

**Actividad Antifúngica del voriconazol contra aislamientos clínicos de *Fusarium* sp.
en pacientes con onicomycosis**

NATALIA CASTRO LÓPEZ

**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE CIENCIAS
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ENFASIS EN MICOLOGÍA
BOGOTÁ
2006**

**Actividad Antifúngica del voriconazol contra aislamientos clínicos de *Fusarium* sp.
en pacientes con onicomicosis**

**Trabajo de grado para optar al Título de
Magíster en Ciencias biológicas énfasis en Micología
NATALIA CASTRO LÓPEZ**

Director(a)

MARIA CARIDAD CEPERO DE GARCÍA

Profesora Asociada

Departamento de Ciencias Biológicas

Laboratorio de Micología y Fitopatología Uniandes (LAMFU)

Co – Director (a)

SILVIA RESTREPO

Profesora Asistente

Departamento de Ciencias Biológicas

Laboratorio de Micología y Fitopatología Uniandes (LAMFU)

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

BOGOTÁ

2006

Dedicado a:

Mi mamá y mi papá

Porque son mi luz, mi ejemplo a seguir,
mi fuente de inspiración y superación

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus agradecimientos a:

Mis padres, porque son quienes me apoyan día a día y creen en mi en todo momento, mil gracias por hacer esto posible. A mi familia, especialmente a Valentina y Daniela a quienes quiero con toda el alma.

Maria Caridad Cepero de García, quien me mostró y enseñó el amor por los hongos, quien creyó en mi y quien me brindó la oportunidad de realizar este proyecto y muchas cosas más dentro del laboratorio.

Silvia Restrepo, por su apoyo, porque gracias a ella existe el LAMFU, porque quiere sacar lo mejor de cada estudiante, porque nos exige y porque nos muestra todo lo que podemos alcanzar.

Leticia Sopo, por abrirme las puertas del Laboratorio Especializado de Micología Médica, y permitir realizar este valioso trabajo.

Martha Lucia Arboleda por su colaboración en la identificación.

A toda la gente que está y estuvo en el LAMFU, porque son un gran apoyo, porque somos más que amigos, somos una familia. Porque ir cada día a trabajar es un placer, es compartir y ayudarse.

A mis amigos(as) del alma por que cada día me han dado alegrías aun en los tiempos más desesperados, porque son una luz en mi camino.

A Pfizer por brindarnos el principio activo del y los sensidiscos de voriconazol.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	4
1. Introducción	9
2. OBJETIVOS	11
2.1. Objetivo general.....	11
2.2. Objetivos específicos.....	11
3. MARCO TEORICO	12
3.1. Genero <i>Fusarium</i>	12
3.2. Taxonomía.....	12
3.3. <i>Fusarium</i> como agente de infecciones.....	14
3.3.1. Onicomycosis.....	15
3.3.1.1. <i>Fusarium</i> spp. como agente de Onicomycosis en Colombia.....	15
3.4. Agentes antifúngicos.....	16
3.4.1. Clasificación.....	16
3.4.2. Azoles.....	17
3.4.2.1. Mecanismo de acción.....	18
3.4.2.1.1. Voriconazol.....	18
3.5. Pruebas de susceptibilidad para hongos filamentosos.....	20
3.5.1. Metodología en caldo de la CLSI.....	20
3.5.2. Metodología de difusión en disco.....	21
4. METODOLOGIA	22
4.1. Tipo de estudio.....	22
4.2. Diseño experimental.....	22
4.3. Población estudiada.....	22
4.4. Criterios de inclusión.....	23
4.5. Criterios de exclusión.....	23
4.6. Toma de muestra e identificación de los aislamientos.....	23
4.7. Pruebas de Susceptibilidad en caldo (CLSI).....	24
4.8. Pruebas de susceptibilidad en disco (CLSI).....	25
4.10. Análisis de datos.....	27
5. RESULTADOS	28
5.1. Agentes etiológico aislados.....	28
5.2. Relación de sexo y onicomycosis por <i>Fusarium</i>	28
5.3. Relación de edad y onicomycosis por <i>Fusarium</i>	29
5.4. Relación de evolución y onicomycosis por <i>Fusarium</i>	30
5.5. RELACIÓN DE ENFERMEDAD DE BASE Y ONICOMICOSIS POR <i>Fusarium</i>	31
5.6. Relación entre diversos hábitos y la onicomycosis por <i>Fusarium</i>	31
5.7. Relación entre deporte y onicomycosis por <i>Fusarium</i>	34
5.8. Relación entre el tratamiento previo y la onicomycosis por <i>Fusarium</i>	34
5.9. Pruebas de susceptibilidad en caldo.....	35
5.10. Pruebas de susceptibilidad en difusión en disco.....	37
5.11. Selección de los aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> por RAPDs.....	40
6. ANÁLISIS DE RESULTADOS	44

7. CONCLUSIONES..... 52
BIBLIOGRAFIA..... 53
ANEXOS..... 57

Índice de figuras

<i>Figura 1. Esquema del diseño experimental usado en este estudio</i>	24
<i>Figura 2. Esquema de las diluciones en las microplacas (Concentraciones finales (ug/ml))</i>	25
<i>Figura 3. Espejo invertido para lectura visual</i>	27
<i>Figura 4. Frecuencia de las especies de Fusarium</i>	28
<i>Figura 5. Frecuencia de onicomycosis por Fusarium entre sexos</i>	29
<i>Figura 7. Tiempo de evolución de la onicomycosis por Fusarium</i>	30
<i>Figura 8. Frecuencia de las personas que se realizan manicura</i>	32
<i>Figura 9. Frecuencia de las personas que se realizan pedicura</i>	32
<i>Figura 11. Frecuencia de los pacientes que se bañan descalzos</i>	33
<i>Figura 12. Frecuencia de los pacientes que frecuentan las piscinas</i>	33
<i>Figura 13. Frecuencia de los pacientes que frecuentan los turcos o saunas</i>	34
<i>Figura 14. Frecuencia de los pacientes que se han realizado tratamientos previos</i>	35
<i>Figura 15. Resultados de la CIM para Fusarium sp. por microdilución en caldo</i>	36
<i>Figura 16. Resultados de la CIM para las especies de Fusarium por microdilución en caldo</i>	37
<i>Figura 17. Porcentaje de inhibición para F. solani método de difusión en disco</i>	38
<i>Figura 18. Porcentaje de inhibición para F. oxysporum método de difusión en disco</i>	39
<i>Figura 19. Porcentaje de inhibición para F. moniliforme método de difusión en disco</i>	39
<i>Figura 20. Agrupación de los aislamientos con el cebador OPA 2</i>	41
<i>Figura 21. Agrupación de los aislamientos con el cebador OPA 2</i>	41
<i>Figura 22. Agrupación de los aislamientos con el cebador OPA 2</i>	41
<i>Figura 23. Agrupación de los aislamientos con el cebador OPA 13</i>	42
.....	42
<i>Figura 24. Agrupación de los aislamientos con el cebador OPA 4</i>	43
.....	43
<i>Figura 20. Esquema de siembra en CLA</i>	59

