos

Los polienos son de origen natural, anfotericina B es producida por *Streptomyces nodosus* y natamicina por *Streptomyces natalensis* ⁽⁷⁵⁾.

Son moléculas anfipáticas, es decir, constan de una región hidrofílica compuesta de anillos macrólidos con un número variable de grupos hidroxilo, y una región hidrofóbica dada por enlaces covalentes conjugados. Por la presencia de estos enlaces se les denomina polienos, anfotericina B tiene siete (heptaeno) y natamicina cuatro (Fig. 2).

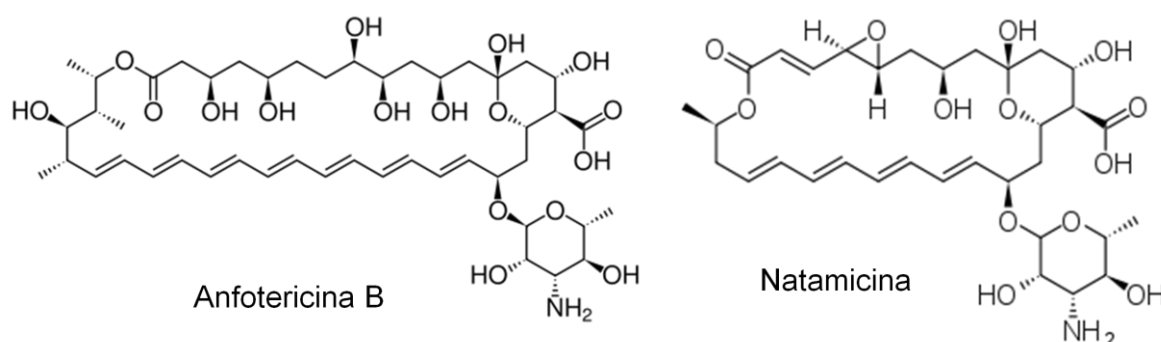


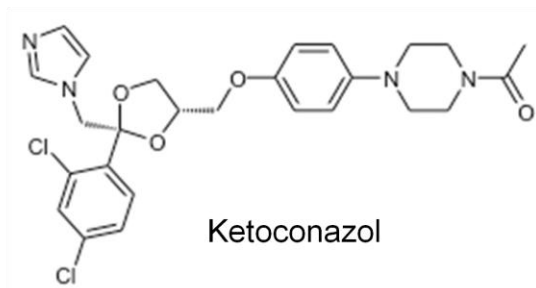
Figura 2. Estructura química de los polienos.

Azoles

Los azoles son de origen sintético, la mayoría derivados del grupo imidazol. Se caracterizan por tener un anillo imidazólico libre unido a otros anillos aromáticos mediante un enlace C-N. La naturaleza de estos anillos modifica las propiedades fisicoquímicas, el efecto terapéutico y la toxicidad.

Se clasifican en imidazoles (miconazol, clotrimazol, ketoconazol) y triazoles primera generación (fluconazol, itraconazol), dependiendo del número de nitrógenos en el anillo imidazólico (Fig. 3).

IMIDAZOLES



TRIAZOLES

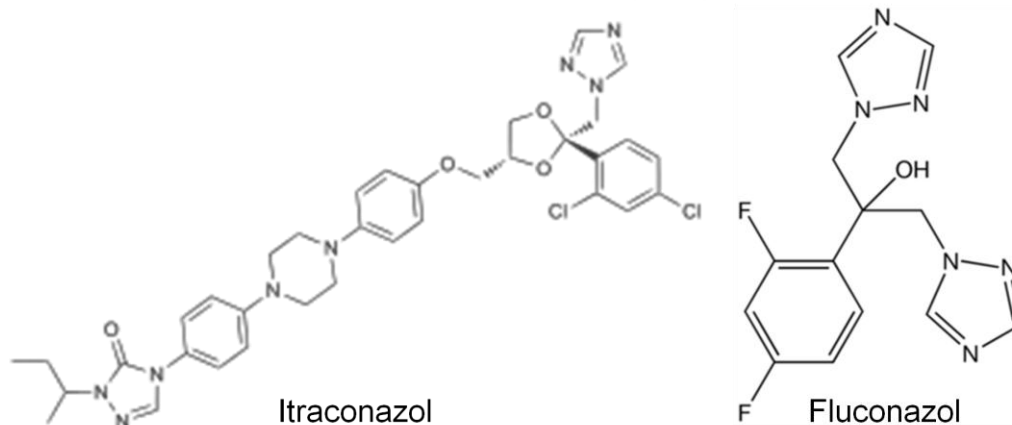


Figura 3. Estructura química de los azoles.

Los triazoles de segunda generación se desarrollaron por la búsqueda de sustancias más específicas que presentaran una mayor actividad y menor resistencia. En este grupo se encuentra voriconazol, el cual se deriva de fluconazol y posaconazol es derivado de itraconazol ⁽²³⁾.

La estructura de estos nuevos azoles (Fig. 4) está basada en el triazol (anillo imidazólico con tres átomos de nitrógeno), presentando además átomos de flúor. Estas modificaciones confieren una mayor capacidad inhibitoria de las enzimas de la vía de síntesis de los esteroides, especialmente la desmetilasa del lanosterol ⁽⁹⁵⁾.

Alilaminas

Son antifúngicos de origen sintético. Las alilaminas se caracterizan por ser compuestos básicos que resultan de la sustitución parcial o total de los átomos de hidrógeno en la molécula de amoníaco por otras moléculas (Fig. 5). De este grupo se derivan terbinafina, naftifina y amorolfina.

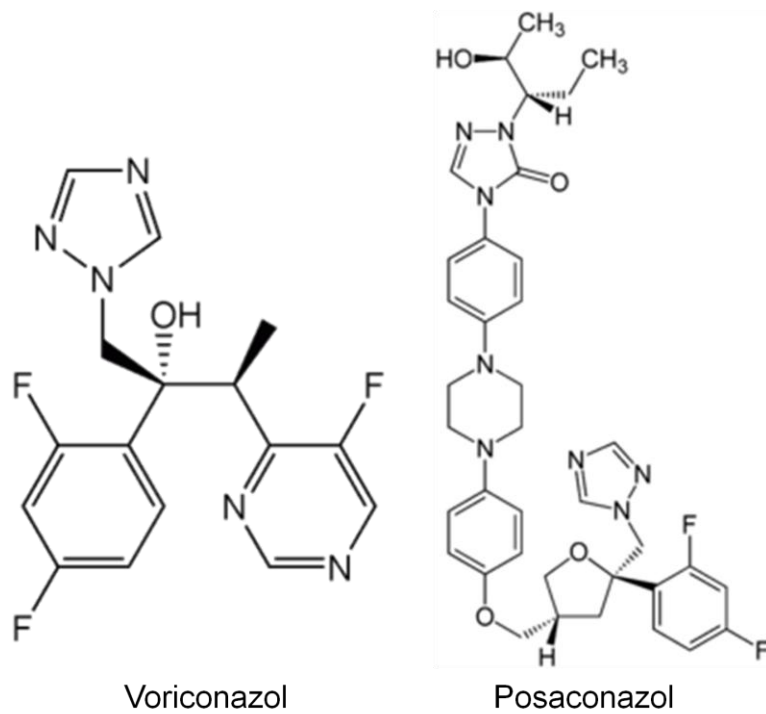


Figura 4. Estructura de los triazoles de segunda generación.

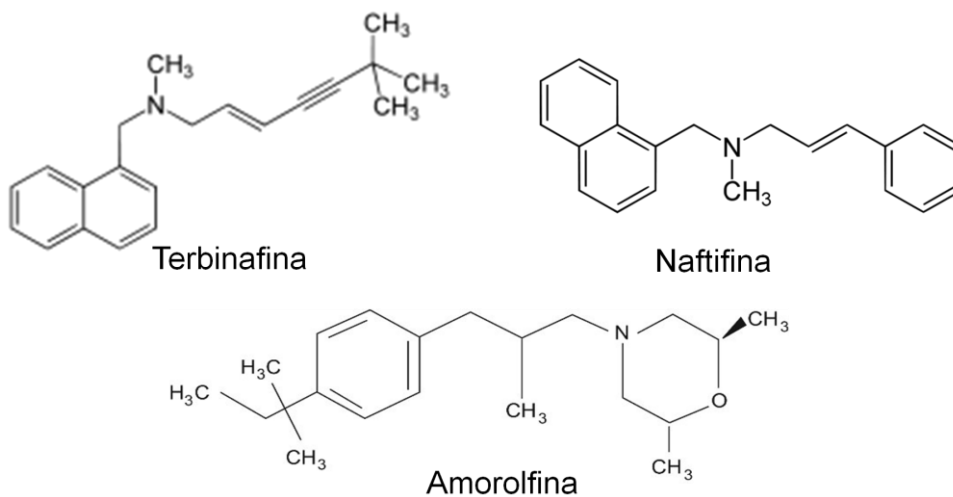


Figura 5. Estructura química de las alilaminas.

Equinocandinas

Las equinocandinas son lipopéptidos cíclicos semisintéticos con una cadena lateral N-acil o N-aril alifática, que les da un amplio espectro de acción contra las levaduras y los hongos filamentosos ⁽⁶⁵⁾. El acetato de caspofungina tiene un ácido graso como cadena lateral y anidulafungina una cadena alcoxitrifenoilo ⁽³⁵⁾. En la figura 6 se muestra las estructuras de estos dos antifúngicos.

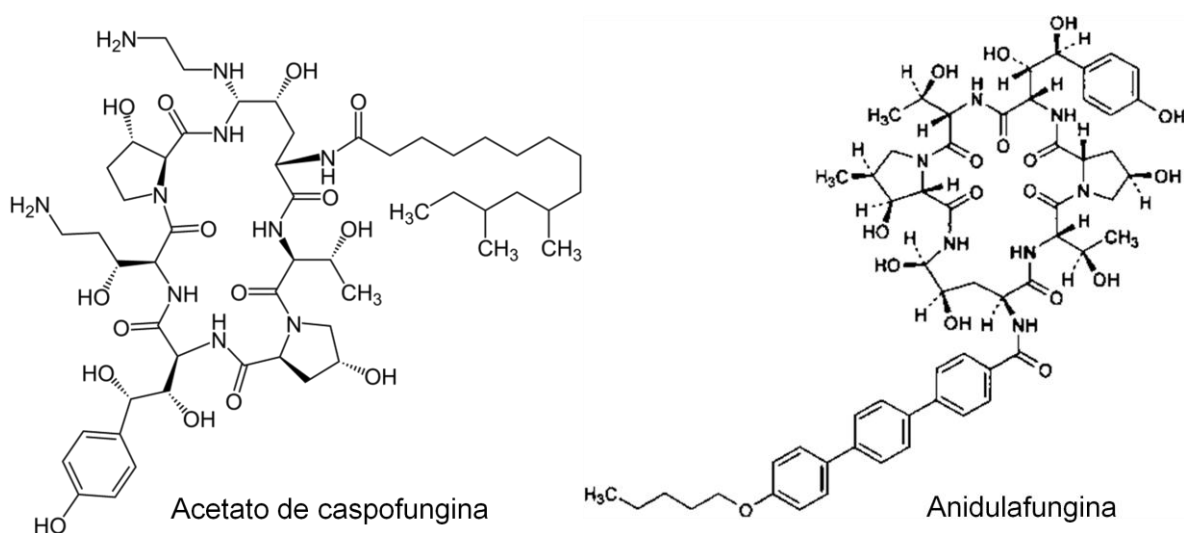


Figura 6. Estructura química de las equinocandinas.

La estructura de otro de los antifúngicos sintéticos se muestra en la figura 7. El bromuro de cetiltrimetilamonio (bromuro de cetrimonio) es una sal de amonio cuaternaria que tiene propiedades tensoactivas (surfactantes).

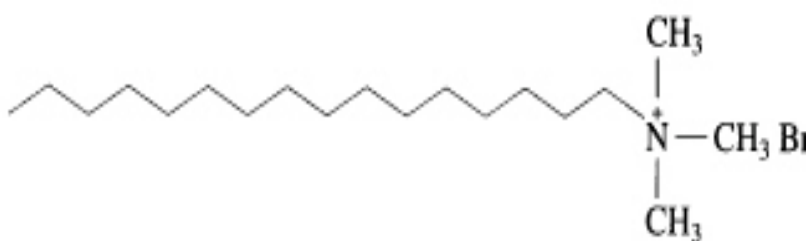


Figura 7. Estructura de bromuro de cetiltrimetilamonio.

1.4.3 Mecanismo de acción.

Los sitios de acción o dianas de los diferentes antifúngicos sobre las células fúngicas, ya sea a nivel de pared celular, membrana citoplasmática y núcleo se muestran en la figura 8.

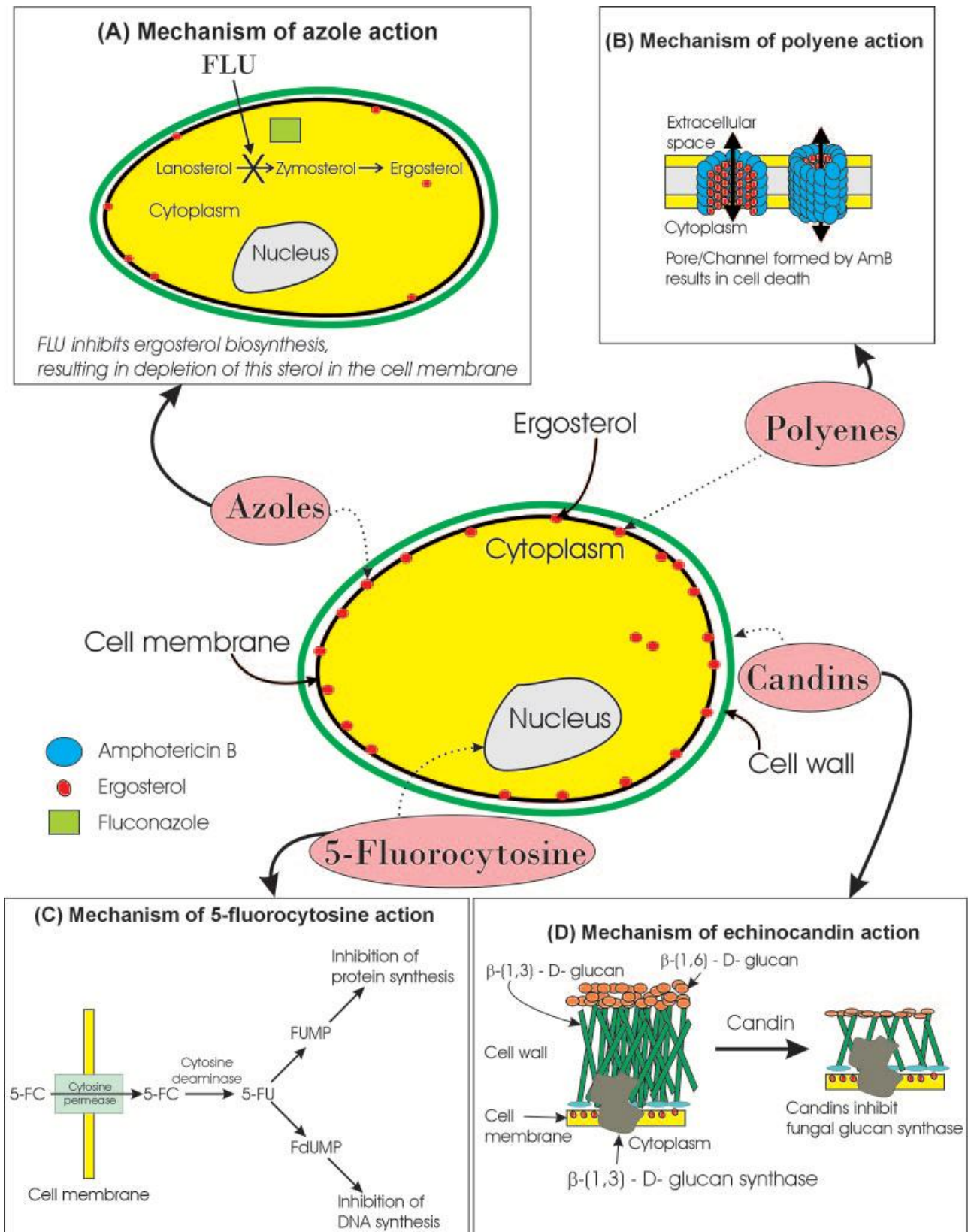


Figura 8. Esquemas del mecanismo de acción de los antifúngicos. (Tomada de Mukherjee, 2005) ⁽⁸¹⁾.

- Antifúngicos que actúan sobre la membrana.

La membrana plasmática cumple con varias funciones que mantienen constantes las condiciones fisicoquímicas del interior de la célula. Algunas de ellas son: proteger y delimitar la célula, controlar el transporte de sustancias al interior o exterior, recibir y transmitir estímulos. Está compuesta por 52% de proteínas, 40% de lípidos (fosfolípidos y esteroides) y 8% polisacáridos. El ergosterol es el esteroide que constituye un 25% de las moléculas lipídicas. Este componente es muy importante, ya que algunos antifúngicos actúan directamente sobre él (polienos) o inhiben su síntesis, como son los azoles y alilaminas ⁽³⁾.

Polienos

Los polienos tienen una mayor afinidad por el ergosterol de los hongos que por el colesterol de las células de mamíferos. Sus moléculas se unen al ergosterol mediante su región hidrófoba, por lo que la región hidrófila forma un conducto transmembranal que altera la permeabilidad y funcionalidad de la membrana, con la pérdida de iones y otros constituyentes esenciales, causando la muerte de la célula. En algunas células humanas se puede unir a los esteroides que se encuentran dentro de la célula, ocasionando daño a nivel de la respiración celular, además puede activar algunas funciones de los linfocitos que tienen efectos inmunomoduladores ⁽³²⁾.

Anfotericina B es activa contra hongos levaduriformes (*Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*) y filamentosos (*Aspergillus* spp., *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum* y *Paracoccidioides brasiliensis*). También es eficaz frente a *Lichtheimia* spp., *Mucor* spp., *Rhizopus* spp. y especies sensibles de los géneros *Conidiobolus*, *Basidiobolus* y *Sporothrix*. Algunos hongos presentan resistencia clínica y/o elevadas concentraciones mínimas inhibitorias (CMI), como *Candida lusitanae*, *Candida guilliermondii*, *Candida lipolytica*, *Candida tropicalis*, *Trichosporon asahii*, *Pseudallescheria boydii*, *Pseudallescheria boydii* y *Fusarium* spp. ⁽⁹³⁾. Natamicina es eficaz frente *Candida* spp. y *Aspergillus* spp.

Azoles

Estos fármacos presentan actividad fungistática por inhibición de las enzimas oxidativas asociadas al citocromo P450 (CYP3A4 y CYP2C9), específicamente lanosterol 14- α desmetilasa, por lo que bloquea la conversión de lanosterol en ergosterol, provocando acumulación de los precursores, que resulta en un efecto tóxico para la célula fúngica ⁽²⁴⁾.

Con el desarrollo de los triazoles como fluconazol disminuyó ese efecto por ser más selectivo para la célula fúngica y menos tóxico para la célula humana. Este antifúngico ha sido el más utilizado, es activo frente a la mayoría de especies de *Candida* y otras levaduras (*C. neoformans*, *Trichosporon* spp.), hongos filamentosos (dermatofitos, *C. immitis* y otros hongos dimórficos). Sin embargo, *Candida krusei* presenta resistencia intrínseca a este antifúngico ^(23,32,99,137). Carece de actividad sobre hongos filamentosos como *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. y *Penicillium* spp.

Itraconazol es activo frente a *C. neoformans*, *C. immitis*, *P. brasiliensis*, *H. capsulatum*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium marneffe* y contra las especies de *Candida* resistentes a fluconazol. Este antifúngico no tiene actividad *in vitro* frente a hongos del orden mucoral y especies de *Fusarium* ^(3,24).

Los triazoles de segunda generación (voriconazol y posaconazol) poseen un espectro similar a los triazoles de primera generación (itraconazol y fluconazol). Diversos autores han demostrado que presentan buena actividad *in vitro* frente a *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Sporothrix schenckii*, *Penicillium marneffe*, *Aspergillus* spp., *Scedosporium* spp., *Histoplasma* spp., *Blastomyces* y *Coccidioides* spp. Sin embargo, la actividad *in vitro* ha sido variable frente a *Fusarium* spp. y nula frente a los mucorales ^(9,12,33,38,67,95,99).

Alilaminas

Terbinafina es un fármaco fungicida que actúa inhibiendo la síntesis de ergosterol al bloquear la enzima escualeno-epoxidasa, lo que provoca la disminución de este esteroide y el aumento de las concentraciones de escualeno, alterando la organización celular y el crecimiento del hongo.

Algunos autores han reportado la buena actividad frente a diversas especies de dermatofitos: *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum* spp., *Trichophyton* spp. y *Malassezia* spp. ^(65,93). Por estudios *in vitro* se ha observado que actúa frente a *Aspergillus* spp., *C. neoformans*, *Blastomyces* spp., *H. capsulatum*, *Scopulariopsis brevicaulis* y *Pneumocystis jirovecii* ⁽⁶⁵⁾. En el estudio *in vitro* realizado por Alastruey-Izquierdo y cols. en 2008 ⁽²⁾, el fármaco no mostró actividad frente a *Fusarium* spp. Por el contrario, Azor y cols. en 2009 ⁽¹²⁾, demostraron que terbinafina posee buena actividad contra las especies de *Fusarium*.

Amorolfina es una fenilepropilpiperidina que inhibe la síntesis de ergosterol, ejerce su acción bloqueando las enzimas 14 α -reductasa y la 7,8 δ -isomerasa. Posee actividad sobre *Candida* spp. y dermatofitos. Se utiliza para tratar las onicomicosis, como monoterapia tópica o combinación de procedimientos ⁽⁹³⁾.

- Antifúngicos que actúan sobre la pared celular.

La pared celular es una estructura esencial para los hongos, y su alteración tiene un fuerte impacto para la célula fúngica. Está compuesta por polisacáridos y proteínas. Entre los polisacáridos se encuentran la quitina, glucano, manano y galactomanano. El glucano es el componente más importante, ya que representa el 50-60% de la pared.

Equinocandinas

El mecanismo de acción de las equinocandinas se basa en la inhibición de la síntesis de los glucanos, uniéndose a la enzima 1,3- β -D-glucano sintetasa. Las alteraciones en la pared provocan la inestabilidad osmótica de las células fúngicas e impide sus funciones de crecimiento y replicación.

Por estudios *in vitro* e *in vivo* se demostró una potente actividad fungicida con caspofungina y anidulafungina frente a *Candida* spp y fungistática contra *Aspergillus* spp. Y nula actividad frente a *Cryptococcus* spp., *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. y mucorales ^(35, 103).

- Otros mecanismos.

El mecanismo de acción del bromuro de cetiltrimetilamonio frente a los hongos no está descrito, pero se sabe que tiene una excelente actividad bactericida, fungicida y algicida. En bacterias, actúa adsorbiéndose sobre la superficie celular, lo que ocasiona alteración de la permeabilidad de la membrana y la consecuente muerte celular ⁽¹⁰⁴⁾.