Índice de Tablas

<i>Tabla 1. Clases de antifúngicos, ejemplos y formulación.....</i>	<i>17</i>
<i>Tabla 2. Resumen de la metodología propuestas para hongos filamentosos M38-A tomado de National Committee for Clinical Laboratory Standard. 1998.....</i>	<i>20</i>
<i>Tabla 3. Frecuencia de las especies del género Fusarium aisladas a partir de pacientes con onicomicosis</i>	<i>28</i>
<i>Tabla 4. Tiempo de Evolución de la onicomicosis por Fusarium</i>	<i>30</i>
<i>Tabla 5. Frecuencia de las Enfermedades de Base.....</i>	<i>31</i>
<i>Tabla 6. Frecuencia de Trauma en las uñas por Fusarium.....</i>	<i>31</i>
<i>Tabla 7. Frecuencia de los deportes practicados por los pacientes con onicomicosis por Fusarium.....</i>	<i>34</i>
<i>Tabla 8. Rango de las CIM para las levaduras control por microdilución.....</i>	<i>35</i>
<i>Tabla 9. Concentración mínima inhibitoria para las especies de Fusarium por microdilución en caldo...36</i> <i>+ CIM₅₀: Concentración inhibitoria mínima a la cual el 50% de las cepas detienen su crecimiento y CIM₉₀: concentración inhibitoria mínima a la cual el 90% de las cepas detienen su crecimiento.....</i>	<i>36</i>
<i>Tabla 10. Rangos de sensibilidad y resistencia de las cepas aisladas frente a voriconazol.....</i>	<i>37</i>
<i>Tabla 11. Rango de las CIM para las levaduras control por difusión en placa.....</i>	<i>38</i>
<i>Tabla 12. Actividad in vitro de voriconazol contra 140 cepas de Fusarium sp.....</i>	<i>39</i>
<i>Tabla 13. Correlación entre los resultados de los métodos de microdilución (MD) y difusión en disco (DD) después de 76 h de incubación.....</i>	<i>40</i>

1. Introducción

Fusarium sp. es un género de hongos cosmopolita, se encuentra generalmente en el suelo, y es patógeno de diversos cultivos, como el clavel (1), igualmente es patógeno de animales incluido el hombre; es capaz de adaptarse a diversos ambientes ya que produce diferentes tipos de esporas entre ellas las clamidosporas, las cuales le sirven en ambientes adversos por ser estructuras de resistencia.

Debido a que las infecciones fúngicas han cobrado gran importancia en los últimos años debido a los pacientes inmunosuprimidos, se ha hecho imperante conocer la respuesta de los hongos frente a los tratamientos, así como la forma de infección en los pacientes y la patología en general. *Fusarium* sp. ha sido reportado como patógeno humano en infecciones localizadas en piel, cornea y uña, también es agente causal de micetomas y micosis crónica del tejido celular subcutáneo (38); de igual manera causa infecciones sistémicas principalmente en pacientes con problemas hematológicos que reciben quimioterapia o en pacientes con quemaduras extensas (3).

Dado el aumento de las infecciones por hongos y en nuestro caso el de los casos de onicomycosis por *Fusarium* (12), se ha hecho necesario conocer la respuesta *in vitro* que tienen los hongos frente a los tratamientos disponibles en el mercado así como también de los nuevos compuestos que están en fase de prueba. Por consiguiente se creó una metodología estandarizada para algunos hongos, que fuera reproducible y fácil de hacer. La metodología fue propuesta por Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI anteriormente NCCLS) con el fin de probar la susceptibilidad antifúngica en caldo M27-A para levaduras y posteriormente el método para probar la susceptibilidad antifúngica en caldo M38-A para hongos filamentosos, adicional a esto el voriconazol ha sido reportado como de uso para infecciones causadas por *Fusarium* sp.(43), y se han reportado cosas donde se ha tratado infecciones por este hongo con voriconazol(44, 47) . El objetivo principal de este trabajo es determinar la susceptibilidad de los aislamientos

colombianos de *Fusarium* sp. causantes de onicomicosis al voriconazol y correlacionar los datos epidemiológicos con la respuesta a este compuesto.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Determinar y evaluar la susceptibilidad de especies de *Fusarium* spp. aisladas de pacientes con onicomycosis frente a un compuesto azólico .

2.2. Objetivos específicos

Determinar la susceptibilidad *in vitro*, al antifúngico voriconazol, de los aislamientos utilizando el método de microdilución en placa de la CLSI M38-A.

Estandarizar la metodología de difusión en disco para *Fusarium* sp a partir de la metodología de difusión en disco para levaduras CLSI M44-A usando discos de voriconazol.

Comparar la metodología de microdilución en placa CLSI M38-A con la metodología de difusión en disco.

Determinar si existe una correlación entre la susceptibilidad *in vitro* con los aislamientos de pacientes que han tenido tratamientos previos.

3. MARCO TEORICO

3.1. Genero *Fusarium*

El genero *Fusarium* fue descrito por Link en 1809 como esporas pluriseptadas, fusiformes que crecen sobre estromas. Luego, en 1821 el género fue validado por Fries, quien lo incluyó en el orden Tuberculariae. Después Wollenweber & Reinking en 1935 publicaron su trabajo sobre *Fusarium*, en este trabajo estudiaron 1000 cepas de *Fusarium* y las organizaron en 16 secciones que contenían 65 especies, 55 variedades y 22 formas especiales (31, 48).

En ese entonces las características que se tuvieron en cuenta para separar las secciones fueron: presencia o ausencia de microconidios, clamidosporas, forma de los microconidios, ubicaciones de las clamidosporas (intercalar, terminal), forma de los macroconidios y de la célula basal. Mientras que para dividir las secciones en especies, variedades y formas se usó: el color de estroma, presencia o ausencia de esclerocios, número de septos, largo y ancho de macroconidios (31, 48).

La forma perfecta (telomorfo) de *Fusarium* en las especies que la presenten, pertenece al orden Hypocreales (Ascomycetes), a los géneros *Nectria*, *Calonectria*, *Micronectriella* y *Gibberella*. Estos se caracterizan porque las ascoporas son producidas en ascocarpos en forma de peritecio (31, 48); el anamorfo pertenece al Filo Deuteromicota o Fungi imperfecti. Nelson P. et al describen 30 especies a las cuales se les conoce el telomorfo solo a 15; en este trabajo también se describen otras 16 especies que no están bien documentadas, pero el numero de especies depende principalmente del autor (27).

3.2. Taxonomía

La taxonomía del género *Fusarium* siempre ha sido muy complicada debido a que las descripciones iniciales se hicieron a base de características que cambiaban muy frecuentemente según los medios que se utilizaban; por eso en un momento se llegaron a tener más de 1000 especies, variedades y formas (27).