1.5 Resistencia a los antifúngicos.

La resistencia es un fenómeno que depende de varios factores que están relacionados con: a) el estado del paciente (enfermedad de base, estado inmunológico, lugar de la infección, presencia de dispositivos médicos), b) las características del antifúngico (dosis, farmacocinética, farmacodinamia) y c) el microorganismo (diversos factores de virulencia: adhesión, formación de biopelículas). La sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos no implica una efectividad clínica ^(70,83).

La resistencia se clasifica en dos tipos: clínica y microbiana. La resistencia clínica se define como la falta de acción de un fármaco para inhibir el desarrollo de un microorganismo en el foco de infección. La resistencia microbiana se define como la pérdida de la sensibilidad de un microorganismo a un antimicrobiano, se divide en ⁽⁷¹⁾.

-*Resistencia intrínseca o innata*. Es la que presenta todos los aislados de una misma especie y no está relacionada con la exposición previa al antifúngico.

-*Resistencia primaria*. Aquella que ocurre en especies de cualquier aislado normalmente sensible a un antifúngico; la resistencia aparece de forma espontánea sin haber estado en contacto previo con el antifúngico.

-*Resistencia secundaria o adquirida*. Es la que se desarrolla después de la exposición a los antifúngicos, que puede deberse a alteraciones fenotípicas o genotípicas.

1.5.1 Resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos.

El aumento en la incidencia de infecciones sistémicas causadas por hongos filamentosos como *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. y mucorales ha llevado a la administración prolongada de diversos antifúngicos para tratamiento profiláctico. Esta situación ha facilitado el desarrollo de resistencia a estos fármacos, aunque a diferencia de las bacterias, esta resistencia se ha desarrollado más lenta, debido a su tiempo de replicación.

En el caso de *Aspergillus* spp. se ha comprobado que algunos aislados muestran resistencia secundaria a itraconazol, generando a su vez resistencia cruzada a otros azoles, incluso con los triazoles de segunda generación. Algunos autores han demostrado que el uso de fluconazol es ineficaz en la profilaxis de las infecciones causadas por hongos filamentosos, sin embargo, puede generar este tipo de resistencia ⁽⁷¹⁾.

Por otro lado, las especies de *Fusarium* están involucradas en las infecciones invasivas y han mostrado multi-resistencia. La experiencia de algunos autores ha demostrado resistencia clínica a anfotericina B y resistencia intrínseca a itraconazol, anfotericina B y caspofungina ^(24,27,71).

La resistencia secundaria o adquirida puede generarse en pacientes con un tratamiento prolongado con azoles. Hof en 2001 ⁽⁵⁸⁾, reportó que los aislados de *Fusarium* spp. con resistencia generada en el ambiente persiste al infectar al paciente, esto debido al uso indiscriminado de azoles en la agricultura.

1.5.2 Mecanismos de resistencia.

En la última década se ha reportado algunos mecanismos que explican la resistencia de los hongos frente a los antifúngicos, principalmente en hongos levaduriformes. Éstos se describirán de acuerdo con el grupo de antifúngicos.

Polienos

La resistencia a la anfotericina B es poco común, debido a su tratamiento limitado; varias especies de *Candida*, *Cryptococcus neoformans* y algunos hongos filamentosos que han mostrado resistencia a este antifúngico. Tres son los mecanismos: 1) Disminución en los niveles de ergosterol en la membrana; 2) Aumento de los fosfolípidos que impide el paso del fármaco a los esteroides ⁽⁸³⁾. 3) Aumento en la actividad de la enzima catalasa, lo que lleva a una disminución del daño oxidativo intracelular demostrado en *Aspergillus terreus* ⁽³²⁾.

Azoles

Existen diversos mecanismos los cuales pueden actuar simultáneamente en una misma célula lo que explica la resistencia intrínseca y secundaria a los azoles. El mecanismo más común de resistencia es el secundario, dado por la reducción en los niveles intracelulares de estos antifúngicos, debido al aumento en la expresión de las bombas de flujo o transportadores, lo que resulta en un incremento en la expulsión del fármaco. Existen dos tipos de transportadores: ABC (*ATP binding cassette*), relacionado con la expulsión de la mayoría de azoles; y MSF (*major facilitators superfamily*), principalmente explica la resistencia a fluconazol ^(71, 83).

Otro mecanismo es por las mutaciones en el gen que codifica para la enzima 14 α -lanosterol-desmetilasa, disminuyendo la afinidad de los azoles por la enzima. Finalmente, la resistencia a los azoles en hongos filamentosos también podría estar producida por la amplificación genética o la sobreexpresión de la 14 α -lanosterol-desmetilasa ^(71, 83).

Equinocandinas

Los géneros con resistencia intrínseca como *Cryptococcus* spp., *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. y mucorales presentan 1-6 β glucano en su pared celular. Sin embargo, el mecanismo de resistencia a las equinocandinas sólo se ha descrito en *Candida*, en el cual se producen mutaciones en el gen FSK1, generando una glucano sintetasa menos sensible a este tipo de antifúngicos ^(32,103).

1.6 Pruebas de sensibilidad antifúngica.

Las pruebas de sensibilidad fueron desarrolladas por la resistencia clínica observada en los pacientes inmunosuprimidos que cursaban con infecciones fúngicas diseminadas, por la administración de un tratamiento antifúngico profiláctico y por el aumento de las infecciones por hongos emergentes. También con la finalidad de conocer el patrón de sensibilidad del fármaco contra los microorganismos y orientar al médico para ofrecer un tratamiento oportuno y eficaz.

Al principio estas pruebas eran poco reproducibles y mostraban inconsistencias debido a varios factores que influyeron en estos ensayos como el tamaño del inóculo, velocidad de crecimiento del microorganismo, período de incubación, naturaleza del medio utilizado y la estabilidad del antifúngico ^(107,114). En la actualidad, la mayoría de las técnicas de sensibilidad antifúngica *in vitro* están estandarizadas, principalmente para hongos levaduriformes. Dentro de éstas se encuentran: los métodos de difusión en disco y dilución en caldo (macro y micro) ⁽²⁸⁾. Otros comercializados: E-test[®], Sensitre[®] YeastOne (TREK *Diagnostic Systems*) y Vitek 2[®].

Las pruebas de sensibilidad antifúngica se recomienda realizarlas en los siguientes casos ^(42,137):

- Estudios epidemiológicos.
- Aislamientos de pacientes inmunosuprimidos que cursan con infección invasiva.
- Fallo terapéutico.
- Pacientes en profilaxis antifúngica.
- Aislamiento de una especie poco frecuente, se desconoce su perfil de sensibilidad o presenta alta resistencia a los antifúngicos.
- Valorar el perfil de sensibilidad frente a nuevos compuestos con actividad antifúngica.

1.6.1 Método de difusión en disco.

Este método fue estandarizado en 2003, por el CLSI (documento M44-P) y se publicó en 2004 como documento aprobado M44-A, para especies de *Candida*. Es una técnica de utilidad para antifúngicos hidrosolubles, como fluconazol y flucitosina. La difusión en disco se basa en la formación de un halo de inhibición dado por el antifúngico en un medio de cultivo sólido. Para facilitar la lectura y mejorar los límites de la zona de inhibición se emplea azul de metileno en la placa ^(20; 121; 137).

1.6.2 Métodos comercializados.

El método más utilizado es E-test®, el cual determina la sensibilidad de levaduras y hongos filamentosos frente a los diferentes antifúngicos, con una buena correlación con los métodos de microdilución (M27-A3 y M38-A2). Algunos autores consideran que es la técnica más adecuada para detectar la resistencia a *Candida* spp frente a anfotericina B y la resistencia de los hongos filamentosos a itraconazol ^(19,98). La Food and Drug Administration (FDA) aprobó la sensibilidad *in vitro* en *Candida* spp. frente a itraconazol y fluconazol ⁽¹²¹⁾.

Sensitre® YeastOne es otro método aprobado por la FDA, basado en la técnica de microdilución en caldo, cuenta con un sustrato cromogénico que facilita la lectura e interpretación de la CMI. Muestra correlación con el método estandarizado por la CLSI (93.7-97.9%) ⁽¹²¹⁾, para la evaluación de la sensibilidad en especies de *Candida* contra anfotericina B, flucitosina, fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol y caspofungina.

El método automatizado Vitek 2® (Biomerieux) utiliza lectura espectrofotométrica, diseñado sólo para levaduras y valora la CMI de algunos antifúngicos (flucitosina, FLZ, VRZ, AMB, CSF y micafungina). Muestra una alta reproducibilidad ^(121; 137).

1.6.3 Método de dilución en caldo.

El primer documento estándar internacional basado en este método fue publicado en 1992 por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), actualmente Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), el cual determinaba la sensibilidad a las levaduras (*Candida* spp. y *Cryptococcus neoformans*). Posteriormente se adaptó a un método de microdilución, el cual fue aprobado en 1997 (documento M27-A). En 2007, se describió el documento vigente (M27-A3). Con este método se mide la concentración mínima inhibitoria (CMI), la cual se define como la menor concentración del fármaco a la cual se reduce el crecimiento del hongo ^(28,114; 121; 137).

En Europa se desarrolló un método equivalente al estándar CLSI en levaduras no fermentadoras (documento Edef 7.1), aprobado por el European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Las diferencias en la metodología son: tiempo de incubación, tamaño del inóculo, el fondo de los pozos de la placa, la lectura y la concentración de glucosa en el medio RPMI 1640 ⁽¹²¹⁾.

1.6.4 Método de microdilución en caldo M38-A2.

En 1998, se publicó el primer documento M38-P para valorar la sensibilidad *in vitro* contra hongos filamentosos. En 2002, fue modificado a M38-A y actualmente el documento vigente es M38-A2 ⁽²⁹⁾, el cual es utilizado para hongos filamentosos formadores de conidios como son: *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Rhizopus* spp., *Pseudallesqueria boydii* y *Sporothrix schenckii* en la forma micelial ^(20; 121).

Una de las limitaciones más importantes que presenta este método es que aún no se han establecido los puntos de corte, también muestra problemas de crecimiento residual en antifúngicos con actividad fungistática (fenómeno “trailing”) ⁽¹²¹⁾.

1.7 Combinaciones antifúngicas *in vitro*.

Los métodos de combinación de antimicrobianos son utilizados generalmente *in vivo*, para tratar infecciones graves en pacientes inmunosuprimidos y/o para reducir la probabilidad de que el microorganismo desarrolle resistencia a los agentes antimicrobianos ⁽¹¹⁴⁾.

En la literatura se han descrito técnicas para evaluar las diversas combinaciones, principalmente contra bacterias, como: el tablero de ajedrez y las curvas de letalidad ^(19,36). En los hongos filamentosos aún no se ha descrito un método estandarizado basado en la asociación de antifúngicos *in vitro*.

Desde hace dos décadas se iniciaron los estudios de combinación de antifúngicos realizado principalmente en hongos levaduriformes, donde se han incluido diversas especies de *Candida* ⁽⁶³⁾ (Tabla 9).

Las lecturas de las pruebas *in vitro* sobre las interacciones de los antimicrobianos son interpretadas como sinergismo, antagonismo e indiferenciado. El primero es una interacción positiva y la combinación potencializa el efecto comparado con los fármacos de manera individual. Por el contrario, el antagonismo, al ser una interacción negativa, uno de los fármacos inhibe la actividad del otro, por lo que la combinación muestra un menor efecto que los fármacos de manera individual. También se puede presentar efecto indiferenciado, el cual indica que la combinación de los fármacos no tiene un efecto perjudicial sobre la respuesta, a pesar de que no son sinérgicos ⁽⁸¹⁾. La técnica más común empleada es la de tablero de ajedrez, la cual se basa en la adición del efecto de los fármacos en combinación ^(36,114).

1.7.1 Tablero de ajedrez.

La técnica de tablero de ajedrez es la más utilizada para probar la combinación de antimicrobianos *in vitro*, ya que es fácil de realizar e interpretar los resultados. El término es debido al patrón que se adopta en los diferentes métodos: en los tubos de ensaye (macrodilución), pozos de la microplaca (microdilución) o en las placas de agar; por la distribución de las diferentes diluciones de los dos antifúngicos probados (Fig. 9), cada cuadrado representa cada pozo o tubo, los cuales contienen solo una combinación de los fármacos. A pesar de que este método es empleado para valorar el efecto de las combinaciones de los antimicrobianos frente a las bacterias, puede ser modificado para otros microorganismos, en la técnica (macro o microdilución), en el medio de cultivo, en las concentraciones de las diluciones de los antimicrobianos y en el inóculo del microorganismo ⁽³⁶⁾.

En la Fig. 9 se ejemplifica como se distribuyen los fármacos en la placa de microdilución, la cual consiste en colocar en cada pozo 100 μ L del medio que contiene los antimicrobianos (50 μ L del fármaco A y 50 μ L del fármaco B). El inóculo se obtiene del crecimiento colonial de tres o cuatro días a 35°C y se coloca en un tubo que contiene solución salina al 0.85%, estéril, posteriormente, se realiza una dilución de 1:50 en RPMI 1640 y de esta suspensión se toman 100 μ L para llenar los pozos de la placa con las diferentes combinaciones de los fármacos. Las microplacas se incuban por 48 h a 35°C. Para cada aislado probado se realiza un control positivo (inóculo diluido) y control negativo (sólo RPMI) ⁽¹¹⁶⁾.

En la técnica de macrodilución se coloca en un tubo 0.5 mL del medio que contiene a los antimicrobianos (0.25 mL del fármaco A y 0.25 mL del B) y 0.5 mL de la suspensión que contiene al microorganismo, para obtener un volumen final de 1 mL para cada concentración de los antimicrobianos. La concentración del inóculo es de 2×10^5 UFC/mL, cuando se trata de bacterias. Los tubos se incuban a 35-37°C por 16 a 20 horas, posteriormente se realiza la lectura visual de las CMI ⁽³⁶⁾.

La determinación del efecto de las combinaciones se realiza calculando el índice de la concentración fraccionada inhibitoria (FICI), la cual se obtiene sumando las concentraciones fraccionadas inhibitorias (FIC's) de cada antimicrobiano presente en el tubo o pozo. La FIC es el resultado de la concentración necesaria del fármaco para inhibir el crecimiento del microorganismo en una fila o columna dada, por la CMI del fármaco solo, es decir, $FIC \text{ del fármaco A} = CMI \text{ del fármaco A en combinación} / CMI \text{ del fármaco solo}$, $FIC \text{ de B} = CMI \text{ del fármaco B en combinación} / CMI \text{ del fármaco B solo}$.

Por lo tanto el FICI= FIC del fármaco A+ FIC del fármaco B. Las lecturas obtenidas se comparan con los criterios establecidos: efecto sinérgico=valores de FICI<0.5; efecto antagonista=FICI>4; indiferente= 0.5<FICI<4 ^(36,90,134).

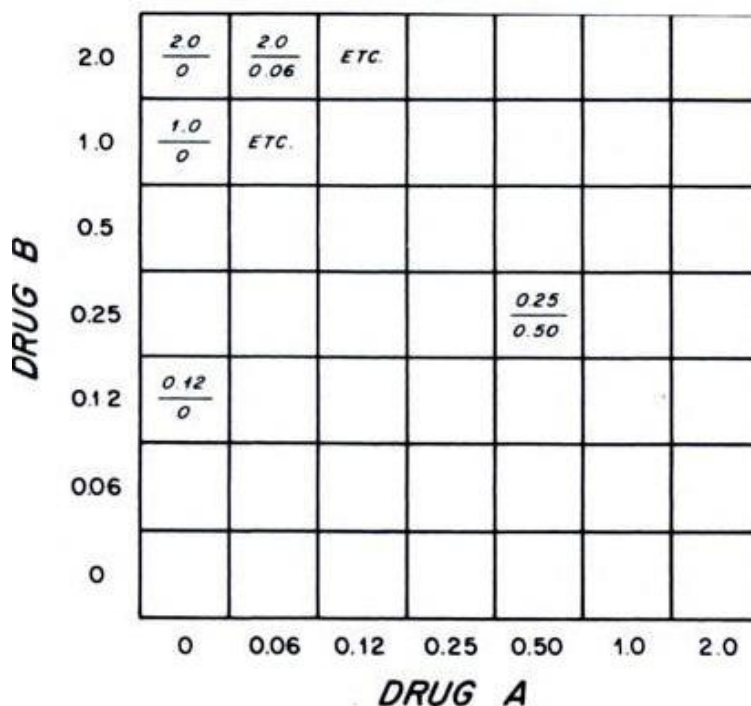


Figura 9. Técnica del tablero de ajedrez (Tomada de Eliopoulos y cols., 2003) ⁽³⁶⁾. Las concentraciones del fármaco A representan las columnas y el fármaco B las filas.

Otra técnica de asociación de antifúngicos es la de difusión en agar por el método E-test[®]. Consiste en la inoculación de las placas de agar RPMI con el aislado problema y después de que estén secas se colocan las tiras de los dos fármacos, primero la tira con el antifúngico A sobre la superficie de agar durante un periodo de una a tres horas, se retira y se aplica la tira del antifúngico B (Fig. 10), las placas se incuban por 48 h a 35°C. La lectura de las CMI se realiza a las 24 y 48 horas ⁽¹⁹⁾.

La interacción de los antifúngicos está definida por los criterios que recomiendan los fabricantes (AB Biodisk): a) Sinergismo=disminución de al menos 3 diluciones en la CMI de la combinación con respecto a la CMI individual del antifúngico. b) Antagonismo=aumento de la CMI tres diluciones o más. c) Efecto aditivo=descenso de dos diluciones. d) Efecto indiferente=disminución de la CMI de la combinación menos de dos diluciones ^(19;63,81).

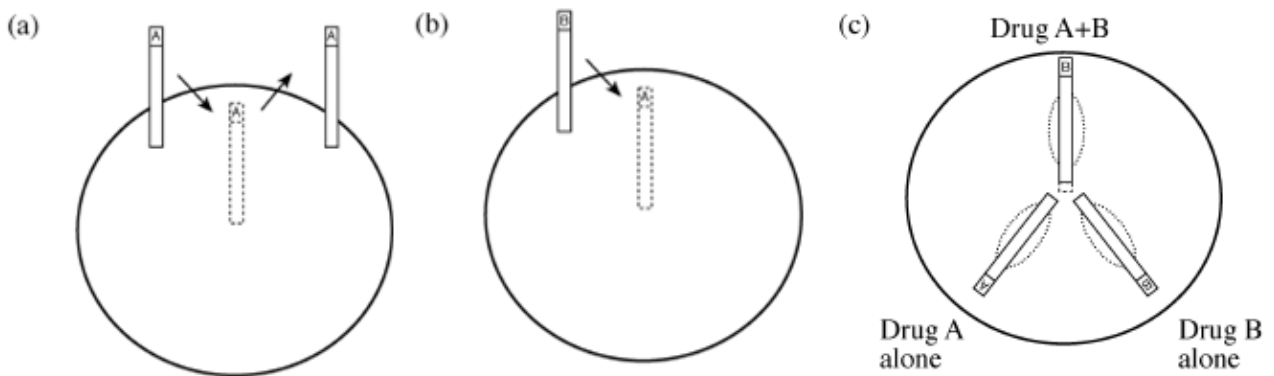


Figura 10. Técnica de combinación de antifúngicos por E-test® (Tomada de Lewis y cols., 2002) (63). (a) Tira de E-test® (fármaco A) colocada en el agar y después de 1-3 h se retira. (b) Tira de E-test® (fármaco B) se coloca en donde se encontraba la tira del antifúngico A. (c) Combinación de antifúngicos (A+B).

1.7.2 Curvas de letalidad.

La técnica de curva de letalidad mide la actividad antifúngica en función del tiempo y es capaz de detectar diferencias en la velocidad y grado de dicha actividad (36). En esta prueba se preparan las diferentes concentraciones del antifúngico realizando diluciones y para las combinaciones se agregan al medio en cantidades iguales (fármaco A+B). La suspensión del inóculo a una concentración de 5×10^5 UFC/mL, se agrega a las diferentes combinaciones. Durante el tiempo de incubación (24 a 48 horas) se toman muestras de las suspensiones y se subcultivan en un medio sólido para determinar las UFC (81,114).

Para realizar la interpretación de los resultados es necesario seguir los criterios que se muestran en Fig. 11: sinergismo= $a \geq 2 \log_{10}$ con disminución en el número de UFC/mL comparado con el fármaco más activo; antagonismo= $a \geq 2 \log_{10}$ aumentando el número de UFC/mL comparado con el fármaco menos activo; efecto aditivo= $a < 2$ y $> 1 \log_{10}$ incrementado el número de UFC/mL comparado con el fármaco más activo. El efecto indiferente= $a < 2$ y $> 1 \log_{10}$ aumentando el número de UFC/mL comparado con el fármaco menos activo (81).

La principal desventaja de esta técnica es que el número de combinaciones de antifúngicos es limitado, por las muestras que se tienen que tomar a cada cierto tiempo de los tubos conteniendo las diferentes combinaciones y el recuento de las colonias en las placas de agar (36).

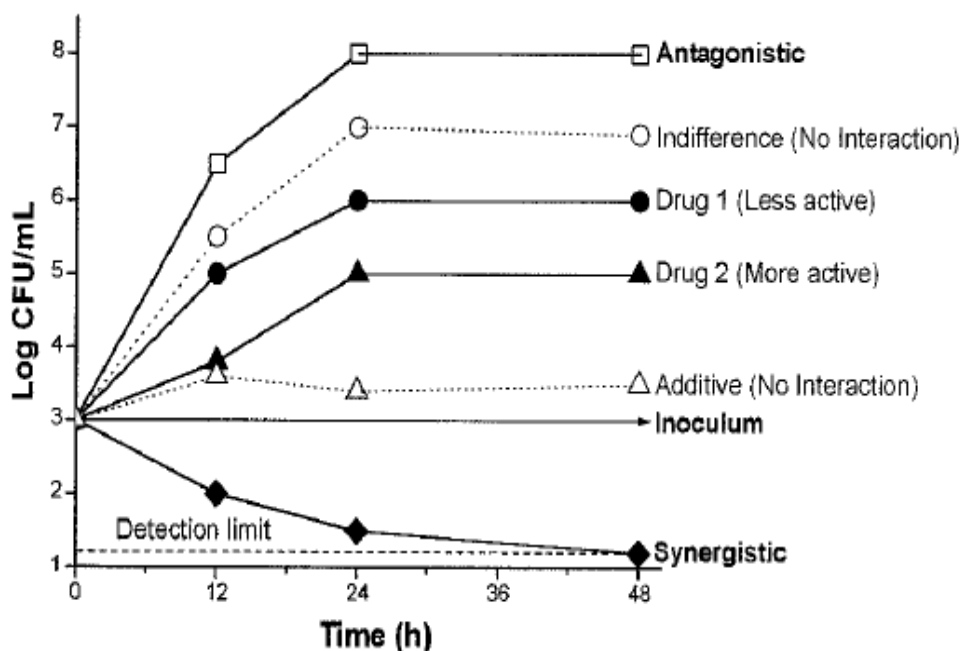


Figura 11. Técnica de curvas de letalidad. Criterios utilizados para la interpretación de los resultados (Tomada de Mukherjee y cols., 2005) ⁽⁸¹⁾.