Los sistemas taxonómicos actuales independientes de la corriente que sigan se basan en el trabajo realizado por Wollenweber y Reinking quienes en 1935 simplificaron el número de especies, variedades y formas a 142, organizadas en 16 secciones. Hacia 1982 Gerlach y Nirenberg continuaron con el trabajo iniciado por Wollenweber; el problema es que resultó ser un sistema taxonómico muy complejo; ya que se trabajaron con en 8 diferentes medios de cultivo en los cuales se hacia mas énfasis en las diferencias que en las similitudes, con lo cual muchos mutantes podrían ser identificados como nuevas especies (27).

Otros investigadores también desarrollaron diversos sistemas taxonómicos basados en diferentes formas de agrupar las especies según las características morfológicas que consideraban importantes pero las más usados actualmente son las clasificaciones realizadas por Booth (1971) y la de Nelson, Toussoun & Marasas (1983). El gran aporte de Booth fue dar información acerca de los conidioforos y las células conidiogénicas, y demostrar que las polifialides y las monofialides ayudaban a separar secciones y especies; mientras que en el trabajo de Nelson et al se unen los trabajos realizados anteriormente por otros investigadores, seleccionando lo mejor de cada sistema y combinándolos, con lo cual se obtuvo una reducción en el número de especies, variedades y formas (27). La característica que agrupa a todas las especies de *Fusarium* es la producción de macroconidios con una célula apical y una célula basal en forma de pie que constituye la base para la identificación de las especies. La identificación se realiza a base de características macroscópicas y microscópicas, las cuales son agrupadas en características primarias y secundarias que son usadas para separar las especies en los sistemas taxonómicos existentes. Entre las características primarias se incluyen la forma de los macroconidios, origen, forma microconidios, el tipo de conidioforo y por ultimo la presencia y ausencia de clamidosporas, posición y número; mientras que las características secundarias y la presencia o ausencia de esporodoquios, la morfología y la pigmentación de la colonia (27, 31).

3.3. *Fusarium* como agente de infecciones

Se ha dicho que *Fusarium* puede causar diversos tipos de infecciones, entre las cuales se encuentran micotoxicosis, infecciones superficiales e infecciones invasivas. El primer reporte de una infección por *Fusarium* se dio en Rusia durante la segunda guerra mundial debido a una toxina (Toxina T-2) que se encontraba en los granos almacenados. Esta toxina produce una enfermedad conocida como Intoxicación Alimentaria Aleuquia., es producida por *F. sporotrichioides* y *F. poae* y se caracteriza porque afecta el sistema hematopoyético (27, 51).

Entre los factores de predisposición asociados a las infecciones por *Fusarium* se encuentran: disfunción leucocitaria polimorfonuclear, granulocitopenia, disfunción linfocítica, alteración de las barreras epiteliales, trauma y cuerpos extraños como catéteres (51).

Las patologías a las cuales se ha asociado *Fusarium* son: intoxicación alimentaria aleuquia, enfermedad Kashin-Beck o Urov, intoxicación por granos (Akakabi-byo), queratitis, infecciones en la piel, onicomycosis, otitis, infecciones intranasal invasiva, absceso cerebral, micetoma, endocarditis y enfermedades diseminadas en pacientes inmunocomprometidos

Las especies de *Fusarium* más comunes que se han asociado a patologías son: *F. solani*, *F. oxysporum*, y *F. verticillioides* [= *F. moniliforme*]. Igualmente existen otras especies que en menor grado también afectan a las personas, principalmente a los pacientes inmunosuprimidos, entre las cuales tenemos a *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. aquaeductuum*, *F. dimerum*, *F. incarnatum*, *F. nygamai*, *F. chlamydosporum*, *F. sacchari* y *F. antophilum* (19).

3.3.1. Onicomycosis

La palabra onicomycosis viene del griego onychos: uñas y mycosis: infección por hongos (22), cuando nos referimos a onicomycosis estamos hablando de una infección en las uñas, tanto de los pies como de las manos causada por hongos; la cual se estima que corresponde al 50% de los desordenes ungueales (20). Aunque tradicionalmente el termino onicomycosis se usaba para hongos no dermatofitos hoy en día es usado para todas las infecciones en las uñas de origen micótico (11).

Existen tres grupos de hongos que pueden causar esta infección, los dermatofitos, los mohos no dermatofitos y las levaduras (6, 20). La prevalencia de las onicomycosis varía según la región geográfica, se estima que a nivel mundial la incidencia de la onicomycosis es del 2-26% en la población general (12). En el Reino Unido se ha reportado que es de 2.7%, en España 2.6%, en Finlandia de 8.4%, Estados unidos 13.8% y Canadá 6.85% (16).

Existen 5 tipos de onicomycosis y para su clasificación se utiliza el sitio y modo de invasión; es decir la ruta de invasión de la placa ungueal, según la clasificación propuesta hacia 1972 por Zaias (7, 11). Los 5 tipos de onicomycosis son: onicomycosis subungueal lateral y distal (DLSO), onicomycosis blanca superficial (SWO), onicomycosis negra superficial (SBO), onicomycosis subungueal proximal (PSO) y onicomycosis distrófica total (TDO).

3.3.1.1. *Fusarium* spp. como agente de Onicomycosis en Colombia

Hasta el momento en Colombia se ha reportado un incremento de las onicomycosis por hongos no dermatofitos, especialmente por *Fusarium* spp. (54). En Medellín en el 2003 se reportó que un 50% de las infecciones eran causadas por este género, siendo las uñas de los pies las más afectadas (12), esto a nivel de género, ya a nivel de especie en Bogotá en el 2001 se realizó un estudio para determinar las especies de *Fusarium* más frecuentes asociadas a onicomycosis, y se encontró que *F. solani* (41%) es la especie más frecuente

en nuestro medio seguida por *F. oxysporum* (38%), *F. subglutinas* (18%) y *F. verticillioides* [= *F. moniliforme*] (3%), de una muestra total de 37 aislamientos (41).

3.4. Agentes antifúngicos

3.4.1. Clasificación

Los antifúngicos son compuestos que tienen actividad *in vivo* o *in vitro* contra levaduras o mohos. En la tabla 1 se resumen las diferentes clases de antifúngicos que se pueden encontrar. En primer lugar se encuentran las alilaminas entre las cuales se encuentran la terbinafina y la naftifina, su mecanismo de acción es la inhibición de la síntesis de ergosterol por medio de la inhibición de la enzima escualeno epoxidasa. El efecto final es la muerte que se da por la permeabilización de la membrana debido a las altas cantidades de escualeno. Entre los antimetabolitos encontramos a la flucitosina la cual es una pirimidina, este antimetabolito funciona cortando el metabolismo de la pirimidina y por lo tanto la síntesis de ADN, RNA y proteínas del hongo. Este antifúngico tiene un espectro amplio de actividad frente a *Candida* spp., *C. neoformans* y algunos hongos demateaceos que causan cromoblastomycosis. Por otro lado tenemos a los polienos, entre los cuales se encuentran la anfotericina B y las nistatina. La anfotericina B al igual que otros polienos mata el hongo por unión al ergosterol, ya que cuando se une a este se destruye la integridad osmótica de la membrana y se pierde el potasio, magnesio, azúcares y metabolitos causando la muerte celular. La anfoteriana B es activa contra una gran cantidad de hongos patógenos entre los cuales se encuentran *Candida*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* spp. *Mucor* spp., *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum* y *Paracoccidioides brasiliensis*. También tenemos a la equinocandinas las cuales son lipopeptidos de amplio espectro de actividad antifúngica, su mecanismo de acción es la inhibición de la síntesis de glucano, lo cual lleva al cese de la síntesis de pared fúngica, en general se ha visto que tiene actividad contra *Candida* y *Aspergillus* spp. y una actividad limitada contra *C. neoformans* y *Fusarium* spp. Finalmente tenemos los azoles de los cuales se habla más adelante (5).