En la tabla 9 se muestra la serie de estudios realizados en los que emplearon diversas combinaciones de antifúngicos con resultados variables. La respuesta sinérgica se obtuvo con las combinaciones de AMB y CSF; AMB y ANF contra algunas de las especies de *Candida* y *Cryptococcus* del 33.3-100% y del 22.2-100%, respectivamente ^(41,123). El efecto sinérgico de fármacos como MGCD290 (inhibidor de histona desacetilasa (HDAC)) y FLZ sobre los hongos levaduriformes del 37-86% y en filamentosos del 20-66%. Otra de las combinaciones usadas sobre hongos filamentosos fue MGCD290 y PSZ, el efecto sinérgico fue del 33-100% ⁽¹⁰¹⁾. La combinación de CSF y VRZ, CSF y AMB mostraron un efecto sinérgico del 100% contra *Aspergillus terreus* y *Fusarium oxysporum*, respectivamente ^(10,94).

Tabla 9. Estudios de combinación de antifúngicos realizado en diversos hongos levaduriformes y filamentosos.

Antifúngicos	Técnica	Hongos	Efecto (%)			Referencia
			S	A	I	
AMB+FLZ	Modelo animal (ratones)	<i>Candida albicans</i>	-	-	100	Sugar y cols., 1995 (119).
AMB+FLZ	Tablero de ajedrez E-test®	<i>Candida spp.</i>	16.6 -	- 50.0	83.3 50.0	Lewis y cols., 2002 (63).
VRZ+ flucitosina (FC) AMB+FC VRZ+AMB VRZ+FLZ VRZ+ micafungina (MCF)	No especificado	<i>Candida spp.</i>	50.0 40.0 - - 17.0	- - - - -	50.0 60.0 100 100 83.0	Mukherjee y cols., 2005 (81).
AMB+PSZ AMB+CSF AMB+VRZ PSZ+CSF PSZ+VRZ VRZ+CSF	Tablero de ajedrez	<i>Candida krusei</i>	12.5 - - 12.5 - -	- - - - - -	87.5 100 100 87.5 100 100	Chaturvedi y cols., 2005 (26).
AMB+ANF	Tablero de ajedrez	<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. guilliermondii</i> <i>C. krusei</i> <i>C. lusitaniae</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. tropicalis</i>	35.7 62.5 100 50.0 - 33.3 50.0	21.4 - - - - - -	42.8 37.5 - 50.0 100 66.6 50.0	Teixeira-Santos y cols., 2012 (123).
FCZ+FC	Tablero de ajedrez	<i>Cryptococcus neoformans</i>	67.4	-	32.6	Nguyen y cols., 1995 (86).
AMB+CSF FLZ+CSF	Tablero de ajedrez	<i>Cryptococcus neoformans</i>	100 22.2	- -	- 77.7	Franzot & Casadevall, 1997 (41).
ITZ+ FC	Curvas de letalidad	<i>Cryptococcus neoformans</i>	62.5	-	37.5	Barchiesi y cols., 1999 (14).
AMB+FLZ AMB+ITZ AMB+PSZ	Tablero de ajedrez	<i>Cryptococcus neoformans</i>	6.6 6.6 33.3	- - -	93.3 93.3 66.6	Barchiesi y cols., 2000 (15).

Antifúngicos	Técnica	Hongos	Efecto (%)			Referencia
			S	A	I	
PSZ+ FC	Tablero de ajedrez	<i>Cryptococcus neoformans</i>	33.3	-	66.6	Barchiesi y cols., 2001 ⁽¹⁶⁾
VRZ+MCF	Tablero de ajedrez	<i>Candida</i> spp.	3.1	-	96.9	Heyn y cols., 2005 ⁽⁵⁵⁾
		<i>Aspergillus</i> spp.	65.9	-	34.1	
		<i>Scedosporium</i> spp.	50.0	-	50.0	
		<i>Fusarium solani</i>	-	-	100	
MGCD290 (inhibidor de HDAC) + FLZ	Tablero de ajedrez	<i>Candida</i> spp.	86.7	13.3	-	Pfaller y cols., 2009 ⁽¹⁰¹⁾
		<i>C. neoformans</i>	50.0	50.0	-	
		<i>Rhodotorula</i> spp.	37.5	62.5	-	
		<i>Trichosporon</i> spp.	40.0	40.0	20.0	
		<i>Aspergillus</i> spp.	60.0	40.0	-	
		<i>Mucor</i> spp.	20.0	80.0	-	
		<i>Rhizopus</i> spp.	50.0	50.0	-	
		<i>Fusarium</i> spp.	66.6	33.3	-	
		<i>Scedosporium apiospermum</i>	60.0	40.0	-	
MGCD290 + PSZ	Tablero de ajedrez	<i>Candida</i> spp.	60.0	40.0	-	Pfaller y cols., 2009 ⁽¹⁰¹⁾
		<i>C. neoformans</i>	30.0	70.0	-	
		<i>Rhodotorula</i> spp.	25.0	75.0	-	
		<i>Trichosporon</i> spp.	20.0	60.0	20.0	
		<i>Aspergillus</i> spp.	40.0	60.0	-	
		<i>Mucor</i> spp.	100	-	-	
		<i>Rhizopus</i> spp.	90.0	10.0	-	
		<i>Fusarium</i> spp.	33.3	66.6	-	
		<i>Scedosporium apiospermum</i>	40.0	60.0	-	
MGCD290 + VCZ	Tablero de ajedrez	<i>Candida</i> spp.	46.7	53.3	-	Pfaller y cols., 2009 ⁽¹⁰¹⁾
		<i>C. neoformans</i>	40.0	60.0	-	
		<i>Rhodotorula</i> spp.	50.0	50.0	-	
		<i>Trichosporon</i> spp.	20.0	20.0	60.0	
		<i>Aspergillus</i> spp.	50.0	50.0	-	
		<i>Mucor</i> spp.	40.0	60.0	-	
		<i>Rhizopus</i> spp.	90.0	10.0	-	
		<i>Fusarium</i> spp.	75.0	25.0	-	
		<i>Scedosporium apiospermum</i>	60.0	40.0	-	
Ciclopirox+TRB	Tablero de ajedrez	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	83.3	16.6	-	Gupta & Kohli, 2003 ⁽⁵⁰⁾
		<i>Aspergillus sydowii</i>	16.6	-	83.3	
		<i>Onychocola canadensis</i>	20.0	40.0	40.0	
		<i>Scytalidium dimidiatum</i>	40.0	40.0	20.0	
		<i>Fusarium solani</i>	25.0	25.0	50.0	
		<i>F. proliferatum</i>	-	100	-	

Antifúngicos	Técnica	Hongos	Efecto (%)			Referencia
			S	A	I	
Ciclopirox+ITZ	Tablero de ajedrez	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	-	-	100	Gupta & Kohli, 2003 ⁽⁵⁰⁾ .
		<i>Aspergillus sydowii</i>	-	100	-	
		<i>Onychocola canadensis</i>	40.0	40.0	20.0	
		<i>Scytalidium dimidiatum</i>	40.0	-	60.0	
		<i>Fusarium solani</i>	25.0	-	75.0	
		<i>Fusarium proliferatum</i>	-	-	100	
CSF+AMB	Tablero de ajedrez	<i>Aspergillus flavus</i>	25.0	-	75.0	Arikan y cols., 2002 ⁽¹⁰⁾ .
		<i>A. fumigatus</i>	25.0	-	75.0	
		<i>A. niger</i>	-	-	100	
		<i>A. terreus</i>	33.3	-	66.6	
TRB+ITZ TRB+FLZ TRB+AMB TRB+FC	Tablero de ajedrez	<i>Aspergillus</i> spp.	77.7	-	22.2	Mosquera y cols., 2002 ⁽⁸⁰⁾ .
66.6			-	33.3		
-			62.5	37.5		
-			25.0	75.0		
CSF+VRZ	Tablero de ajedrez	<i>Aspergillus flavus</i>	100	-	-	Perea y cols., 2002 ⁽⁹⁴⁾ .
		<i>A. niger</i>	40.0	-	60.0	
		<i>A. terreus</i>	100	-	-	
		<i>A. fumigatus</i>	87.5	-	12.5	
AMB+ITZ AMB+TRB ITZ+TRB	Tablero de ajedrez	<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	100	-	Te Dorsthorst y cols., 2002 ⁽¹²²⁾ .
-			100	-		
100			-	-		
FLZ+VRZ CSF+FC	No especificado (NE)	<i>Aspergillus</i> spp.	40.0	-	60.0	Mukherjee y cols., 2005 ⁽⁸¹⁾ .
	92.0		NE	NE		
CSF+tacrolimus (FK-506) CSF+ciclosporina (CY) VRZ+FK-506 VRZ+ CY	Tablero de ajedrez	<i>Aspergillus fumigatus</i>	87.5	-	12.5	Steinbach y cols., 2004 ⁽¹¹⁷⁾ .
37.5			-	62.5		
-			50.0	50.0		
-			12.5	87.5		
AMB+TRB	Modelo animal (conejos)	<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	-	100	Kirkpatrick y cols., 2005 ⁽⁶²⁾ .
ANF+ITZ ANF+VRZ ANF+AMB	Tablero de ajedrez	<i>Aspergillus</i> spp.	69.2	3.8	26.9	Philip y cols., 2005 ⁽¹⁰²⁾ .
69.2			30.7	-		
19.2			19.2	61.5		

Antifúngicos	Técnica	Hongos	Efecto (%)			Referencia
			S	A	I	
AMB+VRZ AMB+PSZ AMB+CSF TRB+ITZ TRB+VRZ ITZ+CSF PSZ+CSF	Tablero de ajedrez	<i>Scedosporium apiospermum</i>	16.6 16.6 16.6 33.3 - 100 66.6	- - - - - -	83.3 83.3 83.3 66.6 100 - 33.3	Cuenca- Estrella y cols., 2008 (31)
AMB+VRZ AMB+PSZ AMB+CSF TRB+ITZ TRB+VRZ ITZ+CSF PSZ+CSF	Tablero de ajedrez	<i>Scedosporium prolificans</i>	16.6 - - - 25.0 - -	- - - - - - -	83.3 100 100 100 75.0 100 100	Cuenca- Estrella y cols., 2008 (31)
AMB+ rifampicina (RIF) AMB+FC	Tablero de ajedrez	<i>Fusarium solani</i>	20.0 20.0	- -	80.0 80.0	Guarro y cols., 1999 (49)
CSF+AMB	Tablero de ajedrez	<i>Fusarium solani F. oxysporum</i>	50.0 100	- -	50.0 -	Arikan y cols., 2002 (10)
ANF+ITZ ANF+VRZ ANF+AMB	Tablero de ajedrez	<i>Fusarium spp.</i>	- - -	- - -	100 100 100	Philip y cols., 2005 (102)
AMB+ azitromicina(AZM) AMB+ciprofloxacino(CIP) AMB+RIF AMB+Metronidazol(MTZ) AMB+Ibuprofeno (IBP) AMB+fluvastatina(FVS)	Tablero de ajedrez	<i>Fusarium spp.</i>	26.1 39.1 34.8 34.8 43.5 34.8	- - - - - -	73.9 60.9 65.2 65.2 56.5 65.2	Venturini y cols., 2011 (132)
VRZ+AZM VRZ+CIP VRZ+RIF VRZ+MTZ VRZ+IBP VRZ+FVS	Tablero de ajedrez	<i>Fusarium spp.</i>	21.7 30.4 NE 30.4 21.7 13.0	- - NE - - -	78.3 69.6 NE 69.6 78.3 87.0	Venturini y cols., 2011 (132)
VRZ+TRB VRZ+ITZ VRZ+FLZ VRZ+KTZ ITZ+TRB ITZ+FC	Tablero de ajedrez	<i>Fusarium spp.</i>	100 20.0 - - 60.0 20.0	- - - - - 20.0	- 80.0 100 100 40.0 60.0	Spader y cols., 2013 (116)

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las infecciones fúngicas causadas por hongos filamentosos emergentes como las especies de *Fusarium* han presentado un aumento en los pacientes con múltiples factores de riesgo, aunado a la deficiente respuesta al tratamiento antifúngico administrado y al incremento de las especies fúngicas resistentes detectadas mediante pruebas de sensibilidad antifúngica *in vitro*. Estos son factores que inquietaron a diversos investigadores clínicos e iniciaron tratamiento con la combinación de antifúngicos basados en los diferentes mecanismos de acción, los resultados fueron variables debido a la multi-resistencia observada en algunos microorganismos, de tal manera que se iniciaron estudios de técnicas que involucran la combinación de antifúngicos para optimizar el tratamiento de los pacientes que presentaron estas infecciones.

Una de las técnicas utilizadas comúnmente ha sido por el tablero de ajedrez por la facilidad de realizar los cálculos e interpretar los resultados; en algunos casos con buena correlación clínica y de laboratorio.

En México se tiene limitación para la realización de pruebas de sensibilidad antifúngica en hongos filamentosos como *Fusarium* spp., es común que se presente dificultad para establecer el tratamiento antifúngico más adecuado. Por las pruebas preliminares de sensibilidad por microdilución en caldo en especies de *Fusarium*, se obtuvieron valores altos de CMI frente a los diferentes antifúngicos probados. Por tal motivo se diseñó la combinación de antifúngicos para valorar su actividad con el fin de encontrar la combinación o interacción con efecto sinérgico y que inhiba el crecimiento del hongo causante de micosis. Este hallazgo podría significar una orientación para el médico clínico para el establecimiento del tratamiento más oportuno y adecuado.

III. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Conocer el efecto de la combinación de diversos antifúngicos sobre aislados clínicos de *Fusarium* spp.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar los aislados clínicos de *Fusarium* por las características morfológicas.
- Determinar la actividad *in vitro* de anfotericina B, caspofungina, anidulafungina, fluconazol, itraconazol, ketoconazol, voriconazol, posaconazol, natamicina, terbinafina, amorolfina y bromuro de cetrimonio, contra aislados clínicos de *Fusarium* spp.
- Conocer el índice de la concentración fraccionada inhibitoria en las diversas combinaciones de antifúngicos contra los aislados clínicos de *Fusarium* spp.
- Valorar la actividad de las diversas combinaciones de antifúngicos frente a aislados clínicos de *Fusarium* spp.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio prospectivo, transversal en siete aislados clínicos de *Fusarium* spp. obtenidos de pacientes con queratitis, onicomicosis, fungemia y micetoma. En la tabla 10 se muestra la procedencia de los aislados incluidos en el presente trabajo. El estudio se desarrolló en tres etapas: 1) identificación de las especies de *Fusarium*, por medio de sus características macroscópicas y microscópicas. 2) Estudio de sensibilidad a los antifúngicos por la técnica de microdilución en caldo, documento M38-A2 del CLSI ⁽²⁹⁾. 3) La combinación de los antifúngicos empleando la microdilución en caldo por la técnica de tablero de ajedrez ^(36,116).

Tabla 10. Especies de *Fusarium* y su procedencia.

Clave	Servicio médico	Diagnóstico
FS1	Inst. Nac. Neurología	Fungemia
FS2	León, Guanajuato	Micetoma
FS3	CMN, IMSS	Queratitis
FS4	CMN, IMSS	Queratitis
FS5	Hosp. de la ceguera	Queratitis
FS6	Hosp. de la ceguera	Queratitis
FS7	Fac. Medicina	Onicomicosis

4.1 Identificación de especies.

La identificación se efectuó por macro y micromorfología, excepto la muestra proveniente de un paciente con micetoma (FS2), la cual se identificó como *F. subglutinans* previamente por morfología y por la amplificación del fragmento D1/D2 por PCR y secuenciación ⁽¹⁸⁾. Los medios utilizados fueron agar dextrosa Sabouraud (ADS), agar papa dextrosa (APD), agar extracto de malta (AEM) y agar avena (AA).

Cultivos monocelulares. Para obtener este cultivo el procesamiento de la muestra se realizó de la siguiente manera: todos los aislados clínicos se inocularon en ADS, se incubaron a 28°C durante cinco días. Para estimular la producción de conidios se sembraron en tubos conteniendo AA, se incubaron a 28°C por cinco días.

Inóculo. A los tubos con crecimiento en AA de cada uno de los aislados, se adicionó 1 mL de solución salina estéril al 0.85%, con un asa previamente esterilizada se rozó el micelio aéreo para poder desprender los conidios de las hifas, esta suspensión se transfirió a un tubo de poliestireno de 5 mL estéril (Fig.12).

Posteriormente para obtener la concentración del inóculo ($10^5 \mu\text{g/mL}$), se contaron con la cámara de Neubauer el número de conidios de la suspensión (Fig 13). En el centro de la caja de cada medio de cultivo (ADS, APD, AEM y AA), se colocó $2 \mu\text{L}$ de la suspensión para observar la macromorfología, se incubaron a 28°C por siete días. La revisión de las placas de agar se realizó cada 24 h describiendo el aspecto, el diámetro de crecimiento, color y producción de pigmento de las colonias (Fig. 12).

Para el estudio de las características microscópicas se hicieron microcultivos de cada aislado en los cuatro medios, depositando $1 \mu\text{L}$ de la suspensión en cada vértice del cuadrado de agar, se colocó un cubreobjetos estéril y se incubaron a 28°C durante siete días. Pasado ese tiempo se retiró el cubreobjetos con una pinza de disección y se colocó sobre un portaobjetos que contenía una gota de azul de lactofenol o azul de algodón. Todas las preparaciones se observaron en el microscopio y se llevó un registro fotográfico.

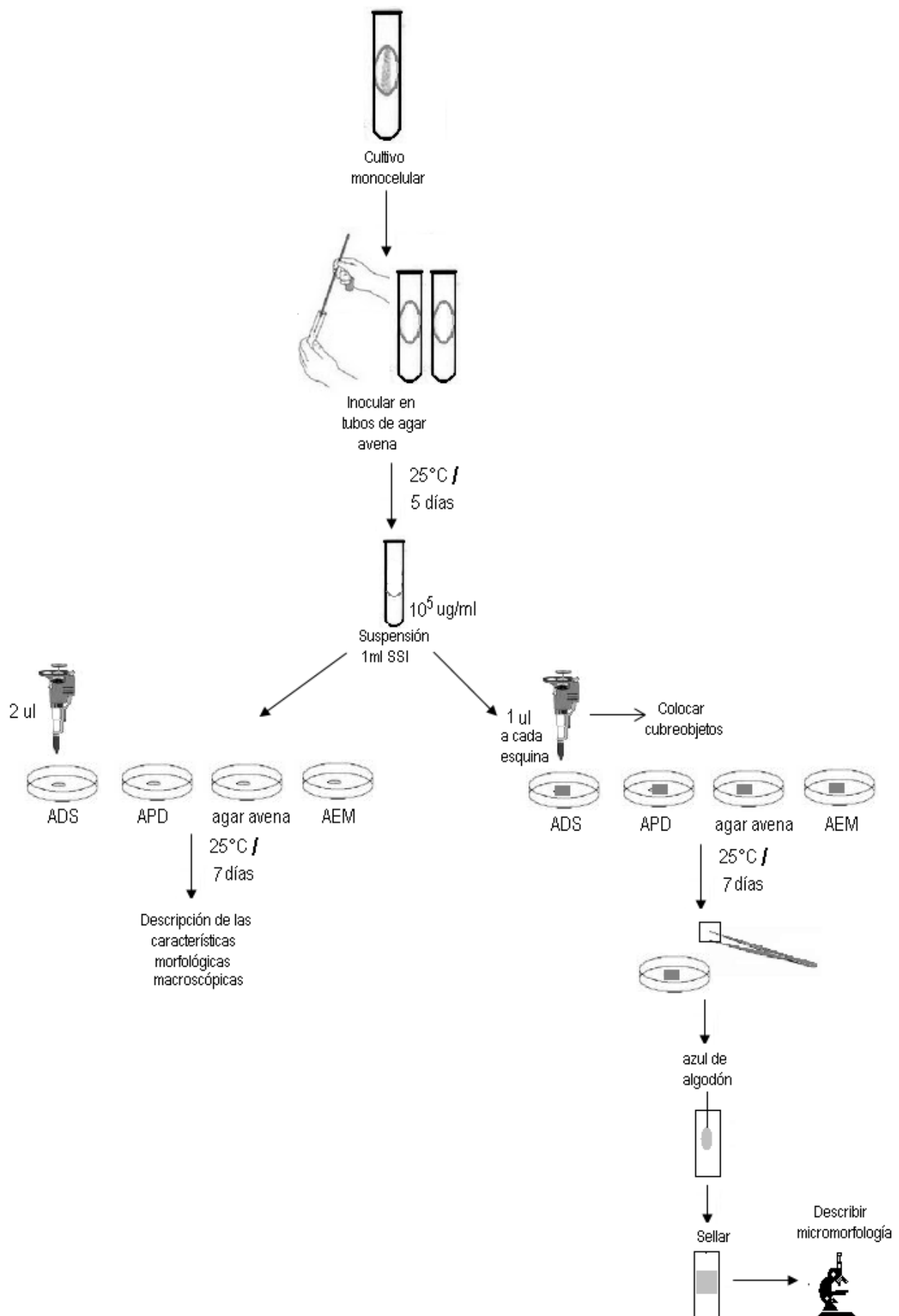


Figura 12. Organigrama del procedimiento para la identificación de *Fusarium* spp.

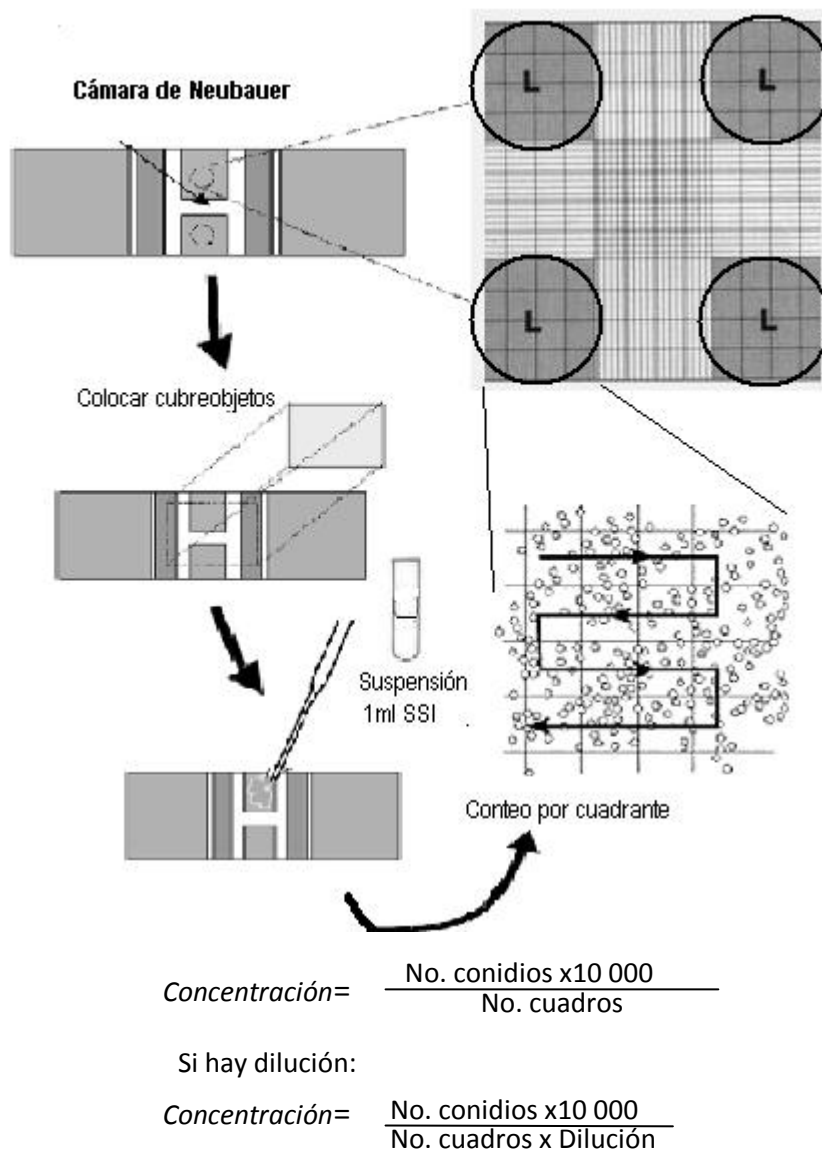


Figura 13. Obtención de la concentración de conidios por conteo con cámara de Neubauer.