Tabla 1. Clases de antifúngicos, ejemplos y formulación

Clase Química	Agente antifúngico	Formulación
Alilaminas	Terbinafina	Oral, Tópica
Antimetabolitos	Flucitocina	Oral
Azoles (Imidazoles)	Ketoconazol	Oral, Tópica
	Miconazol	Tópica
	Tioconazol	Tópica
Azoles (Triazoles)	Fluconazol	Oral, Intravenoso
	Itraconazol	Oral, Intravenoso
	Voriconazol	Oral, Intravenoso
Polienos	Anfotericina B	Intravenosa, Tópica
Equinocandinas	Caspofungina	Intravenosa

3.4.2. Azoles

Los azoles se encuentran divididos en los imidazoles y los triazoles según el número de nitrógenos que hay en el anillo azólico. En general son fungistáticos y causan inhibición parcial del crecimiento del hongo (5).

Los Imidazoles contiene dos nitrógenos en el anillo azólico, el ketoconazol es uno de los imidazoles más importantes debido a que es el único que puede ser usado para tratar infecciones sistémicas. Es un agente lipofílico, su nombre comercial es Nizoral y es fabricado por Janssen Pharmaceutica, se encuentra en formulación oral y tópica (crema y solución). Tiene actividad *contra H. capsulatum, C. immitis, B. dermatitidis, P. brasiliensis y P. boydii*. Presentan actividad limitada frente a *Candida spp.* y *C. neoformans*. Mientras que *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.* y los Zygomycetes presentan resistencia frente a este antifúngico (5).

Los triazoles contienen tres nitrógenos en su anillo azólico, los más usados actualmente son el fluconazol, el itraconazol y el voriconazol. El Fluconazol es producido por Pfizer Pharmaceuticals y su nombre comercial es Diflucan, se usa principalmente para el tratamiento de las candidiasis. Se encuentra en formulación oral e intravenosa, tiene la

habilidad de penetrar el Líquido cefalorraquídeo. Es activo contra *Candida* spp. (aunque *C. krusei* es intrínsecamente resistente), *C. neoformans*. El Itraconazol es producido por Janssen Pharmaceutica, su nombre comercial es Sporanox, tiene amplia actividad contra *Candida* spp., *C. neoformans*, *Aspergillus* spp., *P. boydii*, *Paecilomyces* spp., *C. immitis*, *H. capsulatum*, *B. dermatitidis*, *P. brasiliensis*, *Penicillium marneffei* y *S. schenkii*. Tiene actividad limitada contra *Fusarium* spp. y no tiene actividad contra los zigomycetes y *Scopulariopsis* spp. Finalmente tenemos el Voriconazol que es producido por Pfizer Pharmaceuticals su nombre comercial es Vfend, fue aprobado por la FDA en mayo del 2002. Tiene actividad favorable contra *Candida* spp., *C. neoformans*, *Aspergillus* spp., *B. dermatitidis*, *C. immitis*, *H. Capsulatum*, *Fusarium* spp y *P. marneffei* (5).

3.4.2.1.Mecanismo de acción

Los agentes azólicos previenen la síntesis de ergosterol, por la inhibición de la enzima lanosterol demetilasa citocromo P-450; el ergosterol es un componente principal de la membrana plasmática de los hongos, esta enzima no es única en los hongos también se encuentra en los mamíferos, y es usada en la síntesis de colesterol. La eficacia del tratamiento con estos agentes se debe a que tiene mayor afinidad por la P-450DM de los hongos que de los mamíferos. Cuando el hongo está expuesto a azoles no hay ergosterol y se acumulan esteroides 14alfa-metilados. Esto causa una disrupción de la membrana y varias funciones se ven afectadas, por ejemplo el transporte de nutrientes y la síntesis de quitina. Finalmente lo que se obtiene es una inhibición del crecimiento y de la proliferación (45).

3.4.2.1.1. Voriconazol

El voriconazol es un compuesto sintético perteneciente a los triazoles, es derivado del fluconazol y su mecanismo de acción es similar a los demás azoles, actúa inhibiendo la síntesis de ergosterol, este compuesto tiene un amplio espectro de acción, actúa frente a especies de *Aspergillus*, *Blastomyces dermatitidis*, especies de *Candida*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, especies de *Fusarium*, *Histoplasma capsulatum*, *Penicillium marneffei* y *Scedosporium apiospermum*, hasta el momento no se reportado

resistencia adquirida en las levaduras resistentes a fluconazol, mientras que para los zigomicotas si se ha reportado resistencia (21, 43).

El voriconazol esta disponible en forma oral e intravenosa, en la forma oral, la biodisponibilidad de la formulación oral es del aproximadamente 95% cuando se consume en ausencia de comida.(21), dos horas después de tomar una dosis de 400-mg/L la concentración en el suero puede ser de 2 mg/L. La absorción se reduce por las carnes altas en grasas, pero no se afecta por lo cambio en el pH gástrico (43)

El voriconazol, se distribuye en varios tejidos, entre los cuales se incluye los ojos, el cerebro y el líquido cerebroespinal(21). Es metabolizado en el hígado por varias enzimas del citocromo P450, mas del 80% de la dosis administrada es eliminada como metabolitos en la orina (21, 43).

El voriconazol ha sido aprobado para el tratamiento de pacientes inmunocomprometidos con infecciones fúngicas , entre las cuales se encuentran aspergilosis invasiva aguda, candidiasis invasiva por especies de *Candida* resistentes a fluconazol e infecciones causadas por *Fusarium* y *Scedosporium*, en Estados Unidos ha sido aprobado como agente de primera línea, para en tratamiento de las infecciones arriba mencionadas, excluyendo las Candidiasis (21, 43).