4.2 Estudio de sensibilidad a los antifúngicos.

La técnica de microdilución en caldo realizada se basó en el método descrito por el CLSI, que corresponde al documento M38-A2 para hongos filamentosos (CLSI, 2008). Los antifúngicos empleados fueron: anfotericina B (AMB), caspofungina (CSF), anidulafungina (ANF), fluconazol (FLZ), itraconazol (ITZ), ketoconazol (KTZ), voriconazol (VRZ), posaconazol (PSZ), natamicina (NTC), terbinafina (TRB), amorolfina (AMR) y bromuro de cetrimonio (CTR).

4.2.1 Preparación de la solución madre de antifúngico.

La solución madre se preparó pesando la cantidad del antifúngico para obtener la concentración más alta a ensayar y se disolvió en 10 mL de agua ultrapura (milli-Q®) (MQ) para los antifúngicos hidrosolubles, FLZ, CSF, CTR, AMR. Y para los antifúngicos insolubles AMB, ANF, ITZ, KTZ, PSZ, VRZ, TRB y NTM, se utilizó como solvente dimetil sulfóxido (DMSO). Posteriormente se esterilizó por filtración con unidades filtro de 0.02 μm y se distribuyeron en alícuotas de 500 μL , conservadas a -20°C hasta su uso. Las concentraciones de cada uno de los antifúngicos se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Concentraciones de cada uno de los antifúngicos.

Antifúngico soluble en agua	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)
AMR	0.03-16.0
CSF	0.03-16.0
CTR	0.03-16.0
FLZ	0.125-64.0
Antifúngico insoluble en agua	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)
AMB	0.03-16.0
ANF	0.06-32.0
ITZ	0.03-16.0
KTZ	0.03-16.0
NTM	0.06-32.0
PSZ	0.03-16.0
TRB	0.03-16.0
VRZ	0.03-16.0

4.2.2 Preparación de las placas con el antifúngico.

A partir de la solución madre se preparó la serie de diluciones utilizando como diluyente RPMI 1640 para el caso de los antifúngicos solubles en agua y DMSO para los insolubles. En la Fig. 14 se muestra cómo se realizó las diluciones para los antifúngicos AMR, CSF, CTR y FLZ. Y en la Fig. 15 para AMB, ANF, ITZ, KTZ, NTM, PSZ, TRB y VRZ.

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, como se muestra en la Fig. 16 y 18. Las concentraciones resultantes de las diluciones se presentan en la tabla 12.

En cada pozo de la placa se colocaron 100 μL de las diluciones decrecientes correspondientes a los tubos de la Fig. 16, distribuidos de la columna 1 a la 10. Para los antifúngicos solubles los pozos de la columna 11, la cual correspondió al control de crecimiento (CC), se llenaron con 100 μL de RPMI. En el caso de que el antifúngico fuera insoluble en agua, se llenó con 100 μL de una solución de RPMI con 2% de DMSO.

La columna 12 correspondió al control de esterilidad (CE), cada uno de los pozos se llenaron con 100 μ L de RPMI (Fig. 17 y 18). Se conservaron a -20°C hasta su uso.

Tabla 12. Concentraciones de las diluciones.

Tubo	Concentración (μ g/mL)		
	FLZ	ANF, NTM	OTROS
1	64.0	32.0	16.0
2	32.0	16.0	8.0
3	16.0	8.0	4.0
4	8.0	4.0	2.0
5	4.0	2.0	1.0
6	2.0	1.0	0.5
7	1.0	0.5	0.25
8	0.5	0.25	0.125
9	0.25	0.125	0.06
10	0.125	0.06	0.03

4.2.3 Preparación del inóculo.

El inóculo se obtuvo a partir de un cultivo monocelular de cinco días de crecimiento a 28°C en tubos de ensaye conteniendo AA. Se colocó 1 mL de solución salina 0.85% estéril y con una asa previamente esterilizada se tocó el micelio aéreo para desprender los conidios, la suspensión resultante se transfirió a un tubo de poliestireno de 5 mL. Para calcular la concentración de conidios (10^5 UFC/mL) de la suspensión se realizó un conteo de los conidios con la cámara de Neubauer (Fig. 13).

4.2.4 Inoculación de placas.

Los pozos de las filas A a la H se llenaron con 100 μ L del inóculo, de cada uno de los aislados; por ejemplo, la fila A, contenía la muestra denominada FS1, la fila B correspondía a FS2 y así sucesivamente. La columna 12 fue el control de esterilidad, por lo que sólo se agregó 100 μ L de RPMI. Las placas se incubaron a 35°C por 48h.

4.2.5 Lectura e interpretación de los resultados.

La lectura se realizó a las 24 y 48 horas, se efectuó de forma visual utilizando un espejo invertido, comparando la turbidez con los pozos del control de esterilidad, para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), es decir la concentración más baja que produjo una inhibición en el crecimiento. Para anfotericina B y cetrimonio, el porcentaje de inhibición considerado fue del 100%. Para los azoles y terbinafina, la CMI fue del 80%.

Aún el CLSI no ha establecido los puntos de corte para los hongos filamentosos; sin embargo, los diversos estudios de colaboración han asignado puntos de corte para algunos antifúngicos (ITZ, PSZ, VRZ, AMB y CSF) contra algunos hongos filamentosos (Tabla 13).

Tabla 13. Puntos de corte (CMI $\mu\text{g/mL}$) para cinco antifúngicos contra diversos hongos filamentosos ⁽²⁹⁾.

Hongo	ITZ		PSZ		VRZ		AMB		CSF	
	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R
<i>Aspergillus</i> spp.	≤ 1	≥ 4	≤ 1	≥ 4	≤ 1	≥ 4	-	≥ 4	≤ 1	≥ 4
<i>Scedosporium apiospermum</i>	-	≥ 4	≤ 1	≥ 4	≤ 1	≥ 4	-	≥ 4	-	≥ 4
<i>Paecilomyces lilaceum</i>	-	≥ 4	≤ 1	≥ 4	≤ 1	≥ 4	-	≥ 4	-	≥ 4
<i>Alternaria</i> spp.	-	≥ 4	≤ 1	≥ 4	≤ 1	≥ 4	-	≥ 4	-	≥ 4
<i>Bipolaris spicifera</i>	≤ 1	≥ 4	≤ 1	≥ 4	≤ 1	≥ 4	-	≥ 4	-	≥ 4

Sensible: ≤ 1 $\mu\text{g/mL}$, Intermedio: 2 $\mu\text{g/mL}$; Resistente: ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$

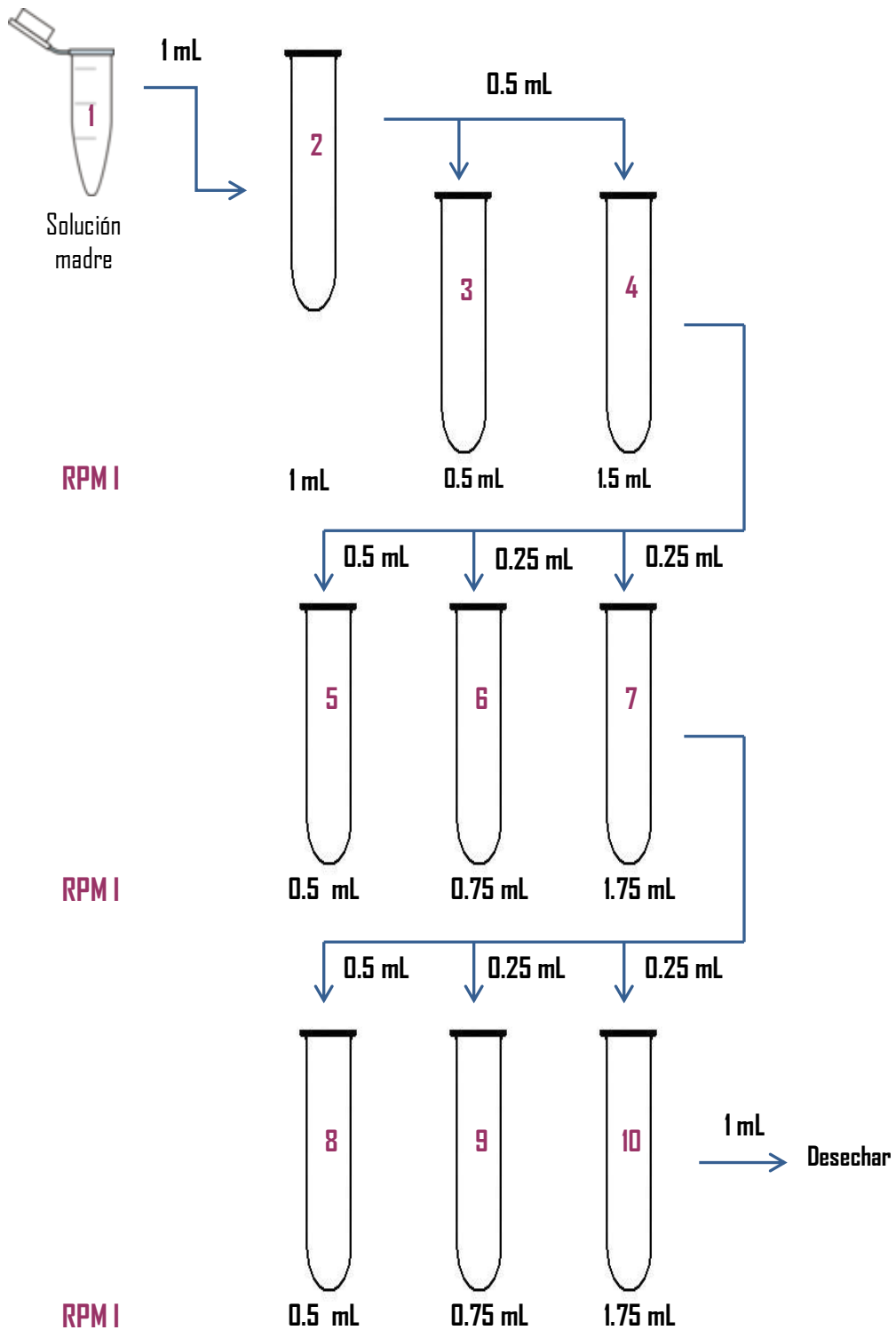


Figura 14. Esquema de diluciones para antifúngicos solubles en agua.

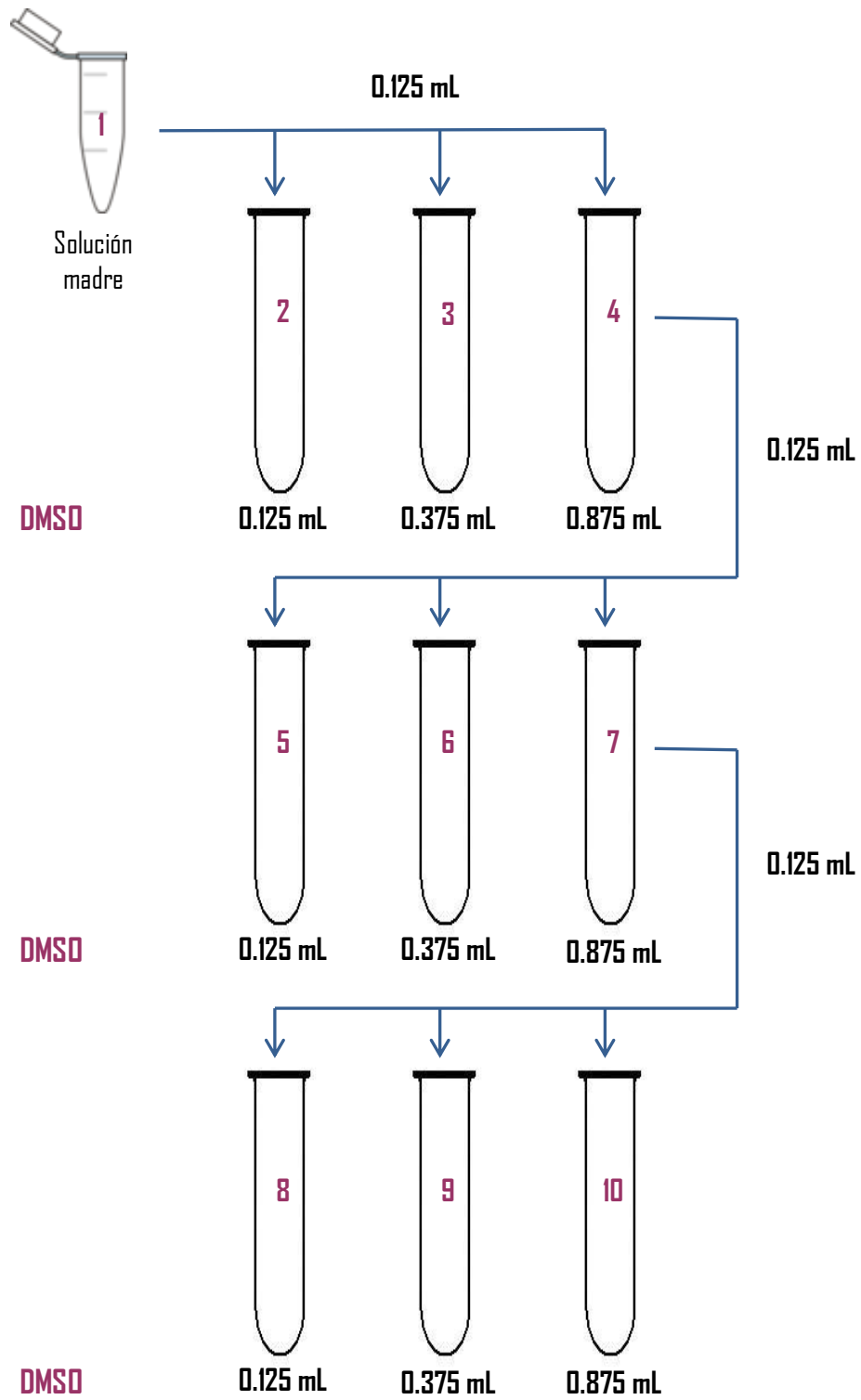


Figura 15. Esquema de diluciones para los antifúngicos insolubles en agua.

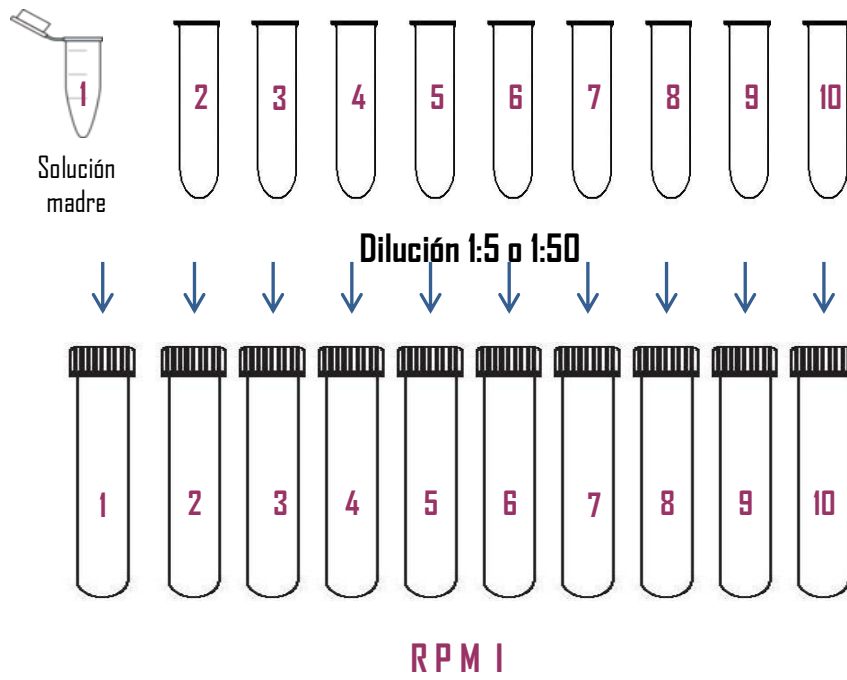


Figura 16. Dilución 1:5 para antifúngicos hidrosolubles. Dilución 1:50 para antifúngicos insolubles.

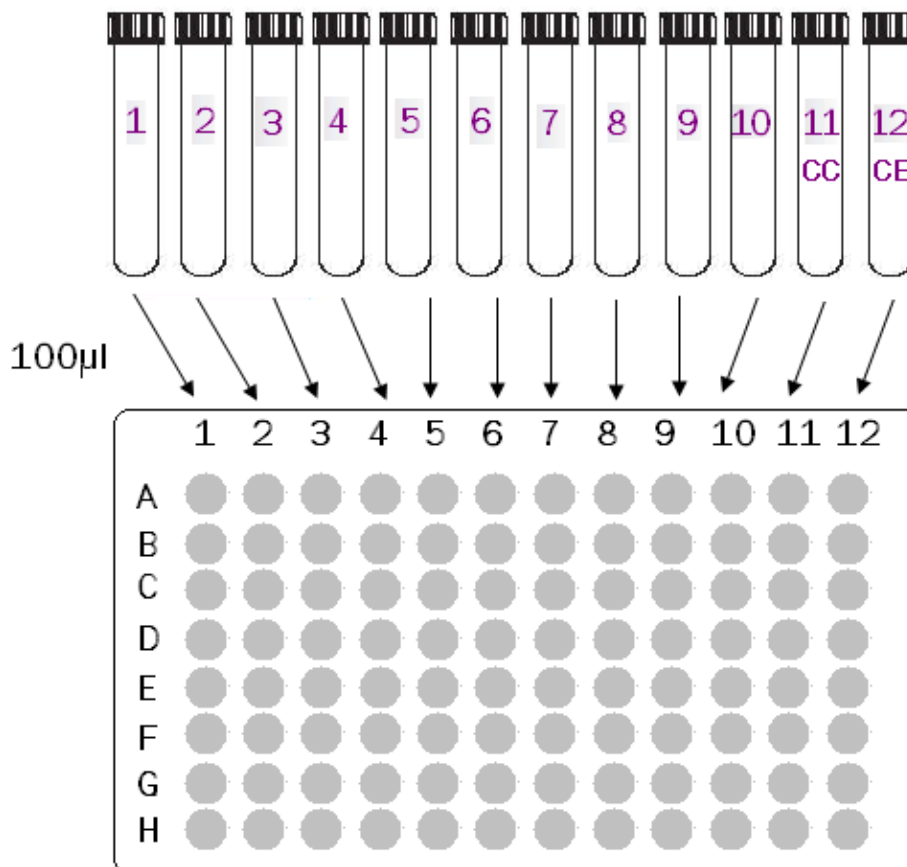


Figura 17. Llenado de placas de microdilución de 96 pozos.

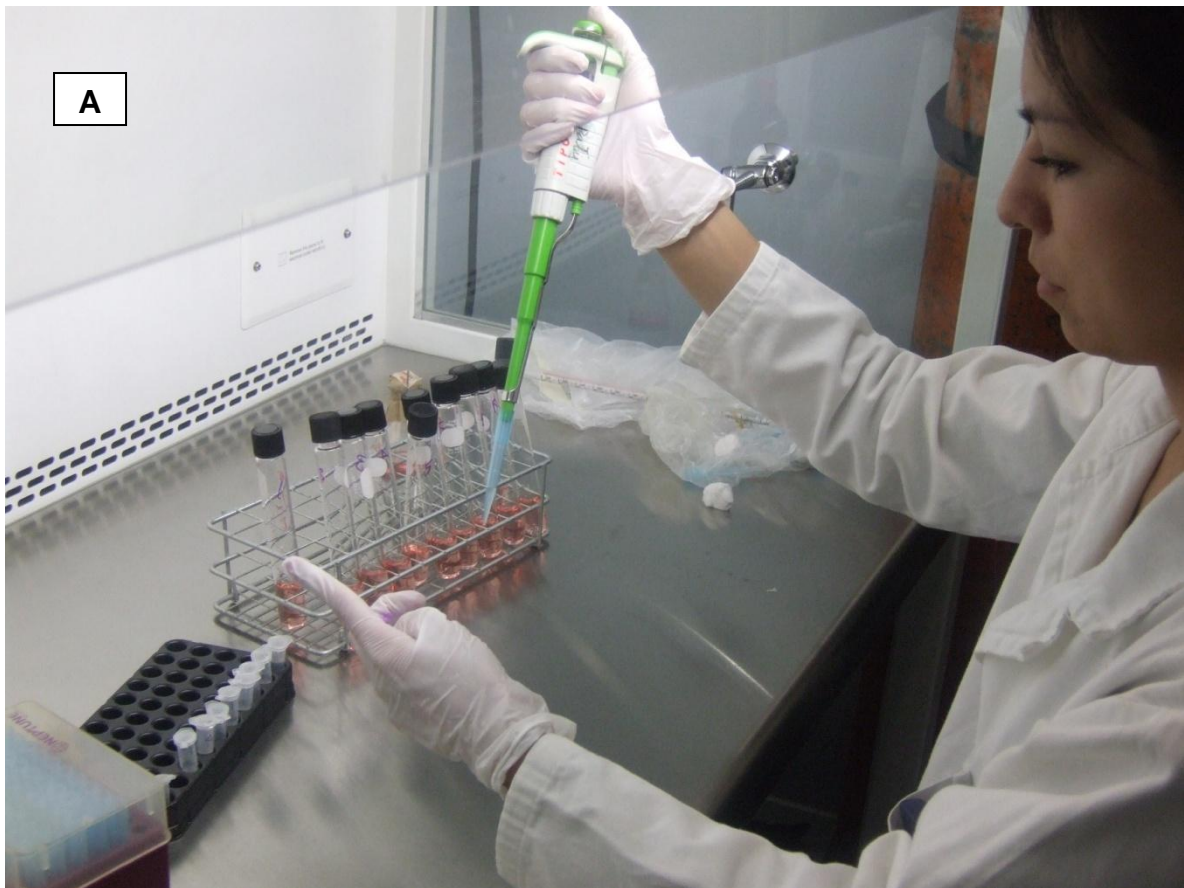


Figura 18. A) Preparación de las diluciones de los antifúngicos. B) Llenado de microplacas.

4.3 Combinación de antifúngicos.

Una vez que se determinó las CMI de los antifúngicos, de forma individual, la mayoría de los cuales mostraron baja o nula actividad frente a los aislados de *Fusarium* spp. En la tabla 14 se muestra las 13 combinaciones de antifúngicos tomando en cuenta los diferentes mecanismos de acción. Para el llenado de las placas de microdilución se siguió el método de “tablero de ajedrez” ^(116,132), con algunas modificaciones, como se ejemplifica en la Fig.18.

Tabla 14. Trece combinaciones de antifúngicos.