Para iniciar el tratamiento se realiza de manera intravenosa con dos dosis de 6 mg/Kg con 12 horas entre dosis, luego dosis de 4 mg/Kg por intervalos de 12 horas, el tratamiento oral se suministra una vez el paciente pueda tolerarlo y se retira la administración por vía intravenosa, la dosis en pacientes adultos depende del peso, para pacientes con peso mayor a 40 Kg reciben una dosis oral de 200 mg a intervalos de 12 horas y pacientes con menor de 40 Kg reciben una dosis de 100 mg a intervalos de 12 horas. Si el tratamiento se inicia de manera oral la dosis es para pacientes con peso mayor a 40 Kg se suministra 400 mg a intervalos de 12 horas y pacientes con menos de 40 Kg reciben dosis de 200 mg a intervalos de 12 horas(21, 43).

Entre los efectos adversos por voriconazol se han reportado problemas visuales, fiebre, erupciones, vómitos, náuseas, diarrea, dolor de cabeza y dolor abdominal, se han reportado casos de reacciones cutáneas, como, y algunos pacientes presentan elevaciones en las funciones del hígado, también se ha reportado cosas de hepatitis y falla hepática (21, 43).

3.5. Pruebas de susceptibilidad para hongos filamentosos

3.5.1. Metodología en caldo de la CLSI

Las pruebas de susceptibilidad para hongos se hicieron necesarias una vez fueron introducidos nuevos medicamentos para el tratamiento de estas infecciones y también por la creciente resistencia que muestran los hongos. Debido a esto el Instituto de estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI antes NCCLS) en 1985 realizó encuestas para conocer cuáles pruebas de susceptibilidad realizaban los laboratorios y cómo se realizaban, demostrando que había grandes diferencias en los resultados. Por este motivo se creó un grupo para la estandarización de las pruebas de sensibilidad para las levaduras del género *Candida* y *Cryptococcus* y en 1992 se publicó un método conocido como M27-P, en 1955 se publicó un método provisional (M27-T) para finalmente en 1997 publicar la versión aprobada (M27-A). En 1998 se publicó la propuesta para hongos filamentosos conocida como M38-P y en el 2002 se dio a conocer la versión aprobada M38-A (5, 15).

Tabla 2. Resumen de la metodología propuestas para hongos filamentosos M38-A tomado de National Committee for Clinical Laboratory Standard. 1998.

Medio de cultivo	RPMI 1640, con glutamina, sin bicarbonato de sodio y con indicador de pH
pH	6.9-7.1
Buffer (Tampón)	Ácido mofolino propano sulfónico (MOPS) [0.164 moles/Lt]
Inóculo	Entre 0.4×10^4 y 5×10^4 UFC/ml
Incubación	<i>Fusarium</i> spp. 46-50 h a 35°C

Concentraciones a ensayar	Anfotericina B, Itraconazol y Ketokonazol: 16-0.03 ug/ml
Definición de la CMI	Azoles: La CMI es la concentración mas baja que produce una inhibición del cto $\geq 50\%$
Puntos de corte	No determinados
Cepas control	<i>Candida parasilopsis</i> ATCC 22019 <i>Candida krusei</i> ATCC 6258

Lo que se busca idealmente con estas pruebas es: dar una medida relativa de la actividad de un antifúngico, correlacionar la actividad *in vivo* y el pronóstico de la terapia, monitorear el desarrollo de resistencia en poblaciones sensibles y predecir el potencial terapéutico de nuevo agentes, para lo cual se necesita mejorar aún más las técnicas (40). En la tabla 2 se resume la metodología empleada para las pruebas de susceptibilidad (25).

3.5.2. Metodología de difusión en disco

Existen otros métodos para probar la susceptibilidad *in vitro*, entre ellos se encuentra el método de difusión en disco, hasta el momento existe una adaptación con una buena correlación con el método de referencia en caldo para fluconazol, el documento se conoce como M44-A, y está desarrollado para levaduras, adicionalmente existen puntos de corte para el voriconazol. Esta metodología usa el colorante azul de metileno (0.5 $\mu\text{g/ml}$) para permitir que la zona de inhibición sea más clara y tener una mejor lectura. La lectura se realiza a las 24 y 48 horas. Hasta el momento no existe ninguna metodología estandarizada para hongos miceliales(40).

4. METODOLOGIA

4.1. Tipo de estudio

Este es un estudio de tipo descriptivo observacional para identificar los patrones de susceptibilidad y la frecuencia en especies de *Fusarium*.

4.2. Diseño experimental

Para determinar la susceptibilidad de los 140 aislamientos frente al voriconazol, se implementaron dos metodologías, la M38-A en RPMI-1640 por microdilución y se modificó la metodología de difusión en disco para levaduras M44-A. La estandarización fue llevada a cabo con tres cepas de *Fusarium* sp. y las cepas control *Candida krusei* y *Candida parasilopsis* de la American Type Culture Collection (ATCC). Finalmente se recuperaron las especies de *Fusarium* conservadas en agua del cepario del Laboratorio de Micología y Fitopatología de la Universidad de los Andes y se probaron ambas técnicas con los 140 aislamientos. De los aislamientos identificados como *F. oxysporum* anteriormente se seleccionaron 20 cepas para determinar la forma especial. Para la selección de estos 20 aislamientos se usó la técnica de RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA) (Figura 1).

4.3. Población estudiada

La población de estudio está conformada por los aislamientos de pacientes con onicomycosis por *Fusarium* sp. aislados durante el periodo de Enero de 2003 a Septiembre de 2004. El tamaño de la población es de 140, correspondiente a pacientes diagnosticados en este periodo de tiempo y que estuviesen tanto las muestras como las historias clínicas disponibles.

4.4. Criterios de inclusión

Las muestras fueron aisladas a partir de uñas con lesiones de los pacientes y todas son pertenecientes al género *Fusarium*, que fueron diagnosticados en el Laboratorio Especializado de Micología Médica (LEMM). Se incluyeron todos los aislamientos de *Fusarium* sp. que tuvieron un examen directo no compatible con dermatofito y que hayan tenido una verificación con una segunda muestra. También aquellos que hayan estado asociados con otro hongo como por ejemplo un dermatofito o una *Candida* sp; pero que tengan un directo no compatible con dermatofito.

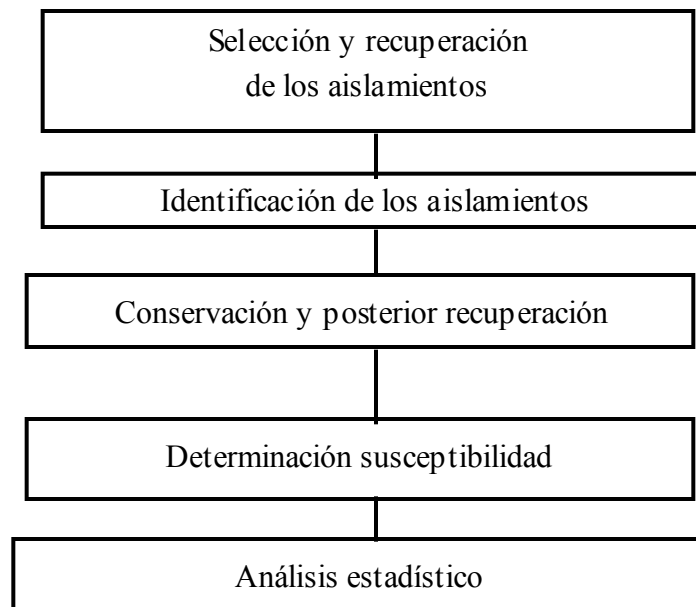
4.5. Criterios de exclusión

Se excluyeron todos los pacientes a los cuales se le haya identificado un dermatofito o un hongo no dermatofito diferentes de *Fusarium* sp. o que tengan un directo compatible con dermatofito.