AMB+AMR
AMB+CSF
AMB+NTM
AMB+PSZ
AMB+VRZ
VRZ+CSF
VRZ+CTR
VRZ+TRB
TRB+ITZ
TRB+PSZ
CTR+ AMR
CTR+ ITZ
CTR+NTM

La preparación de las soluciones madre y de las diluciones se realizaron del mismo modo que en el punto 4.2.1 y 4.2.2, respectivamente.

4.3.1 Preparación de placas con los antifúngicos.

Los pozos se llenaron con 50µL de las diferentes combinaciones de los dos antifúngicos con las concentraciones resultantes de las diluciones. En el caso del primer antifúngico, se distribuyó en la columna 2 filas A-G (2A-2G), a partir de la segunda columna, la cual contenía la concentración más alta del antifúngico. En la columna 3 (3A-3G) se colocó la siguiente dilución correspondiente a la mitad de la concentración y así sucesivamente hasta la columna 11, la cual contenía la menor concentración.

En la columna 1 (1A-1G) y en la fila H (11H-2H) se depositaron 100 µL en orden creciente de concentración de los antifúngicos solos.

La columna número doce correspondió al control de crecimiento, llenado con 100µL de RPMI y/o con RPMI+ 2% de DMSO para los antifúngicos insolubles. El pozo 1H y 12H correspondieron al control de esterilidad, por lo que sólo se colocó 100µL de RPMI (Fig. 19). Se conservaron a -20°C hasta su uso.

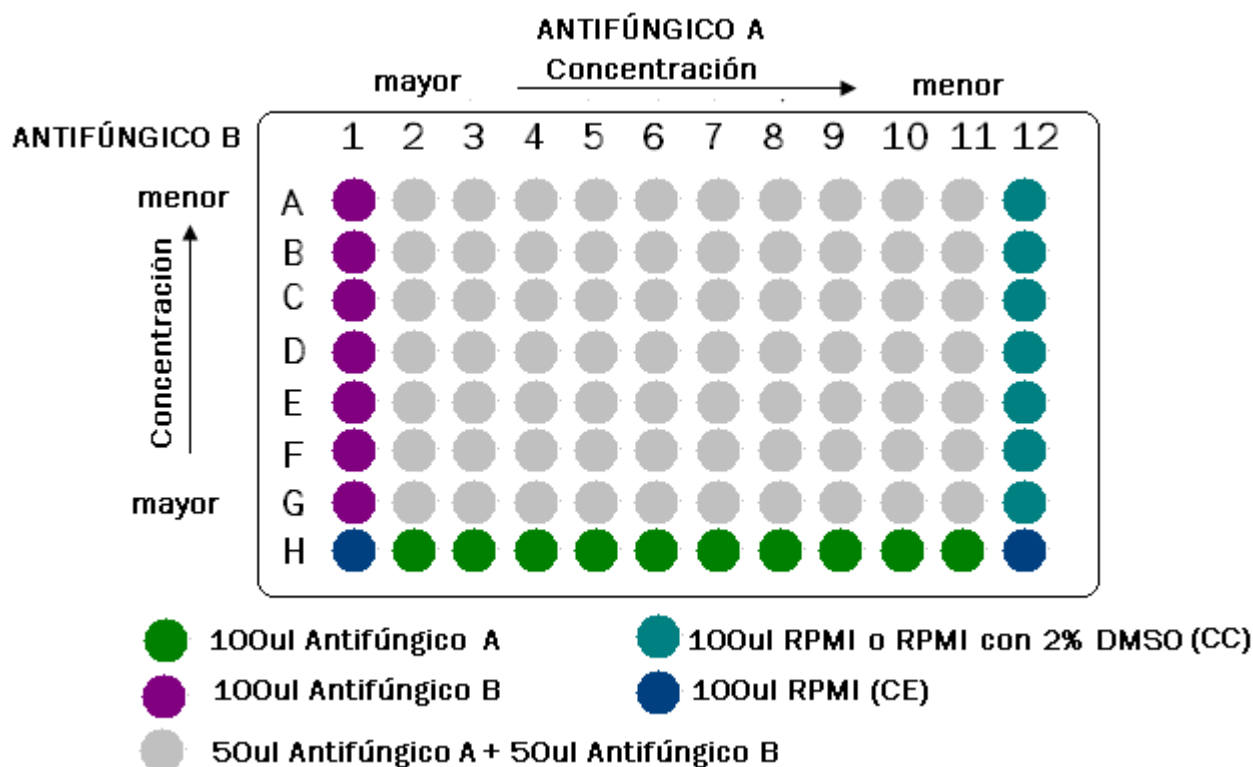


Figura 19. Combinación de los antifúngicos y distribución en las placas de microdilución. CC= Control de crecimiento; CE= Control de esterilidad.

4.3.2 Preparación del inóculo y llenado de placas.

De cada uno de los aislados se obtuvo la solución de inóculo de la misma forma que en el punto 4.2.3. De la concentración 1×10^5 UFC/mL se realizó una dilución 1:50 (1×10^3 UFC/mL) en RPMI 1640, de esta solución se tomaron 100 µL y se depositaron en los pozos de las microplacas conteniendo la combinación de los antifúngicos, excepto los pozos de control de esterilidad (1H y 12H). Posteriormente se incubaron a 35°C por 48 horas.

Prueba de viabilidad: A todas las muestras problema se les corroboró la viabilidad; a partir de la suspensión de inóculo se hizo una dilución 1:50, del inóculo se tomaron 2µL y se colocaron en el centro de una placa de ADS sembrando de manera masiva, posteriormente se incubaron a 35°C por 48 horas y se realizó el conteo de las UFC (Fig. 20A).

Efecto fungicida: Después de efectuar la lectura de CMI de las diversas combinaciones de los antifúngicos, se tomaron 2 μL a partir del último pozo positivo (crecimiento similar al pozo del control positivo) y tres pozos posteriores donde se mostraba inhibición completa de la microplaca. Cada 2 μL se inoculó en sentido de las manecillas del reloj en una placa de ADS dividida en cuatro. Se incubó a 35°C por 48 horas. El resultado de la concentración mínima fungicida (CMF) se interpretó como el desarrollo menor a tres colonias en el cuadrante (Fig. 20B).

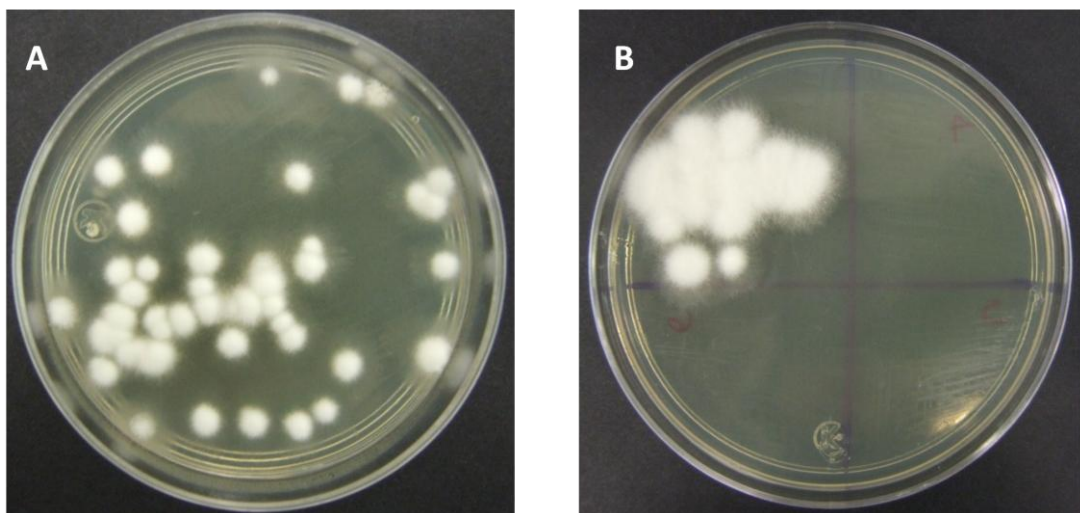


Figura 20. A) Prueba de viabilidad; UFC del aislado FS1. B) Concentración mínima fungicida del aislado FS4 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

4.3.3 Lectura e interpretación de resultados.

Las lecturas se realizaron visualmente (espejo invertido) y por espectrofotometría a 405 nm longitud de onda de máxima absorbancia (espectrofotómetro Dynex Thecnology), a las 24 y 48 horas. Se definió la CMI del antifúngico de forma individual y en combinación. En las combinaciones de antifúngicos que contenían AMB o CTR, la CMI fue la concentración más baja que produjo una inhibición de 100% del crecimiento, y para los demás antifúngicos, la concentración más baja de antifúngico que produjo una reducción de 80% del crecimiento.

Los efectos de la interacción de la combinación de los dos antifúngicos, fue valorada por el índice de la concentración fraccionada inhibitoria (FICI) de cada fármaco tomando en cuenta los valores de CMI del antifúngico individual y CMI del antifúngico en combinación. La fórmula para calcular FICI es la siguiente:

$$FICI = FIC(A) + FIC(B)$$

$$FIC(A) = \frac{(A)}{CIM(A)} \quad FIC(B) = \frac{(B)}{CIM(B)}$$

Donde (A) es la concentración mínima inhibitoria del antifúngico A y (B) es la CMI del antifúngico B, cuando son usadas en combinación. Ambas divididas entre el valor de CMI del antifúngico solo.

El efecto se comparó con los valores de FICI, descritos en la tabla 15.

Tabla 15. Criterios de interpretación del efecto de la interacción de dos antifúngicos.

Efecto	FICI
Sinérgico	≤0.5
Indiferente	>0.5 a <4
Antagónico	>4

V. RESULTADOS

Por las características morfológicas (macro y microscópicas) se identificaron seis de las especies de *Fusarium*, en la tabla 16 se describen las observaciones en los cuatro medios probados. Asimismo se tomó en cuenta su morfología microscópica en los microcultivos. En la figura 21 se muestra un ejemplo de estas consideraciones, donde el aspecto en A, C y D fue veloso, de color blanco; mientras que en B fue aterciopelado, blanco y con pigmento rojizo en el centro. Formación de pigmento oscuro al reverso de la colonia en E y G. Asimismo se tomó en cuenta su morfología microscópica en los microcultivos (Fig. 22). En la tabla 16 se presenta las características de cada aislado y la especie identificada.

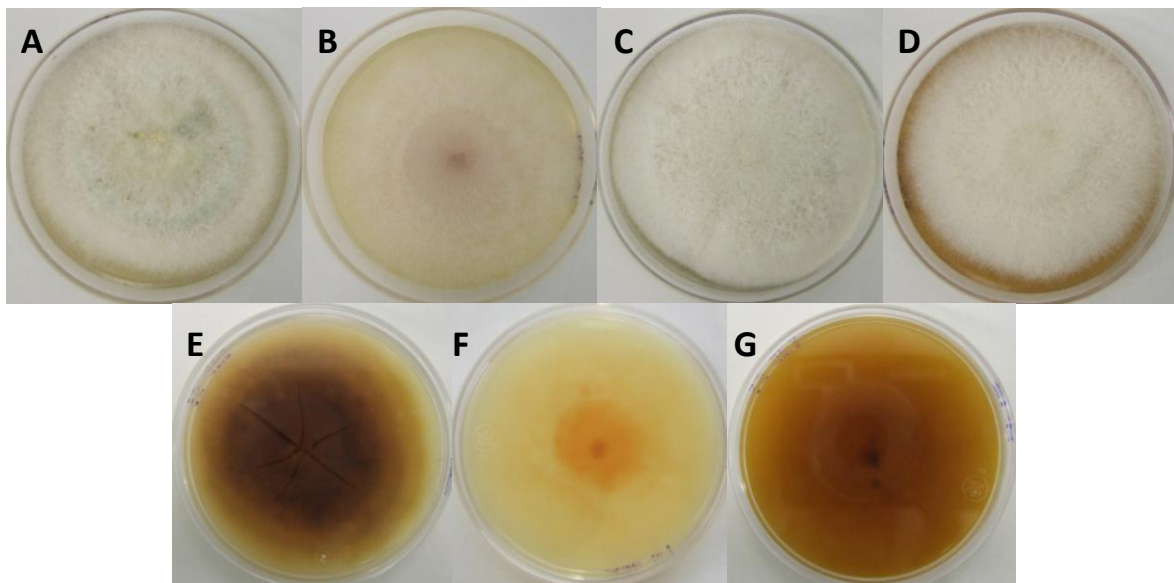


Figura 21. Características de las colonias de *Fusarium* spp., en cuatro medios de cultivo. A) ADS; B) APD; C) AA; D) AEM. Al reverso del medio, E) ADS; F) APD y G) AEM.

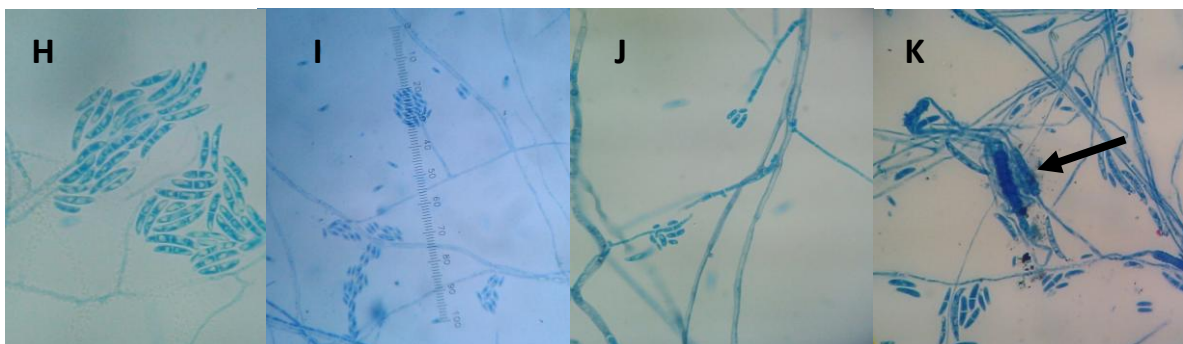


Figura 22. Características microscópicas de *Fusarium* spp. H) Macroconidios fusiformes. I) Esporodocia. J) Monofialides y microconidios en masa. K) Macroconidios, microconidios y clamidoconidios intermedios (flecha) en la hifa.

Tabla 16. Características morfológicas de los aislados clínicos de *Fusarium* spp.

Aislado	Morfología de las colonias				Morfología microscópica	Especie
	ADS	APD	AA	AEM		
FS1	Algodonosa, de bordes regulares. Color blanco en la periferia y centro vino, Al reverso presenta pigmento color vino difusible.	Velosa, plana, bordes regulares. Color blanco con centro vino. Al reverso presenta pigmento marrón.	Algodonosa, bordes regulares. Color blanco con centro verde. Presenta pigmento gris.	Algodonosa, color blanco con centro verde. Presenta pigmento marrón difusible.	Numerosas monofiálides, macroconidios y microconidios dispuestos en cúmulos o aislados. Los microconidios (8-14 μm) ovoides con uno o dos septos. Los macroconidios (4-6x24-28 μm) son casi rectos, la célula apical y basal son ligeramente curvas, con 2-4 septos. Tiene esporodoquia.	<i>F. oxysporum</i>
FS2	Algodonosa, centro elevado y plegado, con bordes irregulares y extendidos. Color blanco. Al reverso presenta pigmento amarillo difusible.	Algodonosa, con bordes irregulares, extendidos y ramificados. Color beige. Presenta pigmento amarillo difusible.	Algodonosa, con centro elevado y umbilicado, bordes irregulares y extendidos. Color blanco. Presenta pigmento naranja.	Algodonosa, centro plegado y elevado, con bordes irregulares. Color salmón. Presenta pigmento amarillo.	Monofiálides con microconidios (6-8 μm) dispuestos en cúmulos, ovoides con uno o dos septos. Los macroconidios (4-6x14-36 μm) tienen de uno a tres septos. Escasas clamidoconidios intermedios y terminales (12 μm).	<i>F. subglutinans</i>
FS3	Velosa, con centro rosa y elevado, bordes regulares. Color blanco. Al reverso presenta pigmento rojo difusible.	Velosa, con centro rosa y elevado, bordes extendidos, regulares. Color blanco. Presenta pigmento rojo difusible.	Velosa, con centro elevado y bordes regulares. Color beige.	Velosa, elevada, bordes regulares. Color blanco.	Monofiálides con microconidios (4-6x10-12 μm) en forma de "riñón", sólo tienen un septo y están dispuestos en cúmulos. Macroconidios (4-6x20-24 μm) de uno a tres septos, célula basal y apical están en punta, también tiene esporodoquio. Ausencia de clamidoconidios.	<i>F. oxysporum</i>
FS4	Algodonosa, con bordes regulares. Color beige con centro verdoso. Al reverso presenta pliegues y pigmento marrón no difusible.	Algodonosa, con bordes regulares y nítidos. Color blanco, con centro rosado y elevado. Al reverso presenta pigmento naranja no difusible.	Algodonosa, elevada, con bordes regulares. Color blanco.	Algodonosa, con bordes regulares. Color blanco. Presenta pigmento marrón no difusible.	Monofiálides con microconidios (2-4x10-14 μm) ovalados con un septo y dispuestos en cúmulos. Los macroconidios (2-6x20-24 μm) con uno o dos septos, la célula apical y basal están redondeadas. Ausencia de clamidoconidios.	<i>F. solani</i>

Tabla 16. Características morfológicas de los aislados clínicos de *Fusarium* spp. (Continuación)

Aislado	Morfología de las colonias				Morfología microscópica	Especie
	ADS	APD	AA	AEM		
FS5	Aterciopelada, con bordes regulares. Color blanco con centro rosa. Al reverso presenta pliegues y pigmento marrón no difusible.	Algodonosa, con bordes regulares. Color amarillo. Al reverso presenta pigmento amarillo difusible al medio.	Algodonosa, con bordes regulares. Color blanco.	Algodonosa, con centro elevado y bordes regulares. Color blanco.	Monofiálides con macroconidios en esporodoquia y microconidios dispuestos en cúmulos. Los microconidios (2-4x6-10µm) ovalados con uno o dos septos. Los macroconidios de 4-6x20-30µm, 2-4 septos, célula apical en punta y basal redondeada. Ausencia de clamidoconidios.	<i>F. oxysporum</i>
FS6	Algodonosa con centro elevado y bordes regulares. Color salmón. Al reverso presenta pigmento color rojo difusible.	Algodonosa, con bordes irregulares. Color amarillo.	Algodonosa, con bordes irregulares y extendidos. Color blanco.	Algodonosa, centro elevado, con bordes regulares. Color blanco.	Abundantes monofiálides. Los microconidios (2-4x10-14µm) son alargados y con uno o dos septos. Los macroconidios (4-6x24-34µm) con 2-4 septos, con la célula apical en punta y la basal redondeada. Presenta esporodoquio.	<i>F. oxysporum</i>
FS7	Aterciopelada, plana, con bordes regulares. Color morado. Al reverso presenta pliegues y pigmento en el centro color marrón, y amarillo difusible.	Algodonosa, umbilicada, con bordes regulares. Color rosa. Al reverso presenta pigmento color marrón en el centro y rosa difusible.	Aterciopelada, umbilicada, plegada, con bordes regulares. Color lila.	Algodonosa, umbilicada, con bordes regulares. Color rosa en el centro y blanco en la periferia. Al reverso presenta pigmento marrón en el centro y amarillo difusible.	Polifiálides con microconidios (2-4x6-10µm) alargados con 1-3 septos, se encuentran dispuestos en cúmulos. Los macroconidios (2-4x10-22µm) tienen 1-3 septos, la célula apical y basal en punta, se desprenden de las hifas. Ausencia de clamidoconidios y esporodoquio.	<i>F. solani</i>

Los resultados de las pruebas de sensibilidad *in vitro* a los diversos antifúngicos contra las especies de *Fusarium* se muestran en la tabla 17, en donde se presentan las concentraciones mínimas inhibitorias de los fármacos contra cada uno de los aislados. Anfotericina B fue el antifúngico con la mayor actividad; con una CMI ≤ 2 µg/mL; seguido por cetrimonio con una CMI de 2 µg/mL. En cambio, voriconazol mostró una actividad variable, ya que fue activo contra la mitad de los aislados, con una CMI de 2 µg/mL; mientras que, amorolfina sólo fue activo en dos de los aislados con una CMI ≤ 2 µg/mL; con el resto de los antifúngicos la actividad fue baja o nula (16-64 µg/mL).

Tabla 17. Concentración mínima inhibitoria de doce antifúngicos contra siete aislados de *Fusarium*.

CMI ($\mu\text{g/mL}$)						
Aislado	AMB	ANF	CSF	FLZ	ITZ	KTZ
FS1	2.0	32.0	16.0	64.0	16.0	16.0
FS2	1.0	32.0	16.0	64.0	16.0	16.0
FS3	1.0	32.0	16.0	64.0	16.0	8.0
FS4	1.0	32.0	16.0	64.0	16.0	16.0
FS5	0.25	32.0	16.0	64.0	16.0	16.0
FS6	0.50	32.0	16.0	64.0	16.0	16.0
FS7	2.0	32.0	16.0	64.0	16.0	16.0

Tabla 17. Concentración mínima inhibitoria de doce antifúngicos contra siete aislados de *Fusarium*. (Continuación).

CMI ($\mu\text{g/mL}$)						
Aislado	PSZ	TRB	VRZ	NTM	CTR	AMR
FS1	16.0	16.0	16.0	32.0	2.0	2.0
FS2	16.0	8.0	2.0	32.0	2.0	16.0
FS3	16.0	16.0	2.0	32.0	2.0	0.5
FS4	16.0	16.0	4.0	32.0	2.0	16.0
FS5	16.0	16.0	2.0	32.0	2.0	16.0
FS6	16.0	16.0	16.0	32.0	2.0	16.0
FS7	16.0	16.0	16.0	32.0	2.0	16.0

En la Fig. 23 se presenta el promedio de las CMI de cada antifúngico independientemente del aislado de *Fusarium*, en el cual se observa que los fármacos con mayor actividad fueron anfotericina B (100%), cetrimonio (100%), voriconazol (50%) y amorolfina (28.6%).

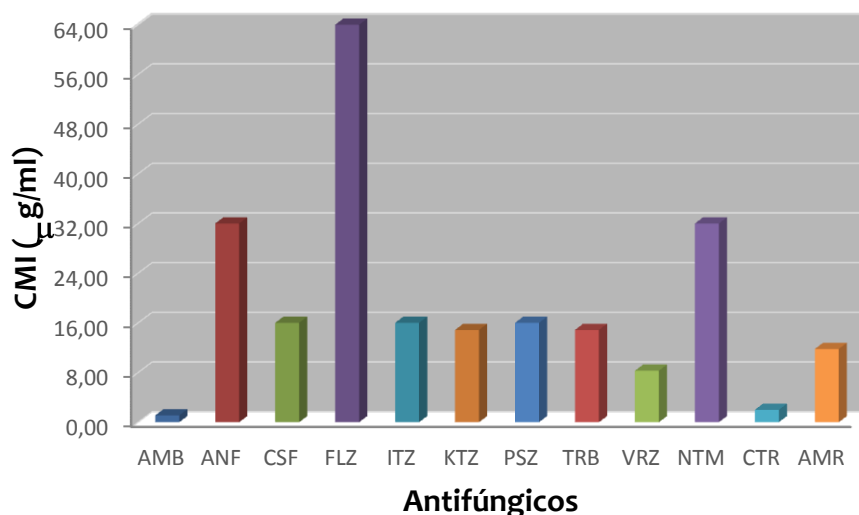


Figura 23. Actividad de los antifúngicos frente a los diversos aislados de *Fusarium*.

Al relacionar el antifúngico con el aislado de *Fusarium* fue evidente que AMB y CTR mostraron la mayor actividad contra los aislados FS5 y FS6. Otro de los antifúngicos que presentó mayor actividad contra los aislados FS1 y FS3 fue AMR, mientras que VRZ la mejor actividad se observó frente a los aislados FS2, FS3 y FS5. La actividad de los otros antifúngicos fue menor y similar independientemente del aislado (Fig. 24).

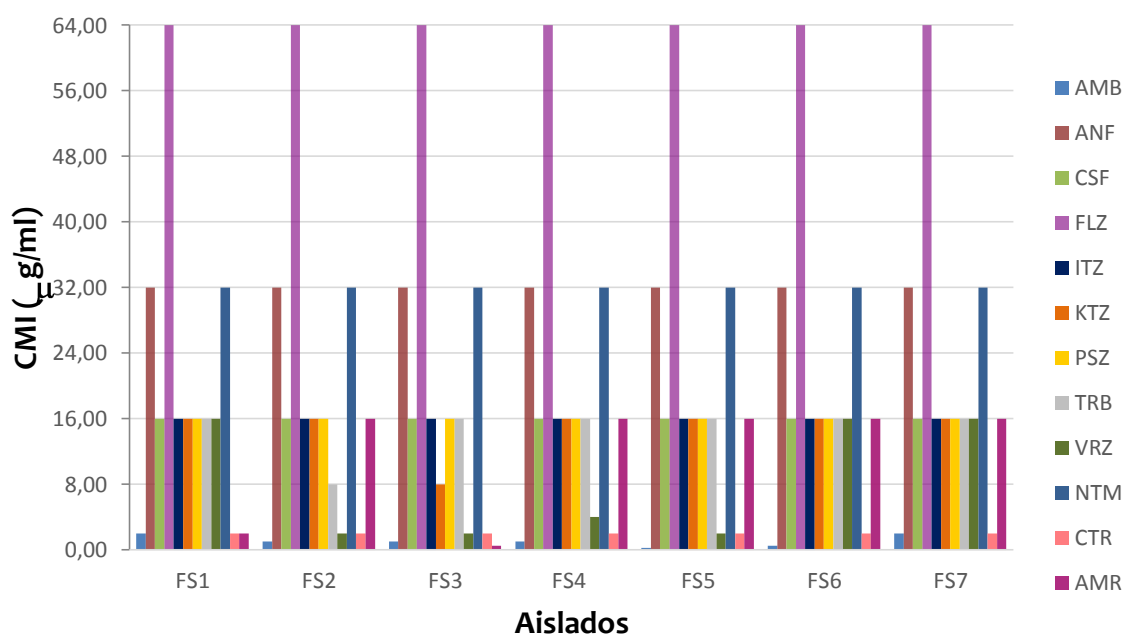


Figura 24. Concentraciones mínimas inhibitorias de doce antifúngicos contra *Fusarium* spp.

A partir de los datos que se obtuvieron con la prueba de microdilución en caldo, se llevó a cabo las combinaciones de antifúngicos por el método de tablero de ajedrez, con lo cual se observó el efecto de cada interacción de los antifúngicos demostrada por los resultados del FICI (Tabla 18 a Tabla 30).

Con la combinación AMB+AMR, en cuatro de los aislados se observó una disminución de la CMI de 16.0 a 0.25 µg/mL y en uno de 1.0 a 0.5 µg/mL. Por el contrario, la CMI de AMB aumentó en cuatro de los aislados de 2.0 a 4.0 µg/mL. El índice de la concentración fraccionada inhibitoria presentó un efecto indiferente en todos los aislados (Tabla 18).

Tabla 18. Combinación entre AMB+AMR en los siete aislados de *Fusarium*.

Aislado	CMI ($\mu\text{g/mL}$)			FICI
	AMB	AMR	AMB/AMR	
FS1	0.5	1.0	0.5/0.5	1.50
FS2	2.0	16.0	4.0/0.25	2.02
FS3	0.5	0.5	0.5/0.5	2.00
FS4	2.0	16.0	4.0/0.25	2.02
FS5	2.0	16.0	4.0/0.25	2.02
FS6	0.5	16.0	1.0/16	3.00
FS7	2.0	16.0	4.0/0.25	2.02

En la tabla 19 se muestra la interacción entre AMB+CSF, en todos los aislados se obtuvo un efecto indiferente (Fig. 27). Se observa una disminución en la CMI de CSF en 4/7 de los aislados de 16.0 a 0.25 $\mu\text{g/mL}$; mientras que, en un aislado (FS4) la CMI se mantuvo en 16.0 $\mu\text{g/mL}$. Por el contrario, la CMI de AMB aumentó en tres de los aislados y en los cuatro restantes permaneció sin cambios.

Tabla 19. Combinación entre AMB+CSF en los siete aislados de *Fusarium*.

Aislado	CMI ($\mu\text{g/mL}$)			FICI
	AMB	CSF	AMB/CSF	
FS1	0.5	16.0	1.0/0.25	2.02
FS2	2.0	16.0	2.0/0.25	1.02
FS3	0.25	16.0	0.5/0.25	2.02
FS4	0.5	16.0	0.5/16.0	2.00
FS5	0.5	16.0	0.5/8.0	1.50
FS6	0.5	16.0	1.0/0.25	2.02
FS7	1.0	16.0	1.0/2.0	1.13

El efecto de la interacción entre AMB+NTM se presenta en la tabla 20. En la cual se observa en dos de los aislados un efecto antagónico, con un FICI de 16.02 para FS1 (Fig. 26) y 4.02 para FS3. Los demás aislados muestran un efecto indiferente (Fig. 27). La CMI de NTM de forma individual fue de 32.0 $\mu\text{g/mL}$, en combinación disminuyó a 0.5 $\mu\text{g/mL}$ en 6/7 de los aislados; mientras que, la CMI de AMB aumentó en cuatro aislados.

Tabla 20. Combinación entre AMB+NTM en los siete aislados de *Fusarium*.

Aislado	CMI ($\mu\text{g/mL}$)			FICI
	AMB	NTM	AMB/NTM	
FS1	0.125	32.0	2.0/0.5	16.02
FS2	1.0	32.0	1.0/4.0	1.13
FS3	0.5	32.0	2.0/0.5	4.02
FS4	1.0	32.0	2.0/0.5	2.02
FS5	0.5	32.0	1.0//0.5	2.02
FS6	1.0	32.0	1.0/0.5	1.02
FS7	2.0	32.0	2.0/0.5	1.02

En la combinación entre AMB+PSZ, la CMI con PSZ disminuyó de 16.0 a 0.25 $\mu\text{g/mL}$ en cinco aislados; sin embargo, con AMB, aumentó al doble en todos los aislados. El FICI obtenido fue de 2 $\mu\text{g/mL}$ en 6/7 de los aislados, con un efecto indiferente (Tabla 21).

Tabla 21. Combinación entre AMB+PSZ en los siete aislados de *Fusarium*.

Aislado	CMI ($\mu\text{g/mL}$)			FICI
	AMB	PSZ	AMB/PSZ	
FS1	2.0	16.0	4.0/0.25	2.02
FS2	2.0	16.0	2.0/0.25	1.02
FS3	0.5	16.0	1.0/1.0	2.07
FS4	2.0	16.0	4.0/0.25	2.02
FS5	2.0	8.0	4.0/0.25	2.03
FS6	0.5	16.0	1.0/0.25	2.02
FS7	2.0	16.0	4.0/0.25	2.02

En la tabla 22 se presenta la interacción entre AMB+VRZ, donde seis de los aislados mostraron un efecto indiferente y en uno el efecto fue antagónico con un FICI de 4.02 $\mu\text{g/mL}$. En todos los aislados la CMI frente a VRZ disminuyó de 16.0 a 0.25 $\mu\text{g/mL}$. Por el contrario, con AMB aumentó.

Tabla 22. Combinación entre AMB+VRZ en los siete aislados de *Fusarium*.

Aislado	CMI ($\mu\text{g/mL}$)			FICI
	AMB	VRZ	AMB/VRZ	
FS1	1.0	16.0	2.0/0.25	2.02
FS2	2.0	16.0	4.0/0.25	2.02
FS3	1.0	16.0	2.0/0.25	2.02
FS4	2.0	16.0	8.0/0.25	4.02
FS5	2.0	16.0	4.0/0.25	2.02
FS6	0.5	16.0	1.0/0.25	2.02
FS7	2.0	16.0	4.0/0.25	2.02

La combinación de VRZ+CSF no mostró ninguna actividad, ya que tanto la CMI de los dos antifúngicos individualmente como en combinación fue igual en todos los aislados (Tabla 23).

Tabla 23. Combinación entre VRZ+CSF en los siete aislados de *Fusarium*.

Aislado	CMI ($\mu\text{g/mL}$)			FICI
	VRZ	CSF	VRZ/CSF	
FS1	16.0	16.0	16.0/16.0	2.0
FS2	16.0	16.0	16.0/16.0	2.0
FS3	16.0	16.0	16.0/16.0	2.0
FS4	16.0	16.0	16.0/16.0	2.0
FS5	16.0	16.0	16.0/16.0	2.0
FS6	16.0	16.0	16.0/16.0	2.0
FS7	16.0	16.0	16.0/16.0	2.0

En la tabla 24 se muestra el efecto de la combinación de VRZ+CTR, con la disminución de la CMI con VRZ de 16.0 a 0.25 $\mu\text{g/mL}$ frente a todos los aislados. El efecto contrario se observó con CTR, ya que la CMI aumentó de 1.0 a 4.0 $\mu\text{g/mL}$ en seis de los aislados. El efecto fue antagónico para seis de los aislados e indiferente en uno, con un FICI de 4.02 y 1.02, respectivamente.

Tabla 24. Combinación entre VRZ+CTR en los siete aislados de *Fusarium*.

Aislado	CMI ($\mu\text{g/mL}$)			FICI
	VRZ	CTR	VRZ/CTR	
FS1	16.0	1.0	0.25/4.0	4.02
FS2	16.0	1.0	0.25/4.0	4.02
FS3	16.0	1.0	0.25/4.0	4.02
FS4	16.0	1.0	0.25/4.0	4.02
FS5	16.0	4.0	0.25/4.0	1.02
FS6	16.0	1.0	0.25/4.0	4.02
FS7	16.0	1.0	0.25/4.0	4.02

La CMI de VRZ disminuyó en los siete aislados, mientras que con TRB disminuyó en tres. La combinación de VRZ presentó efecto indiferente en todos los aislados, excepto en FS4 en el que se obtuvo un FICI de 0.28 (efecto sinérgico (Fig. 25)) (Tabla 25).

Tabla 25. Combinación entre VRZ+TRB en los siete aislados de *Fusarium*.

Aislado	CMI ($\mu\text{g/mL}$)			FICI
	VRZ	TRB	VRZ/TRB	
FS1	16.0	16.0	0.5/16.0	1.03
FS2	8.0	4.0	0.25/4.0	1.03
FS3	8.0	16.0	0.25/16.0	1.03
FS4	16.0	16.0	0.5/4.0	0.28
FS5	8.0	16.0	4.0/8.0	1.00
FS6	16.0	16.0	0.5/16.0	1.03
FS7	2.0	4.0	0.25/2.0	0.63

El efecto de la combinación de TRB+ITZ se muestra en la tabla 26, en la cual no se observó ninguna actividad con los antifúngicos individuales. Al combinarse los antifúngicos, la CMI de ITZ disminuyó en tres aislados (FS2 y FS4) de 16.0 a 0.03 $\mu\text{g/mL}$ y en uno (FS7) de 16.0 a 2.0 $\mu\text{g/mL}$. El efecto de la interacción fue indiferente (FICI 1.0).

Tabla 26. Combinación entre TRB+ITZ en los siete aislados de *Fusarium*.

Aislado	CMI ($\mu\text{g/mL}$)			FICI
	TRB	ITZ	TRB/ITZ	
FS1	16.0	16.0	16.0/16.0	2.00
FS2	16.0	16.0	16.0/0.03	1.00
FS3	16.0	16.0	16.0/16.0	2.00
FS4	16.0	16.0	16.0/0.03	1.00
FS5	16.0	16.0	16.0/16.0	2.00
FS6	16.0	16.0	8.0/8.0	1.00
FS7	16.0	16.0	8.0/2.0	0.63

La CMI de la interacción entre TRB+PSZ aumentó la actividad de TRB frente a en uno de los aislados (FS7) de 16.0 a 1.0 $\mu\text{g/mL}$. La combinación de estos antifúngicos presentó un efecto indiferente con un FICI de 0.75 (Tabla 27).

Tabla 27. Combinación entre TRB+PSZ en los siete aislados de *Fusarium*.

Aislado	CMI ($\mu\text{g/mL}$)			FICI
	TRB	PSZ	TRB/PSZ	
FS1	16.0	16.0	16.0/16.0	2.00
FS2	16.0	16.0	4.0/8.0	0.75
FS3	16.0	16.0	8.0/4.0	0.75
FS4	16.0	16.0	8.0/4.0	0.75
FS5	16.0	16.0	8.0/4.0	0.75
FS6	16.0	16.0	4.0/8.0	0.75
FS7	16.0	16.0	1.0/16.0	0.75

La CMI de CTR aumentó de 1.0 a 2.0 $\mu\text{g/mL}$, mientras que la CMI de AMR disminuyó en seis aislados y sólo en uno (FS3) aumentó de 0.5 a 2.0 $\mu\text{g/mL}$. El efecto que presentó la interacción entre CTR+AMR fue indiferente para seis de los aislados y antagónico para uno de ellos (FS3), con un FICI de 2.0 y 5.0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Tabla 28).

Tabla 28. Combinación entre CTR+AMR en los siete aislados de *Fusarium*.

Aislado	CMI ($\mu\text{g/mL}$)			FICI
	CTR	AMR	CTR/AMR	
FS1	1.0	2.0	2.0/0.25	2.13
FS2	1.0	16.0	2.0/0.25	2.02
FS3	1.0	0.5	1.0/2.0	5.00
FS4	1.0	16.0	1.0/16.0	2.00
FS5	1.0	16.0	2.0/0.25	2.02
FS6	1.0	16.0	2.0/0.25	2.02
FS7	1.0	16.0	2.0/0.25	2.02

La CMI de ITZ disminuyó de 16.0 a 0.25 $\mu\text{g/mL}$, por el contrario, la CMI de CTR aumentó de 1.0 a 2.0 $\mu\text{g/mL}$ en todos los aislados. En la tabla 29 se muestra el efecto indiferente de la combinación de CTR+ITZ, en la que el FICI fue de 2.02.

Tabla 29. Combinación entre CTR+ITZ en los siete aislados de *Fusarium*.

Aislado	CMI ($\mu\text{g/mL}$)			FICI
	CTR	ITZ	CTR/ITZ	
FS1	1.0	16.0	2.0/0.25	2.02
FS2	1.0	16.0	2.0/0.25	2.02
FS3	1.0	16.0	2.0/0.25	2.02
FS4	1.0	16.0	2.0/0.25	2.02
FS5	1.0	16.0	2.0/0.25	2.02
FS6	1.0	16.0	2.0/0.25	2.02
FS7	1.0	16.0	2.0/0.25	2.02

En todos los aislados la CMI de NTM disminuyó de 32.0 a 0.06 $\mu\text{g/mL}$, mientras que la CMI de CTR aumentó de 1.0 a 2.0 $\mu\text{g/mL}$. El efecto de la combinación de CTR+NTM, fue indiferente con un FICI de 2.0 $\mu\text{g/mL}$ (tabla 30).

Tabla 30. Combinación entre CTR+NTM en los siete aislados de *Fusarium*.

Aislado	CMI ($\mu\text{g/mL}$)			FICI
	CTR	NTM	CTR/NTM	
FS1	1.0	32.0	2.0/0.06	2.002
FS2	1.0	32.0	2.0/0.06	2.002
FS3	1.0	32.0	2.0/0.06	2.002
FS4	1.0	32.0	2.0/0.06	2.002
FS5	1.0	32.0	2.0/0.06	2.002
FS6	1.0	32.0	2.0/0.06	2.002
FS7	1.0	32.0	2.0/0.06	2.002

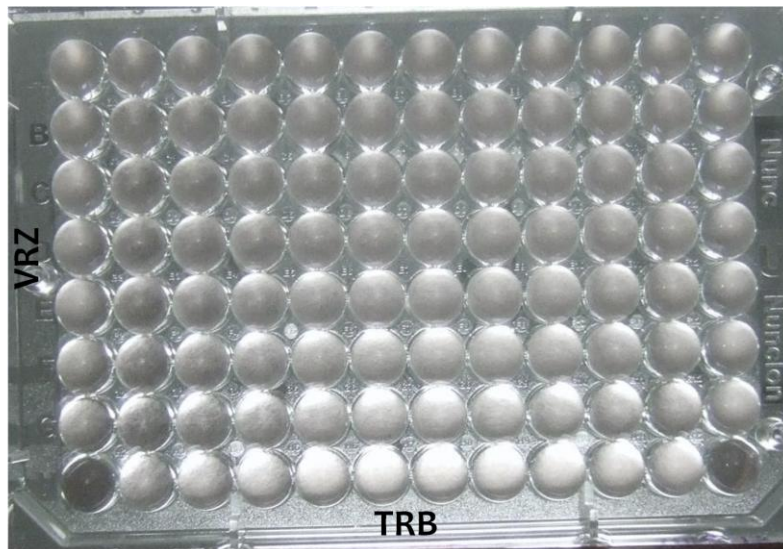


Figura 25. Efecto sinérgico en la combinación de VRZ+TRB en el aislado FS4.

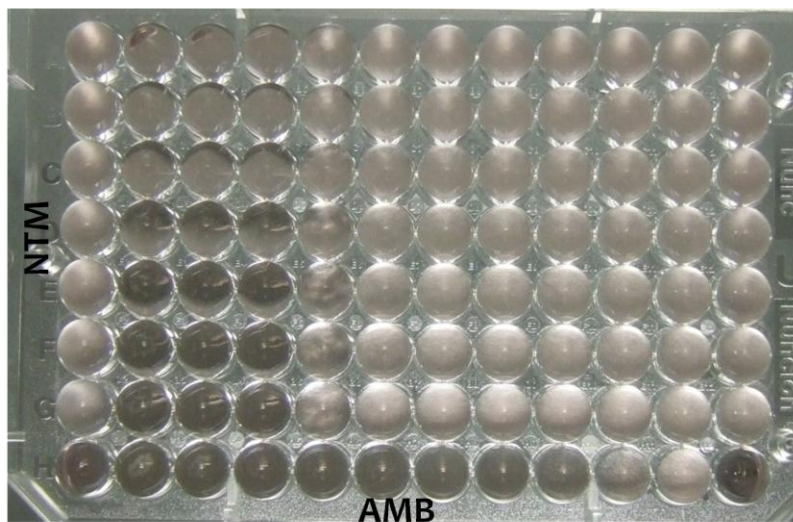


Figura 26. Efecto antagónico en placa con combinación AMB+NTM en el aislado FS1.

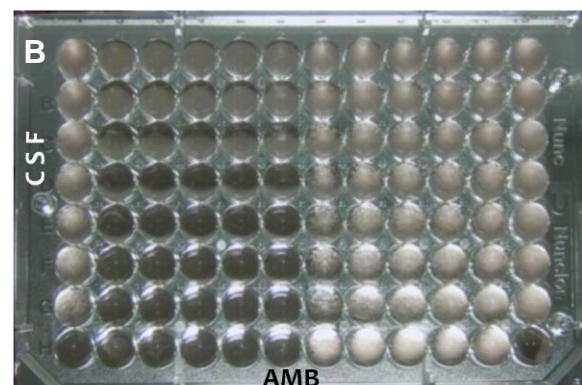
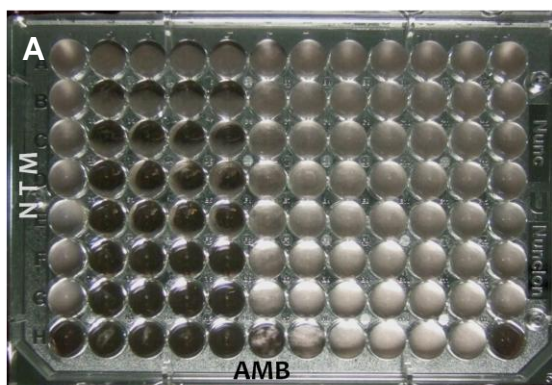


Figura 27. Efecto indiferente. A) Combinación NTM+AMB en el aislado FS4. B) Combinación AMB+CSF en el aislado FS7.

Los índices de la FIC donde se observa el efecto de la combinación de los antifúngicos se presentan en la figura 28. De las trece combinaciones realizadas el 92% tuvo un efecto indiferente y el 8% efecto antagónico. El efecto sinérgico se obtuvo con la combinación de VRZ+TRB en el 14.3% de los aislados de *Fusarium*. Las combinaciones que mostraron un efecto antagónico fueron VRZ+CTR en el 85.7%, AMB+NTM en el 28.6%, AMB+VRZ y AMR+CTR en el 14.3% de los aislados.

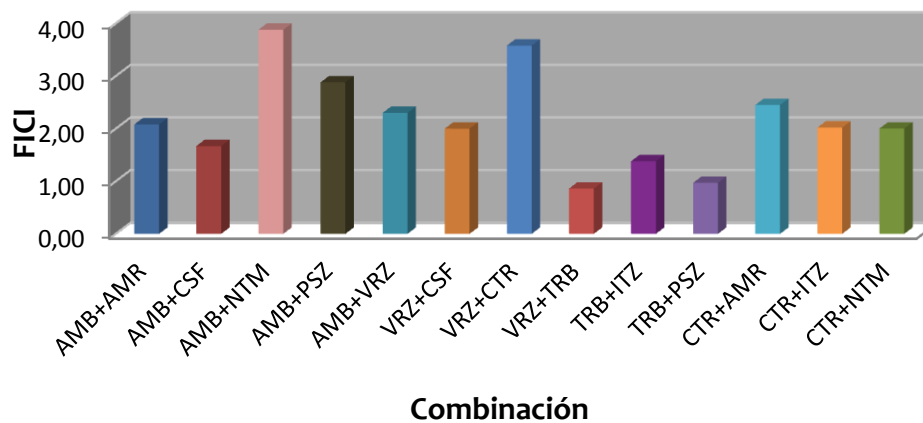


Figura 28. Efecto de la combinación de los antifúngicos. Sinergismo: $FICI \leq 0.5$; Indiferente: $0.5 < FICI < 4.0$ y Antagonismo: $FICI \geq 4.0$

La relación entre la especie de *Fusarium* y la localización de la infección con la combinación de antifúngicos se presenta en la tabla 31. En todos los casos fue evidente que la combinación con AMB potencializó el efecto de ITZ, PSZ, NTM, AMR y CSF.

Tabla 31. Relación entre el aislado clínico, el origen y la combinación de los antifúngicos.