4.6. Toma de muestra e identificación de los aislamientos

La toma y recuperación de las muestras, al igual que la identificación a especie fueron realizadas en un trabajo anterior (9). Las muestras fueron tomadas a partir de uñas de pacientes con onicomicosis y diagnosticadas por Leticia Sopó en el Laboratorio Especializado de Micología Médica (LEMM). La recuperación de los aislamientos conservados en agua así como la identificación de las especies fue llevado a cabo en el Laboratorio de Micología y Fitopatología Uniandes (LAMFU).

Figura 1. Esquema del diseño experimental usado en este estudio.



Para la recuperación de las muestras que se encontraban conservadas en agua se tomaban 1 a 2 pedazos y se colocaban en tubos de agar Nash & Snyder (NSM) (Anexo 1) incubándolos por 8 días a 25-28°C. A partir de estos se realizó cultivo monospórico por diluciones (9). La identificación de las especies se hizo en base a la metodología usada en el manual “Fusarium Species An Illustrated Manual for Identification” de Nelson P. E., Toussoun T. A. y Marasas W. F. O., se cultivaron los hongos en Papa dextrosa Agar natural (PDA) (Anexo 1), a 28°C por 5-8 días para observar las características macroscópicas y en agar agua con hojas de clavel (CLA) (Anexo 1), a 28°C por 5 días, para observar las características microscópicas (9).

4.7. Pruebas de Susceptibilidad en caldo (CLSI)

Para determinar la susceptibilidad de las cepas se utilizó la metodología estandarizada en el documento M38-A de la CLSI (25). La prueba se realizó por duplicado para cada cepa,

en diferentes días bajo las mismas condiciones y usando las cepas de referencia ATCC, *Candida parasilopsis* ATCC 22019 y *Candida krusei* ATCC 6258 usadas como control de calidad. La preparación del antifúngico, las diluciones del mismo y el inóculo se realizaron según la metodología descrita en el documento M38-A (25). Para el inóculo, el hongo se sembró en Papa dextrosa Agar (PDA) a 35°C por 2 días y luego a 25-28°C por 5 días. Las levaduras control se sembraron en Sabouraud dextrosa Agar (SDA) por 24 horas a 35°C. Finalmente se llenaron las microplacas de 96 pozos (Figura 2) y se incubaron a 35°C por 24-48 h para realizar la lectura de las cepas control y a las 76 horas para realizar la lectura de los aislamientos de *Fusarium* sp., las lecturas se llevaron a cabo usando un espejo invertido, comparando con el pozo control (Figura 3).

Figura 2. Esquema de las diluciones en las microplacas (Concentraciones finales (ug/ml))

Fármaco	Columna de la placa											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Voriconazol	C. C.	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125	C Cto

C.C.: control de calidad C. cto.: control de crecimiento.

4.8. Pruebas de susceptibilidad en disco (CLSI)

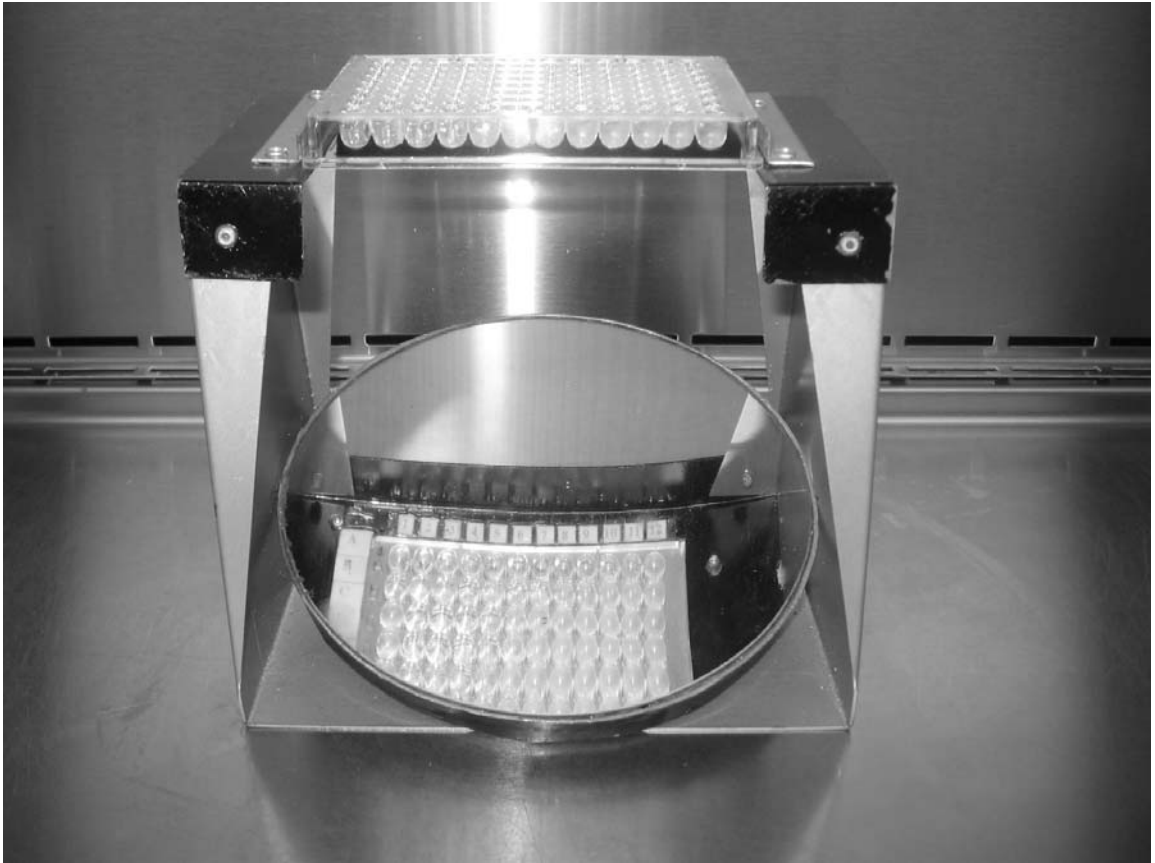
La prueba de susceptibilidad en disco se realizó usando la metodología M44-A para levaduras (26), en medio Mueller Hinton más 2% de glucosa y azul de metileno; como cepas control se utilizaron las cepas de referencia ATCC, *Candida parasilopsis* ATCC 22019 y *Candida krusei* ATCC 6258. El inóculo fue preparado sembrando las cepas de *Fusarium* sp. en Papa dextrosa Agar (PDA) a 35°C por 2 días y luego a 25-28°C por 5 días y para las levaduras control se sembraron en Sabouraud dextrosa Agar (SDA) por 24 horas a 35°C. en un tubo de ensayo con 5 ml de solución salina. El inóculo, se preparó tomando con un asa la cepa a probar, se homogenizó en vortex, para las levaduras control se ajustó la turbidez a 0.5 en la escala McFarland (1×10^6 - 5×10^6 UFC/ml), mientras que para los hongos miceliales se ajustó a una densidad óptica 0.15-0.17 usando un espectrofotómetro (Spectrofotometer SP-850).