Aislado	Origen	Especie	Combinación	CMI (μg/mL)
FS1	Fungemia	<i>F. oxysporum</i>	AMB+AMR AMB+CSF AMB+NTM AMB+PSZ	AMR 1.0→0.5 AMB 0.5→0.5 CSF 16.0→0.25 AMB 0.5→1.0 NTM 32.0→0.5 PSZ 16.0→0.25
FS2	Micetoma	<i>F. subglutinans</i>	AMB+AMR AMB+CSF AMB+NTM AMB+PSZ TRB+ITZ	AMR 16.0→0.25 CSF 16.0→0.25 AMB 1.0→1.0 PSZ 16.0→0.25 ITZ 16.0→0.03
FS3	Queratitis	<i>F. oxysporum</i>	AMB+AMR AMB+CSF AMB+NTM AMB+PSZ	AMR 0.5→0.5 AMB 0.5→0.5 CSF 16.0→0.25 AMB 0.25→0.5 NTM 32.0→0.5 PSZ 16.0→1.0 AMB 0.5→1.0
FS4	Queratitis	<i>F. solani</i>	AMB+AMR AMB+CSF AMB+NTM AMB+PSZ TRB+ITZ	AMR 16.0→0.25 AMB 0.5→0.5 NTM 32.0→0.5 PSZ 16.0→0.25 ITZ 16.0→0.03
FS5	Queratitis	<i>F. oxysporum</i>	AMB+AMR AMB+CSF AMB+NTM AMB+PSZ	AMR 16.0→0.25 AMB 0.5→0.5 NTM 32.0→0.5 PSZ 8.0→0.25
FS6	Queratitis	<i>F. oxysporum</i>	AMR+AMB AMB+CSF AMB+NTM AMB+PSZ	AMB 0.5→1.0 CSF 16.0→0.25 AMB 0.5→1.0 NTM 32.0→0.5 PSZ 16.0→0.25 AMB 0.5→1.0
FS7	Onicomycosis	<i>F. solani</i>	AMB+AMR AMB+CSF AMB+NTM AMB+PSZ	AMR 16.0→0.25 AMB 1.0→1.0 NTM 32.0→0.5 PSZ 16.0→0.25

VI. DISCUSIÓN

En las dos últimas décadas se ha observado un aumento en la incidencia de infecciones invasivas causadas por hongos, principalmente en pacientes inmunosuprimidos. Algunas de estas infecciones, son más comunes asociadas a un factor específico de oportunismo.

Los hongos levaduriformes son causa frecuente de infecciones diseminadas y/o invasivas. La incidencia anual estimada en infecciones diseminadas por millón de población del 72-228% para *Candida* spp.; de 30-66% para *Cryptococcus neoformans* y de 12-34% para *Aspergillus* spp. ⁽¹⁰⁰⁾. Otro de los hallazgos observados en la última década es el incremento de las infecciones por hongos filamentosos considerados patógenos emergentes, entre ellos las especies de *Fusarium*. Dos de los factores de riesgo comúnmente asociados a estas infecciones son: trasplantes de órganos sólidos (7-10%) y neoplasias hematológicas (leucemias mieloides) ^(52,87,112).

Las especies que se han aislado con mayor frecuencia son: *F. solani* (50%), *F. oxysporum* (20%), *F. moniliforme* (10%) y *F. verticillioides* (20%). A diferencia de los aislados clínicos del presente trabajo donde 4/7 correspondieron a *F. oxysporum*, seguido por *F. solani* (2/7) y *F. subglutinans* (1/7).

Leucemias agudas y neutropenia prolongada son los dos factores que han sido documentados en el 70 a 80% y en el 90% de los pacientes, respectivamente. ⁽⁵¹⁾, por lo que la recuperación de la cifra de neutrófilos es muy importante para un buen pronóstico ^(4,34,45); sin embargo, cuando no es controlada o el paciente lleva algún tratamiento con corticosteroides favorece la diseminación de la infección, la cual tiene una alta tasa de mortalidad (50-80%) ^(4,130).

De los siete aislados de *Fusarium* cuatro se obtuvieron del material biológico de pacientes con queratitis y sólo uno de infección diseminada. Éstas se caracterizan por tener una pobre respuesta al tratamiento con antifúngicos, ya que las especies de *Fusarium* muestran resistencia inherente a los azoles, polienos y equinocandinas ^(11,12,89,100). A pesar de ello, se ha reportado la administración de AMB en infecciones invasivas por *Fusarium* spp. en algunos casos ha tenido buenos resultados, como el reporte de Guarro y cols. ⁽⁴⁹⁾, en el que la especie aislada fue *F. sacchari*; mientras que los documentados por Naar y cols. ⁽⁸²⁾ y Hernández-Cruz ⁽⁵¹⁾ no fueron exitosos.

Voriconazol se ha utilizado para el tratamiento de rescate en infecciones causadas por *Fusarium* spp. y en pacientes con hongos resistentes a otros antifúngicos, mostrando buenos resultados ^(53,96). En el presente estudio a uno de los pacientes (FS1) se le administró AMB con mejoría limitada y a otro de los pacientes (FS2) se le dio tratamiento con ITZ con curación de la micosis ⁽¹⁸⁾.

Por tal motivo, diversos estudios se han centrado en las pruebas de sensibilidad antifúngica *in vitro* contra *Fusarium* spp. ^(2,9,11,12,33,67,133). En éstos, se ha demostrado que anfotericina B tiene buena actividad *in vitro*, mientras que los azoles, caspofungina y terbinafina no fueron activos. Por otro lado algunas especies de *Fusarium* muestran CMI altas para este fármaco ^(9,12,27,33,38,39,89); en el presente trabajo los resultados obtenidos para AMB mostraron que el 71% de los aislados fueron sensibles (CMI \leq 1.0 μ g/mL) y el 29% intermedios (CMI=2 μ g/mL).

Al igual que los trabajos reportados en la literatura acerca del efecto *in vitro* de los azoles (imidazoles y triazoles de primera generación), en este trabajo no mostraron actividad frente a los aislados de *Fusarium*, los valores de CMI con FLZ (\geq 64.0), KTZ e ITZ (\geq 16.0) fueron altos y no se observó inhibición en el crecimiento del hongo. Por el contrario, en el ensayo realizado por Chávez y cols. en el 2010 ⁽²⁷⁾ con los triazoles de segunda generación (PSZ y VRZ), demostraron la actividad *in vitro* de VRZ frente a las especies de *Fusarium*, en el que se obtuvo una CMI promedio de 1.71 μ g/mL; sin embargo, este antifúngico mostró valores altos de CMI principalmente en *F. solani* ^(9,38). En el presente estudio los aislados identificados como *F. solani* presentaron resistencia frente a VRZ, mientras que dos de los aislados de *F. oxysporum* fueron sensibles, lo que concuerda con otros autores ^(9,89).

La actividad *in vitro* que ha mostrado PSZ frente a *Fusarium* depende de la especie causante de la infección; los aislados de *F. verticillioides* han presentado valores de sensibilidad, mientras que con *F. solani* de resistencia ^(67,124). Lozano-Chiu y cols. en 1999 ⁽⁶⁷⁾ demostraron el efecto de PSZ contra *F. solani in vivo* en ratones inmunosuprimidos y en infección sistémica por *Fusarium*. Estos autores concluyeron que los resultados que obtuvieron dependieron de la dosis y de la duración del tratamiento.

Las equinocandinas (ANF y CSF), TRB y NTC, no presentaron actividad frente a los aislados de *Fusarium* spp., ya que en el caso de anidulafungina y caspofungina las especies presentan resistencia intrínseca.

En la literatura no se ha reportado pruebas de sensibilidad *in vitro* para *Fusarium* spp., en donde se utilice bromuro de cetiltrimetilamonio, por lo que no se sabe si las especies son sensibles, intermedias o resistentes. En el presente estudio este antimicrobiano mostró valores de CMI de 2 µg/mL, fue evidente la inhibición en el crecimiento del hongo, aunque los valores de CMI corresponderían a intermedio comparado con otros antifúngicos.

Debido a la resistencia inherente de las especies de *Fusarium* a diversos grupos de antifúngicos de uso rutinario en la clínica llevó a diversos investigadores a plantearse estrategias para lograr la erradicación del hongo de los tejidos y curación del hospedero. Estas estrategias incluyeron combinaciones de antifúngicos, procedimientos médicos y la administración de antifúngicos ^(47,120,128). Por otro lado, el tratamiento con dos o más antifúngicos en infecciones diseminadas por *Fusarium* para solucionar el problema de la baja o nula respuesta, o de la resistencia al antifúngico con resultados variables. ^(40,51,56,118). Vagace y cols. ⁽¹²⁸⁾ reportaron curación de este tipo de infección en un paciente pediátrico con leucemia aguda al cual le administraron AMB liposomal, le añadieron CSF y el mantenimiento con VRZ con remisión de infección por *Fusarium*. Tamez-Peña y cols. ⁽¹²⁰⁾ reportaron un caso de endoftalmitis endógena el cual fue tratado con NTC tópica, FLZ oral y AMB intravítrea mostrando resolución de la infección. Por el contrario, en el caso presentado por Gómez-Valcárcel y cols. ⁽⁴⁷⁾ el paciente con queratitis no respondió al tratamiento con VRZ tópico e ITZ sistémico, por lo que se realizó evisceración del ojo afectado. El tratamiento de las infecciones invasivas por *Fusarium* también ha mostrado resultados variables. Summerbell y cols., en 1988 ⁽¹¹⁸⁾ y Fanci y cols. en 2013 ⁽⁴⁰⁾ reportaron algunos casos tratados con las combinaciones AMB+flucitosina y AMB+VRZ, respectivamente; en ambos casos sin mostrar respuesta favorable. Hidalgo-Parra ⁽⁵⁶⁾ presentó dos casos tratados con AMB+VRZ y AMB+ITZ, ambos pacientes fallecieron. Finalmente, Hernández-Cruz en 2011 ⁽⁵¹⁾ describió un caso en el cual el paciente respondió favorablemente al tratamiento con la combinación AMB+FLZ.

Desde el año 1995 en el que se iniciaron los ensayos *in vitro* sobre diversas combinaciones de antifúngicos contra levaduras han aumentado el uso de estas pruebas basadas en la asociación de antifúngicos con diferentes mecanismos de acción contra especies multi-resistentes tanto en hongos levaduriformes como filamentosos, sobre todo en la última década. Sin embargo, son pocos los estudios realizados con los aislados de *Fusarium* spp. ^(49,50,55,101,116,132). Uno de ellos, es el descrito por Arikan y cols. en 2002 ⁽¹⁰⁾, en donde demostraron que la combinación de AMB y CSF mostró un efecto sinérgico en todos los aislados de *F. oxysporum* y en el 25% de *F. solani*. En cambio en el presente

trabajo la asociación de estos dos antifúngicos presentó un efecto indiferente en todos los aislados de *Fusarium*, independientemente de la especie. Sin embargo, fue evidente la inhibición hasta seis diluciones en el crecimiento del hongo.

Las pruebas presentadas por Venturini y cols. ⁽¹³²⁾, en las cuales combinaron antifúngicos (AMB y VRZ) con antimicrobianos como azitromicina, ciprofloxacino, ibuprofeno, entre otros; la mayoría de las combinaciones de ambos antifúngicos con los otros fármacos mostraron un efecto indiferente.

El estudio más reciente publicado por Spader y cols. en 2013 ⁽¹¹⁶⁾, en el que la combinación de azoles de diversas generaciones (VRZ+ITZ, VRZ+FLZ, VRZ+KTZ) e ITZ+flucitosina, mostraron un efecto indiferente en el 60-100% de los aislados de *Fusarium* spp. Mientras que en las combinaciones entre alilaminas y triazoles (VRZ+TRB e ITZ+TRB), el efecto observado fue sinérgico en el 60-100% de los aislados de *Fusarium*. En el presente estudio la combinación de VRZ+TRB fue sinérgico en uno de los aislados (FS4) el cual correspondió a *F. solani*; y en los restantes el efecto fue indiferente.

En el presente trabajo, de las 13 combinaciones realizadas el 92% tuvo un efecto indiferente y el 8% efecto antagónico. Otro de los hallazgos notorios fue que la interacción de los antifúngicos favorecía a uno de ellos, al disminuir la CMI, pero aumentaba la CMI del otro antifúngico en una o dos diluciones, por ejemplo, la combinación de AMB+CSF donde la CMI de CSF en 4/7 de los aislados disminuyó de 16 a 0.25 µg/mL; por el contrario la CMI de AMB aumentó de 0.5 a 1.0 µg/mL. Por otro lado, la combinación entre AMB+NTM y VRZ+CTR fue notoria la disminución de la CMI de NTM en 6/7 de los aislados de 32 a 0.5 µg/mL y de VRZ de 16 a 0.25 µg/mL.

VII. CONCLUSIONES

- ❖ Por las características macroscópicas y microscópicas de las colonias de los aislados de *Fusarium* en los cuatro medios de cultivo empleados (AA, ADS, APD y AEM), se identificaron las especies *F. solani* y *F. oxysporum*.
- ❖ Por las pruebas de sensibilidad *in vitro* por el método de microdilución en caldo, el antifúngico que mostró la mayor actividad fue anfotericina B, con una CMI promedio de 1.1 µg/mL.
- ❖ La combinación de AMB con cinco de los antifúngicos potencializó su efecto hasta en seis diluciones.
- ❖ El efecto sinérgico se observó con la combinación de VRZ y TRB.
- ❖ El 92% de las combinaciones mostraron un efecto indiferente.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Abawi GS, Lorbeer JW. Several Aspects of the ecology and pathology of *Fusarium oxysporum* f. sp. cepae. *Phytopathology*. 1972; 62: 870-876.
2. Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Monzón A, Mellano E, Rodríguez-Tudela JL. Antifungal susceptibility profile of clinical *Fusarium* spp. isolates identified by molecular methods. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2008. 61: 805-809.
3. Allevato MA, Negroni R, Galimberti R. Antifúngicos. Ayer, hoy y mañana. *Act Terap Dermatol*. 2007; 30:8-16.
4. Álvarez F, Figueras C, Roselló C. Infecciones fúngicas invasivas emergentes. *An. Pediatr*. 2010. 73: 52.e1-52.e6.
5. Alvarado-Castillo B, Vázquez-Maya L, Tenorio G, Bonifaz A, Rodríguez-Reyes A. 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.
6. Anaisse EJ, Kuchar RT, Rex JH, Francesconi A. Fusariosis associated with pathogenic *Fusarium* species colonization of a hospital water system: a new paradigm for the epidemiology of opportunistic mold infections. *Clin Infec Dis*. 2001; 33: 1871-1878.
7. Arenas R, Ocejo D. Onicomicosis: frecuencia actual en un departamento de dermatología de la Ciudad de México. *Dermatol Rev Mex*. 1997. 45:171-175.
8. Arenas R. Dermatofitosis en México. *Rev Iberoam Micol*. 2002; 19: 63-67.
9. Arikan S, Lozano-Chiu M, Paetznick V, Nangia S, Rex J. Microdilution susceptibility testing of amphotericin B, itraconazole, and voriconazole against clinical isolates of *Aspergillus* and *Fusarium* species. *J Clin Microbiol*. 1999; 37: 3946-3951.
10. Arikan S, Lozano-Chiu M, Paetznick, Rex J. *In vitro* synergy of caspofungin and amphotericin B against *Aspergillus* and *Fusarium* spp. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; 46: 245-247.
11. Azor M, Gené J, Cano J, Guarro J. Universal *in vitro* antifungal resistance of genetic clades of the *Fusarium solani* species complex. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2007; 51: 1500-1503.
12. Azor M, Gené J, Cano J, Manikandan P, Venkataphaty N, Guarro J. Less-frequent *Fusarium* species of clinical interest: Correlation between morphological and molecular identification and antifungal susceptibility. *J. Clin. Microbiol*. 2009; 47: 1463-1468.

13. Ballesté R, Mousqués N, Gezuele E. Onicomicosis. Revisión del tema. *Rev Med Uruguay*. 2003; 19: 93-106.
14. Barchiesi F, Gallo D, Caselli F, Falconi L, Arzeni D, Giacometti A, Scalise G. In-vitro interactions of itraconazole with flucytosine against clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. *J Antimicrob Chemother*. 1999; 44: 65-70.
15. Barchiesi F, Schimizzi AM, Caselli F, Novelli A, Fallani S, Giannini D, Arzeni D, Di Cesare S, Falconi L, Fortuna M, Giacometti A, Carle F, Mazzei T, Scalise G. Interactions between triazoles and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 49: 2435-2441.
16. Barchiesi F, Schimizzi AM, Najvar LK, Bocanegra R, Caselli F, Di Cesare S, Giannini D, Falconi L, Giacometti A, Carle F, Scalise G, Graybill JR. Interactions of posaconazole and flucytosine against *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; 45: 1355-1359.
17. Bonifaz JA. *Micología Médica Básica*. Mc Graw Hill. México, 2010; pp. 394-397.
18. Campos-Macías P, Arenas-Guzmán R, Hernández-Hernández F. *Fusarium subglutinans*: A new eumycetoma agent. *Med Mycol Case Reports*. 2013; 2: 128-131.
19. Cantón E, Pemán J, Romero M, Gobernado M. Utilidad del E-test® y sus condiciones de ensayo en el estudio de la interacción de los antifúngicos. *Rev Esp Quimioterap*. 2004; 17: 48-56.
20. Cantón E, Martín E, Espinel-Ingroff A. Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A-, M38-A y M44-A). *Rev Iberoam Micol*. 2007; 15a, 15b: 15a1-15a17, 15b1-15b6.
21. Carneiro HA, Coleman JJ, Restrepo A, Mylonakis E. *Fusarium* infection in lung transplant patients: report of 6 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 2011; 90: 69-80.
22. Carrada T. Las micosis humanas en México. *Bol Méd Hosp Infant Méx*. 1987; 44: 116-125.
23. Carrillo-Muñoz JA, Brio S, Quindós G. Una nueva generación de fármacos antifúngicos. *Rev Iberoam Micol*. 2001; 18: 18-25.
24. Catalán M, Montejo JC. Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética. *Rev Iberoam Micol*. 2006; 23: 39-49.
25. Cavallera E, Asbati M. Onicomicosis por hongos filamentosos no dermatofitos. *Dermatología Venezolana*. 2006; 44: 4-10.

26. Chatuverdi V, Ramani R, Ghannoum MA, Killian SB, Holliday N, Knapp C, Ostrosky-Zeichner L, Messer SA, Pfaller MA, Iqbal NJ, Arthington-Skaggs BA, Vazquez JA, Sein T, Rex JH, Walsh TJ. Multilaboratory testing of antifungal combinations against a quality control isolate of *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52: 1500-1502.
27. Chavez J, Rivas P, Cortés J, Cuervo S, Sánchez R, Parra C. Sensibilidad *in vitro* de hongos miceliales de aislamientos clínicos en pacientes con cáncer en el Instituto Nacional de Cancerología ESE. *Rev Infectio*. 2010; 14: S116-S126.
28. Clinical and Laboratory Standards 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.
29. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard, 2nd ed, M38-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne PA, 2008.
30. Consigny S, Dhedin A, Choquet S, Leblond V, Chosidow O. Successful voriconazole treatment of disseminated *Fusarium* infection in an immunocompromised patient. *Clin Infect Dis*. 2003; 37: 311- 313.
31. Cuenca-Estrella M, Alastruey-Izquierdo A, Alcazar-Fuoli L, Bernal-Martinez L, Gomez-Lopez A, Buitrago M, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL. *In vitro* activities of 35 double combinations of antifungal agents against *Scedosporium apiospermum* and *Scedosporium prolificans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52: 1136-1139.
32. Cuenca-Estrella M. Antifúngicos en el tratamiento de las infecciones sistémicas: importancia del mecanismo de acción, espectro de actividad y resistencias. *Rev Esp Quimioter*. 2010; 23: 169-176.
33. Diekema DJ, Messer SA, Hollis RJ, Jones RN, Pfaller MA. Activities of caspofungin, itraconazole, posaconazole, ravuconazole, voriconazole, and amphotericin B against 448 recent clinical isolates of filamentous fungi. *J Clin Microbiol*. 2003; 41: 3623-3626.
34. Dignani M.C, Anaissie E. Human fusariosis. *Clin Biol Infect*. 2004; 10: 65-75.
35. Diomedi PA. Nuevos antifúngicos: Las equinocandinas. *Rev Chil Infect*. 2004; 21: 89-101.
36. Eliopoulos GM, Pillai SK, Moellering RC. Antimicrobial Combinations. En: Lorian V. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Lippincott Williams & Wilkins. 2005, pp. 365-406.
37. Escobar ML, Carmona-Fonseca J. Onicomiosis por hongos ambientales no dermatofílicos. *Rev Iberoam Micol*. 2003; 20: 6-10.

38. Espinel-Ingroff A. *In vitro* activity of the new triazole voriconazole (UK-109, 496) against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and common and emerging yeast pathogens. *J Clin Microbiol.* 1998; 36: 198-202.
39. Espinel-Ingroff A, Bartlett M, Bowden R, Chin NX, Cooper C, Fothergill JA, McGinnis MR, Menezes P, Messer SA, Nelson PW, Odds FC, Pasarell L, Peter J, Pfaller MA, Rex JH, Rinaldi MG, Shankland GS, Walsh TJ, Weitzman I. Multicenter evaluation of proposed standardized procedure for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. *J Clin Microbiol.* 1997. 35: 139-143.
40. Fanci R, Pini G, Bartolesi AM, Pecile P. Refractory disseminated fusariosis by *Fusarium verticillioides* in a patient with acute myeloid leukaemia relapsed after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: A case report and literature review. *Rev Iberoam Micol.* 2013; 30: 51-53.
41. Franzot SP, Casadevall A. Pneumocandin L-743,872 enhances the activities of amphotericin B and fluconazole against *Cryptococcus neoformans* *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41: 331-336.
42. Gadea I, Cuenca-Estrella M. Recomendaciones para el diagnóstico micológico y estudios de sensibilidad a los antifúngicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004; 22:32-39.
43. García-Ruiz JC, Amutio E, Pontón J. Infección fúngica invasora en pacientes inmunodeficientes. *Rev Iberoam Micol.* 2004; 21: 55-62.
44. Giraldo C, Velásquez MM, Correa LA. Infección diseminada por *Fusarium* spp. en un paciente con anemia aplásica. *Rev Asoc Colomb Dermatol.* 2010; 18: 225-32.
45. Girmenia C, Iori AP, Boecklin F, Torosantucci A, Chiani P, De Fabritiis P, Taglietti F, Cassone A, Martino P. *Fusarium* infections in patients with severe aplastic anemia: review and implications for management. *Haematologica.* 1999; 84: 114-118.
46. Girmenia C, Pagano L, Corvatta L, Mele L, Del Favero A, Martino P. The epidemiology of fusariosis in patients with haematological diseases. *British Journal of Haematology.* 2000; 111: 272-276.
47. Gómez-Valcárcel M, Rodríguez-Reyes AA, Vanzzini-Zago V, Angel-Muñoz EU. Queratitis infecciosa mixta secundaria a trauma con piedra de cocaína. *Rev Mex Oftalmol.* 2009; 83: 116-118.
48. Gregori-Valdés BS. Estructura y actividad de los antifúngicos. *Rev Cubana Farm.* 2005; 39: 1-15.