Con ayuda de un escobillón estéril se tomó un poco del inóculo y se sembró masivamente en la caja de petri. Se incubaron a 35°C por 24-48 horas para las levaduras control y 76 h para las cepas de *Fusarium* sp. (25). La lectura se hizo según el diámetro del halo de inhibición.

4.9. Selección de *Fusarium oxysporum* por RAPDs

Se seleccionaron 20 de los 50 aislamientos identificados como *Fusarium oxysporum*, para la selección se realizó una amplificación arbitraria de fragmentos polimórficos de ADN (RAPD) usando tres primers o cebadores OPA 2, OPA 4 y OPA 13. Para el RAPD se usó un volumen final de 25 ul, con: 1 ul de ADN de *Fusarium oxysporum*, Buffer de PCR 1x, 2 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 0.4 uM de cada primer y 0.2 U de TAQ polimerasa. La reacción se efectuó con un paso de denaturación inicial de 94°C por 5 min., seguido por 30 ciclos con una denaturación a 94°C por 1 min., un anillaje a 38°C por 1 min., y una elongación a 72°C por 1 min. (Hernandez J, cporpogen). El producto se visualizó en geles de agarosa al 1.5% tenidos con bromuro de etidio al 0.5 ug/ml por 2 horas y media a 45 voltios.

Figura 3. Espejo invertido para lectura visual.



4.10. Análisis de datos

Se determinaron los porcentajes para las especies y los datos clínico epidemiológicos. Adicionalmente de determinó el rango de las CIMs. Se usó el paquete estadístico Statistix 7.0 para comparar la metodología en caldo con la metodología de difusión en disco.

5. RESULTADOS

5.1. Agentes etiológico aislados

Se encontraron tres especies de *Fusarium* en los 140 aislamientos que correspondían a 137 pacientes, *F. solani* (59.6%), *F. oxysporum* (38.3%) y *F. verticillioides* [=*F. moniliforme*] (3%) (tabla 3), en la Figura 4 se muestra la frecuencia de las especies.

Usar cursiva en los nombres de hongos en las figuras

Figura 4. Frecuencia de las especies de *Fusarium*

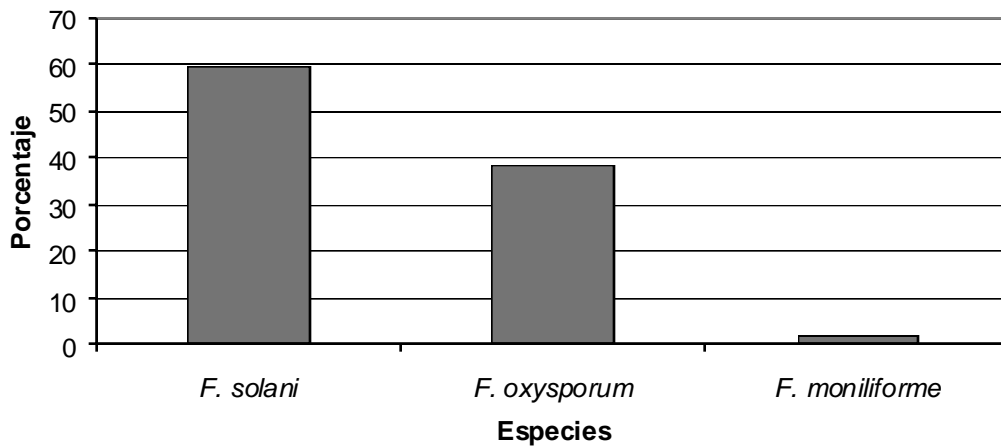


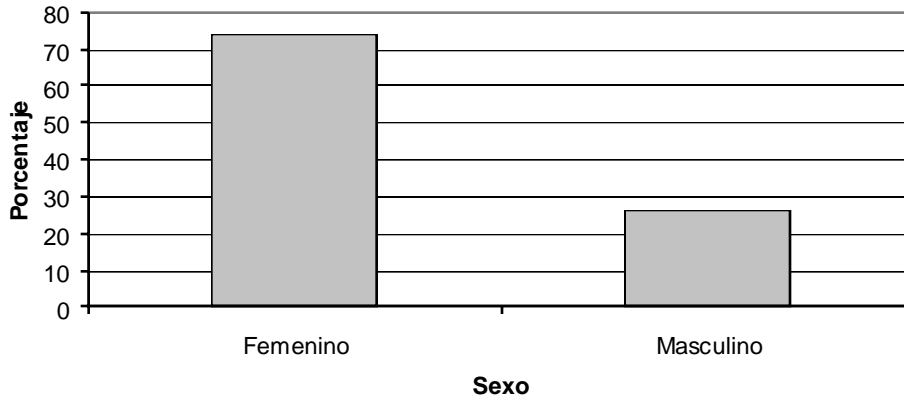
Tabla 3. Frecuencia de las especies del género *Fusarium* aisladas a partir de pacientes con onicomiosis

	Especie	Frec	Porcentaje	Acumulativo	
				Frec	porcentaje
	<i>F. solani</i>	84	59,6	84	59,6
	<i>F. oxysporum</i>	54	38,3	138	97,9
	<i>F. moniliforme</i>	3	2,1	141	100
TOTAL		141	100		

5.2. Relación de sexo y onicomiosis por *Fusarium*

La onicomiosis por *Fusarium* es más frecuente en las mujeres que en los hombres, con un porcentaje del 73.8%. En la Figura 5 se observa la distribución de frecuencia.