49. Guarro J, Pujol I, Mayayo E. *In vitro* and *in vivo* experimental activities of antifungal agents against *Fusarium solani*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43: 1256-1257.
50. Gupta AK, Kohli Y. *In vitro* susceptibility testing of ciclopirox, terbinafine, ketoconazole and itraconazole against dermatophytes and nondermatophytes, and *in vitro* evaluation of combination antifungal activity. *Brit J Dermatol.* 2003; 149: 296-305.
51. Hernández-Cruz C, Núñez-Quintana A, Rodríguez-Fraga Y, Carnot-Uria J, Muñío-Perurena J, Pérez-Román G, Chávez-Medina R, Moya-Pérez I, Llanes-Rodríguez N, Hart-Casares M. Sepsis sistémica por *Fusarium solani* en pacientes con leucemias agudas. Reporte de dos casos. *Rev Hematol Mex.* 2011; 12: 287-292.
52. Hernández-Hernández F, Córdova-Martínez E, Manzano-Gayosso P, López-Álvarez R, Bazán-Mora E, López-Martínez R. Frecuencia de micosis en pacientes inmunosuprimidos de un hospital regional de la Ciudad de México. *Salud pública Mex.* 2003; 45: 455-460.
53. Hernández M, Pascualini F, Serra M, Garay I, Kurpis M, Ruiz-Lascano A. Fusariosis diseminada en un paciente inmunocomprometido. *Arch Argent Dermatol.* 2011; 61: 163-166.
54. Herrán P, López H, Fierro-Arias L, Ponce RM, Hernández MA, Bonifaz A. Paroniquia micótica por *Fusarium solani*: reporte de caso y revisión de la literatura. *Dermatología CMQ.* 2012; 10: 139-142.
55. Heyn K, Tredup A, Salvenmoser S, Müller FM. Effect of voriconazole combined with micafungin against *Candida*, *Aspergillus*, and *Scedosporium* spp. and *Fusarium solani*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49: 5157-5159.
56. Hidalgo-Parra I, Garaguso G, Galimberti G, Galimberti R, Kowalczyk A. Fusariosis diseminada en síndrome linfoproliferativo. 2008: 191-195.
57. Ho DY, Lee JD, Rosso F, Montoya JG. Treating disseminated fusariosis: amphotericin B, voriconazole or both? *Mycoses.* 2007; 50: 227-231.
58. Hof H. Critical annotations to the use of azole antifungals for plant protection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 45: 2987-2990.
59. Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. Atlas of clinical fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures Utrecht, The Netherlands, 2000, pp. 681-705.
60. Ireta JM. Roña o tizón de la espiga de trigo (*Fusarium graminearum* Schwabe). CIMMYT. 1994. pp. 2-10.

61. Joffe AZ. A morfer system of *Fusarium* taxonomy. *Mycopathol Mycol Appl*. 1974; 53: 201-228.
62. Kirkpatrick WR, Vallor AC, McAtee RK, Ryder NS, Fothergill AW, Rinaldi MG, Patterson TF. Combination therapy with terbinafine and amphotericin B in a rabbit model of experimental invasive aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49: 4751-4753.
63. Lewis RE, Diekema DJ, Messer SA, Pfaller MA, Klepser ME. Comparison of Etest, checkerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. *J Antimicrob Chemother*. 2002; 49: 345-351.
64. Lizaso D, Aguilera K, Yantorno L, Cuitiño M, Pérez L, Roccia I, Fortunato E, Parra G, Lares M, Mestroni S, Esposto A. Infección fúngica oportunista en un trabajador rural viviendo con VIH/sida. *Actualizaciones en SIDA*. 2009; 17: 18-23.
65. Lizasoain M, Aguado JM. Fármacos antifúngicos. En Lorenzo P, Lorenzo-Velázquez B, Moreno A, Lizasoain I, Leza JC, Moro MA, Portolés A. *Farmacología básica y clínica*. Ed. Médica Panamericana, 2008, pp. 957-972.
66. López-Martínez R, Méndez-Tovar LJ, Bonifaz A, Arenas R, Mayorga J, Welsh O, Vera-Cabrera L, Padilla-Desgarenes MC, Contreras C, Chávez G, Estrada R, Hernández-Hernández F, Manzano-Gayosso P. Actualización de la epidemiología del micetoma en México. Revisión de 3, 933 casos. *Gac Méd Méx*. 2013; 149: 586-592.
67. Lozano-Chiu M, Arikian S, Paetznick VL, Anaissie J, Loeberg D, Rex JH. Treatment of murine fusariosis with SCH 56592. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1999; 43: 589-591.
68. Lynn Jr. *Fusarium* keratitis treated with cycloheximide. *Am J Ophthalmol*. 1964; 58: 637-641.
69. Mallo-García S, Coto-Segura P, Juanes-Jiménez JS. Onicomycosis blanca subungueal proximal por *Fusarium*. *Actas Dermosifiliogr*. 2008; 99: 739-747.
70. Manzano-Gayosso P, Méndez-Tovar LJ, Hernández-Hernández F, López-Martínez R. La resistencia a los antifúngicos: un problema emergente en México. *Gac Méd Méx*. 2008; 144: 23-26.
71. Mellado E, Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL. Importancia clínica de los mecanismos de resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2002; 20: 523-530.

72. Méndez-Tovar LJ, López-Martínez R, Macotella-Ruíz E, Manzano-Gayosso P, Serrano-Jaen L, Carmona-Castañón A, Mondragón-Gonzalez R. Variación en la frecuencia de micosis en México. *Rev Argent Microbiol.* 1999; 31: 107-113.
73. Méndez-Tovar LJ, Lemini-López A, Hernández-Hernández F, Manzano-Gayosso P, Blancas-Espinosa R, López-Martínez R. Frecuencia de micosis en tres comunidades de la sierra norte de Puebla. *Gac Méd Méx.* 2003; 139: 118-122.
74. Méndez-Tovar LJ, Manzano-Gayosso P, Rangel-Berruecos A, Silva-González I, Hernández-Hernández F, López-Martínez R. Frecuencia de onicomicosis por hongos filamentosos no dermatofitos en un hospital de tercer nivel. *Dermatol Rev Mex.* 2013; 57: 235-239.
75. Mesa-Arango AC, Bueno-Sánchez JG, Betancur-Galvis LA. Productos naturales con actividad antimicótica. *Rev Esp Quimioterap.* 2004; 17: 325-331.
76. Miranda H. Fernández W. Sánchez V. Keratomycosis: Presentation of 3 cases caused by *Fusarium* sp. *Mycopathol Mycol Appl.* 1969; 37: 179-185.
77. Mitchell TG. Kingdom Fungi: fungal phylogeny and systematic. En Topley and Wilson's. *Microbiology and microbial infections. Medical Mycology.* London, 2005: pp. 50-58.
78. Monzón A, Rodríguez JL. Infecciones causadas por el género *Fusarium*. Centro de investigaciones microbiológicas. 2000.
79. Morales CA, Solórzano A, Rojas AP. Características epidemiológicas y clínicas de las onicomicosis causadas por *Fusarium* spp. en un centro de referencia de Bogotá, Colombia, 2001-2010. *Rev Asoc Colomb Dermatol.* 2013; 21: 21-28.
80. Mosquera J, Sharp A, Moore CB, Warn PA, Denning DW. *In vitro* interaction of terbinafine with itraconazole, fluconazole, amphotericin B and 5-flucytisine against *Aspergillus* spp. *J Antimicrob Chemother.* 2002; 50: 189-194.
81. Mukherjee P, Sheehan D, Hitchcock C, Ghannoum M. Combination treatment of invasive fungal infections. *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18: 163-194.
82. Naar U, Zárate R, Batista R. Fusariosis Diseminada. *Pediátr Panamá.* 2005. 34:27-32.
83. Navarro-Risueño F, Cuenca-Estrella M, Pumarola-Suñé T. Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos. En Ausina-Ruiz V. Moreno-Guillén S. Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Ed. Médica Panamericana. 2006, pp. 153, 160-165.
84. Nelson PE. History of *Fusarium* Systematics. *Phytopathology.* 1991; 81: 1045-1048.

85. Nelson PE, Dignani MC, Anaissie EJ. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clin Microbiol Rev.* 1994; 7: 479-504.
86. Nguyen MH, Barchiesi F, McGough DA, Yu VL, Rinaldi MG. *In vitro* evaluation of combination of fluconazole and flucytosine against *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; 39: 1691-1695.
87. Nucci M, Anaissie EJ, Queiroz-Telles F. Outcome predictors of 84 patients with hematologic malignancies and *Fusarium* infection. *Cancer.* 2003; 98: 315-319.
88. Nucci M, Anaissie EJ. Emerging fungi. *Infect Dis Clin N Am.* 2006; 20:563-569.
89. Nucci M, Anaissie EJ. *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev.* 2007; 20: 695-704.
90. Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J of Antimicrob Chemother.* 2003; 52: 1.
91. Olivares R, Alfaro J, Díaz MC, Thompson L. Fusariosis diseminada por *Fusarium oxysporum* en un paciente adulto con leucemia mieloide aguda y neutropenia severa febril. *Rev Chil Infect.* 2005. 22; 356-360.
92. Payá E, Zubieta M, Díaz C, Piontelli E. Fungemia asociada a colonización de catéter venoso permanente por *Fusarium oxysporum* en un paciente pediátrico con cáncer. *Rev Chil Infect.* 2000; 17:34-38.
93. Pemán J, García-Paredes P. Medicamentos Antifúngicos. En Ausina-Ruiz V, Moreno-Guillén S. Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Ed. Médica Panamericana. 2006, pp. 117-124.
94. Perea S, Gonzalez G, Fothergill AW, Kirkpatrick WR, Rinaldi G, Patterson F. *In vitro* interaction of caspofungin acetate with voriconazole against clinical isolates of *Aspergillus* spp. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46: 3039-3041.
95. Perez JL, Guna R, Orta N, Gimeno C. Nuevos azoles: voriconazol. Control Calidad SEIMC. 2003.
96. Perfect J, Marr K, Walsh T, Greenberg R, DuPont B, Torre-Cisneros J, Just-Nübling G, Schlamm H, Lutsar I, Espinel-Ingroff A, Johnson E. Voriconazole Treatment for less-common, emerging, or refractory fungal infections. *Clin Infect Dis.* 2003; 36: 1122-1131.
97. Perz M. *Fusarium nivale* as a cause of corneal mycosis. *Klin Oczna.* 1966; 36: 609-612.
98. 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.

99. Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, Boyken L, Huynh H, Hollis RJ. Clinical evaluation of a frozen commercially prepared microdilution panel for antifungal agents, including the new triazoles posaconazole, ravuconazole, and voriconazole. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 1694-1697.
100. Pfaller MA, Pappas PG, Wingard JR. Invasive fungal pathogens: Current epidemiological trends. *Clin Infect Dis.* 2006; 43: S3-S14.
101. Pfaller MA, Messer SA, Georgopapadakou N, Martell LA, Besterman JM, Diekema DJ. Activity of MGCD290, a Hos2 histone inhibitor, in combination with azole antifungals against opportunistic fungal pathogens. *J Clin Microbiol.* 2009; 47: 3797-3804.
102. Philip A, Odabasi Z, Rodriguez J, Paetznick VL, Chen E, Rex JH, Ostrosky-Zeichner L. *In vitro* synergy testing of anidulafungin with itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against *Aspergillus* spp. and *Fusarium* spp. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49: 3572-3574.
103. Pontón J. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Rev Iberoam Micol.* 2008; 25: 78-82.
104. Porturas D. Efectividad de la asociación cetrimida-clorhexidina 15%/0.15% frente a clorhexidina 2% en la erradicación de biofilms de *Enterococcus faecalis*. 2011. Tesis profesional. Facultad de Odontología, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú. 92 pp.
105. Raad I, Tarrand J, Hanna H, Albitar M, Janssen E, Boktur M, Bodey G, Mardani M, Hachem R, Kontoyiannis D, Whimbey E, Rolston K. Epidemiology, molecular mycology, and environmental sources of *Fusarium* infections in patients with cancer. *Infection Control and Hospital Epidemiology.* 2002; 23: 532-537.
106. Restrepo MA, Robledo RJ, Leiderman WE, Restrepo IM, Botero RD, Bedoya EV. Enfermedades infecciosas. Corporación para investigaciones biológicas. 2003; 299, 300.
107. Rex JH, Pfaller MA, Rinaldi MG, Polak A, Galgiani JN. Antifungal susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev.* 1993; 6: 367-381.
108. Rodríguez JC, Vega N, Plaza C, Fernández A, Santamaría P, Palop L. Peritonitis fúngica en diálisis peritoneal continua ambulatoria. *Nefrología.* 1988; 8: 31-36.
109. Rush-Munro FM, Black H, Dingley JM. Onychomycosis caused by *Fusarium oxysporum*. *Australas J Dermatol.* 1971; 12: 18-29.

110. Sagnelli C, Fumagalli L, Prigitano A, Baccari P, Magnani P, Lazzarin A. Successful voriconazole therapy of disseminated *Fusarium verticillioides* infection in immunocompromised patients receiving chemotherapy. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 57: 796-798.
111. Salas-Campos I, Hernández-Chavarría F. *Fusarium* como agente etiológico de onicomicosis. *Rev Costarroc Cienc Med.* 2005; 26:53-59.
112. Sampathkumar P, Paya CV. *Fusarium* infection after solid-organ transplantation. *Clin Infect Dis.* 2001; 32:1237-1240.
113. Santamarina MP, Roselló J, Barceló S, Marín S. Efecto de la actividad de agua y de la temperatura sobre el comportamiento de *Penicillium oxalicum* frente a *Fusarium oxysporum*. *Rev Iberoam Micol.* 2003; 20: 154-159.
114. Scott B. Métodos para evaluar la efectividad antimicrobiana. Diagnóstico microbiológico. Ed. Panamericana. 1989, pp. 190-209.
115. Smith SN. An overview of ecological and hábitat aspects in the genus *Fusarium* with special emphasis on the soil-borne pathogenic forms. *Plant Pathol Bull.* 2007; 16: 97-120.
116. Spader TB, Venturini TP, Rossato L, Denardi LB, Cavalheiro PB, Botton SA, Santurio JM, Hartz SA. Synergism of voriconazole or itraconazole with other antifungal agents against species of *Fusarium*. *Rev Iberoam Micol.* 2013; 1-5.
117. Steinbach WJ, Schell WA, Blankenship JR, Onyewu C, Heitman J, Perfect JR. *In vitro* interactions between antifungals and immunosuppressants against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48: 1664-1669.
118. Summerbell RC, Richardson SE, Kane J. *Fusarium proliferatum* as an agent of disseminated infection in an immunosuppressed patient. *J Clin Microbiol.* 1988; 26: 82-87.
119. Sugar AM, Hitchcock CA, Troke PF, Picard M. Combination therapy of murine invasive candidiasis with fluconazole and amphotericin B. *Antimicrobial Agents Chemother.* 1995; 39: 598-601.
120. Tamez-Peña A, González-González LA, López-Jaime G, Rodríguez-García A. Endofalmitis endógena por *Fusarium* spp. en un paciente con onicomicosis. *Rev Mex Oftalmol.* 2010; 84: 122-126.
121. Tapia P CV. An update on antifungal susceptibility testing. *Rev Chil Infect.* 2009; 26: 144-150.

122. Te Dorsthorst TA, Verweij PE, Meis GM, Punt NC, Mouton JW. Comparison of fractional inhibitory concentration index with response surface modeling for characterization of *in vitro* interaction of antifungal against itraconazole-susceptible and –resistant *Aspergillus fumigates* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46: 702-707.
123. Teixeira-Santos R, Rocha R, Moreira-Rosário A, Monteiro-Soares M, Cantón E, Rodrigues AG, Pina-Vaz C. Novel method for evaluating *in vitro* activity of anidulafungin in combination with amphotericin B or azoles. *J Clin Microbiol.* 2012; 50: 2748-2754.
124. Tortorano AM, Prigitano A, Esposito MC, Arsic Arsenijevic V, Kolarovic J, Ivanovic D, Paripovic L, et al. European confederation of Medical Mycology (ECMM) epidemiological survey on invasive infection due to *Fusarium* species in Europa. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014.
125. Tosti A, Piraccini BM, Lorenzi S. Onychomycosis caused by nondermatophytic molds: Clinical features and response to treatment of 59 cases. *J Am Acad Dermatol.* 2000; 42: 217-224.
126. Trejos-López EJ. Evaluación de parámetros para pruebas de susceptibilidad antifúngica en hongos filamentosos mediante la técnica de difusión en agar. Tesis profesional. Facultad de Ciencias, Universidad Javeriana, Colombia. 2009.
127. Ulloa M. Herrera T. Etimología e iconografía de géneros de hongos. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. 1994. pp. 109.
128. Vagace JM, Sanz-Rodriguez C, Casado MS, Alonso M, Garcia-Dominguez M, de la Llana FG, Zarallo L, Bajo R. Resolution of disseminated fusariosis in a child with acute leukemia treated with combined antifungal therapy: a case report. *BMC Infect Dis.* 2007; 7: 40-43.
129. 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 Iberoam Micol.* 2010; 27: 57-61.
130. Vargas H. Patógenos emergentes en micosis cutáneas y sistémicas. *Dermatología Venezolana.* 2004; 42: 4-18.
131. Vásquez-del Mercado E, Arenas R. Micosis oportunistas en pacientes inmunocomprometidos. *Gac Méd Méx.* 2008; 144: 131-133.

132. Venturini TP, Rossato L, Spader T, Tronco-Alves GR, Azevedo MI, Weiler CB, Santurio JM, Hartz AS. In vitro synergisms obtained by amphotericin B and voriconazole associated with non-antifungal agents against *Fusarium* spp. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2011; 71: 126-130.
133. Wang H, Xiao M, Kong F, Chen S, Dou HT, Sorell T, Li RY, Xu YC. Accurate and practical identification of 20 *Fusarium* species by seven-locus sequence analysis and reverse line blot hybridization, and *in vitro* antifungal susceptibility study. *J Clin Microbiol*. 2011; 49: 1890-1898.
134. White RL, Burgess DS, Manduru M, Bosso JA. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996; 40: 1914-1918.
135. Whiteside T. Annals of the cold war: The yellow rain complex. *New Yorker* 1991; 66: 52-62.
136. Yli-Mattila T. Ecology and evolution of toxigenic *Fusarium* species in cereals in Northern Europe and Asia. *J Plant Patol*. 2010; 92: 7-18.
137. Zapata-González F, Cardona-Castro N. Lo que debemos saber sobre los métodos de sensibilidad a los antifúngicos. *Rev CES Med*. 2012; 26: 71-83.
138. Zuluaga de CA, Bedout C, Tabares A, Cano LE, Restrepo A, Arango M, Manrique R. Comportamiento de los agentes etiológicos de las onicomicosis en un laboratorio de micología de referencia (Medellín 1994-2003). *Med Cutan Iber Lat Am*. 2005; 33: 251-256.

IX. APÉNDICE

Apéndice A

Tabla de abreviaturas.

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
AA	Agar avena
ABC	ATP binding cassette
ADS	Agar dextrosa de Sabouraud
AEM	Agar extracto de malta
AMB	Anfotericina B
AMR	Amorolfina
ANF	Anidulafungina
APD	Agar papa dextrosa
ATP	Adenosina trifosfato
CC	Control de crecimiento
CE	Control de esterilidad
CIM	Concentración mínima inhibitoria
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
CSF	Caspofungina
CTR	Cetrimonio (bromuro de cetiltrimetilamonio)
C-N	Enlace carbono-nitrogeno
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FDA	Food and Drug Administration
FIC	Concentración fraccionaria inhibitoria
FICI	Índice de la concentración fraccionaria inhibitoria
FLZ	Fluconazol
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
h/ hrs	Hora/horas
ITZ	Itraconazol
KTZ	Ketoconazol
µm	Micrómetros
ug/mL o µg/mL	Microgramos por mililitro
mili-Q	Sistema de agua ultrapura
mm	Milímetros
MSF	Major facilitators superfamily
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NTC	Natamicina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PSC	Posaconazol
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
TRB	Terbinafina
VRZ	Voriconazol
UFC	Unidad formadora de colonias
UFC/mL	Unidad formadora de colonias por mililitro

Apéndice B

Medios de cultivo

❖ Agar dextrosa de Sabouraud (ADS)

Medio utilizado para el aislamiento, identificación y conservación de hongos patógenos y saprófitos.

Composición:

Digerido péptico de tejido animal.....	5.0 g
Digerido pancreático de caseína.....	5.0 g
Dextrosa.....	40.0 g
Agar.....	15.0 g
Agua.....	1000 mL

pH final: 5.6 ± 0.2

Preparación:

- Disolver 65 g del polvo por litro de agua destilada.
- Calentar en agitación constante hasta disolver.
- Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.
- Distribuir en placas y dejar solidificar.

❖ Agar papa dextrosa (APD)

Medio utilizado para la estimulación de conidios, en la preparación de inóculos de hongos miceliales y en la estimulación de producción de pigmentos. Se utiliza con frecuencia en microcultivos para observar las características morfológicas.

Composición:

Infusión de papa.....	4.0 g
Dextrosa.....	20.0 g
Agar.....	15.0 g
Agua.....	1000 mL

pH final: 5.6 ± 0.2

Preparación:

- a. Rehidratar 39 g del medio en un litro de agua destilada.
- b. Calentar hasta ebullición con agitación constante.
- c. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.
- d. Enfriar aproximadamente a 45°C.
- e. Verter en placas y dejar solidificar.

❖ Agar extracto de malta (AEM)

Medio empleado para el aislamiento de hongos filamentosos y levaduriformes. Adecuado para la identificación de zigomicetos y especies de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, etc.

Composición:

Maltosa.....12.75 g

Peptona.....0.78 g

Dextrina.....2.75 g

Glicerol.....2.35 g

Agar.....15.00 g

Agua.....1000 mL

pH final: 4.7 ± 0.2

Preparación:

- a. Suspende 33.6 g del polvo en un litro de agua destilada.
- b. Calentar agitando frecuentemente hasta ebullición para disolver completamente.
- c. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
- d. Distribuir en placas y dejar solidificar.

❖ Agar harina de avena (AA)

Medio de cultivo utilizado para inducir la esporulación de hongos. Recomendado para la identificación de especies de *Acremonium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Phialophora*, *Scopulariopsis*, etc.

Composición:

Harina de avena.....100 g
Agar.....15 g
Agua.....1000 mL

Preparación:

- a. Disolver 100 g de avena en un litro de agua destilada.
- b. Calentar en agitación constante hasta ebullición, para disolver completamente.
- c. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.
- d. Vaciar en placas y dejar solidificar.

Cuando se requiera el medio inclinado en tubo, distribuirlo antes de esterilizar.

❖ RPMI 1640

El medio de cultivo sintético empleado para el método de microdilución en caldo es el RPMI 1640 con 2.05mM de L-glutamina y sin bicarbonato sódico, el cual tiene como buffer, ácido morfolino propano sulfónico (MOPS) 0.164 M, ajustado a pH 7±0.1.

Composición:

RPMI 1640.....10.40g
Buffer MOPS.....34.53g
Agua Mili-Q.....1000mL

Preparación:

- a. Disolver las cantidades indicadas de MOPS y RPMI 1640 en el agua, agitando hasta su completa disolución.
- b. Ajustar pH a 7.0, utilizando NaOH 1M o 1N.
- c. Aforar a 1000 mL.
- d. Esterilizar por filtración (unidades filtro 0.2 µm).
- e. Mantener a 4°C máximo 2 meses hasta su uso.