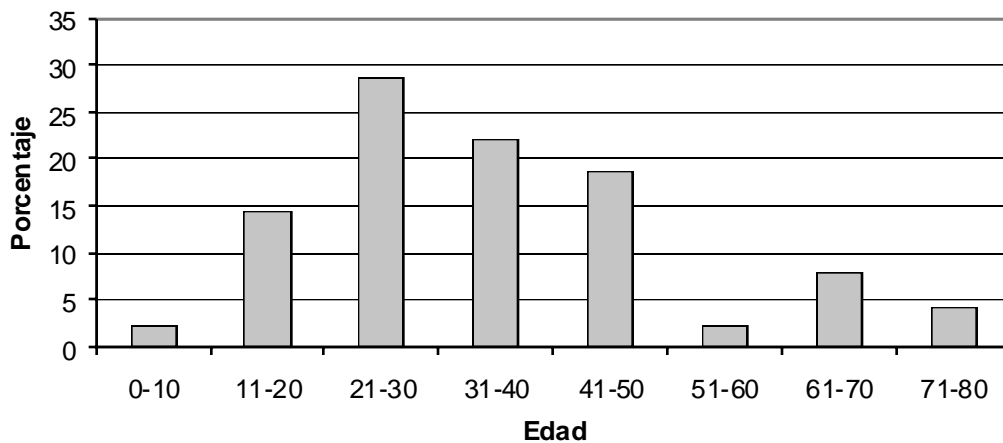
Figura 5. Frecuencia de onicomycosis por *Fusarium* entre sexos



5.3. Relación de edad y onicomycosis por *Fusarium*

La edad se evaluó agrupando los pacientes en rangos de 10 años. En la figura 6 se observa que la onicomycosis por *Fusarium* se presenta en cualquier edad, pero es más común entre los 21-50 años con un porcentaje acumulativo de 85.7%. El rango de edad en la cual hay una mayor frecuencia es de 21-30 años con un 28.6%

Figura 6. Frecuencia la onicomycosis por *Fusarium* según las edades



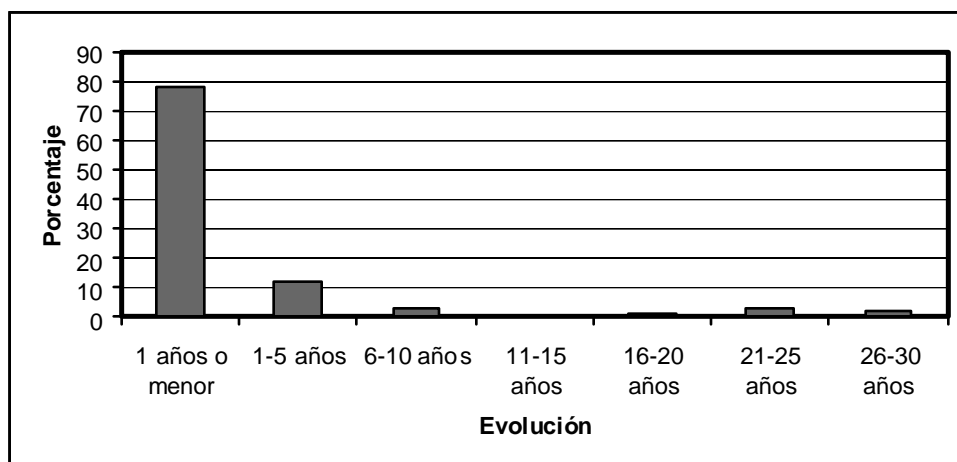
5.4. Relación de evolución y onicomicosis por *Fusarium*

Para evaluar la evolución de la enfermedad se crearon rangos de 5 años, el tiempo de evolución más frecuente en las onicomicosis por *Fusarium* es menor a un año (78%) (Tabla 4), es decir que un 78% de las onicomicosis por *Fusarium* tiene un tiempo de evolución menor a 5 años. Aunque hay casos de hasta 30 años (Figura 7).

Tabla 4. Tiempo de Evolución de la onicomicosis por *Fusarium*

Evolución (años)	Frec	Porcentaje	Acumulativo	
			Frec	porcentaje
1 años o menor	110	78	110	78
1-5 años	17	12,1	127	90,1
6-10 años	4	2,8	131	92,9
11-15 años	1	0,7	132	93,6
16-20 años	2	1,4	134	95
21-25 años	4	2,8	138	97,9
26-30 años	3	2,1	141	100
TOTAL	141	100		

Figura 7. Tiempo de evolución de la onicomicosis por *Fusarium*



5.5. RELACIÓN DE ENFERMEDAD DE BASE Y ONICOMICOSIS POR *Fusarium*

El 60.3% de los pacientes con onicomicosis por *Fusarium* no presentan ningún tipo de enfermedad de base, aunque el 36.2% sufre de alguna enfermedad mucho de ellos presentan diabetes, hipertensión, entre otras (Tabla 5)

Tabla 5. Frecuencia de las Enfermedades de Base

	Enf de Base	Frec	Porcentaje	Acumulativo	
				Frec	porcentaje
	Si	51	36,2	51	36,2
	No	85	60,3	136	96,5
	Ns/Nr	5	3,5	141	100
TOTAL	140	100			

5.6. Relación entre diversos hábitos y la onicomicosis por *Fusarium*

La mayoría de los pacientes (72.3%) no han sufrido ningún tipo de trauma en la uña como golpes, cirugías, entre otros (Tabla 6).

Tabla 6. Frecuencia de Trauma en las uñas por *Fusarium*

				Acumulativo	
	Trauma	Frec	Porcentaje	Frec	porcentaje
	Si	38	27	38	27
	No	101	71,6	139	98,6
	Ns/Nr	2	1,4	141	100
TOTAL	141	100			

El 66% de los pacientes se han practicado manicura y el 60.3% pedicura (figuras 8 y 9, respectivamente).

Figura 8. Frecuencia de las personas que se realizan manicura

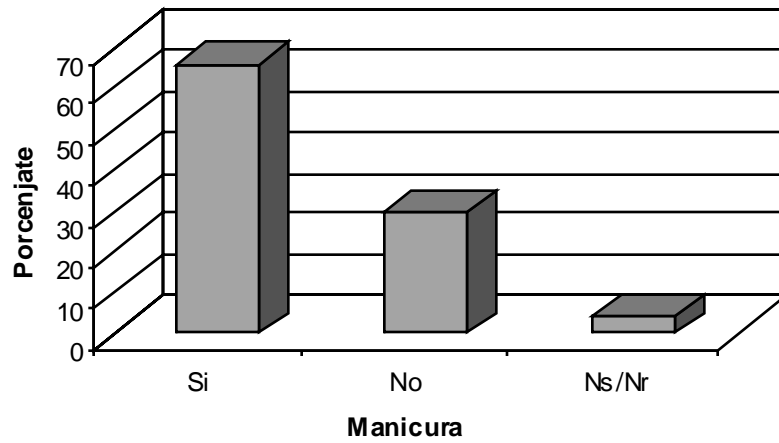
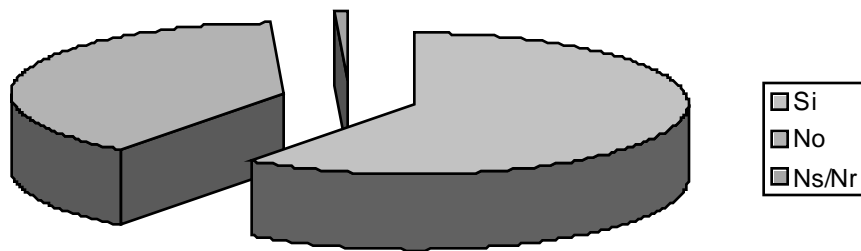
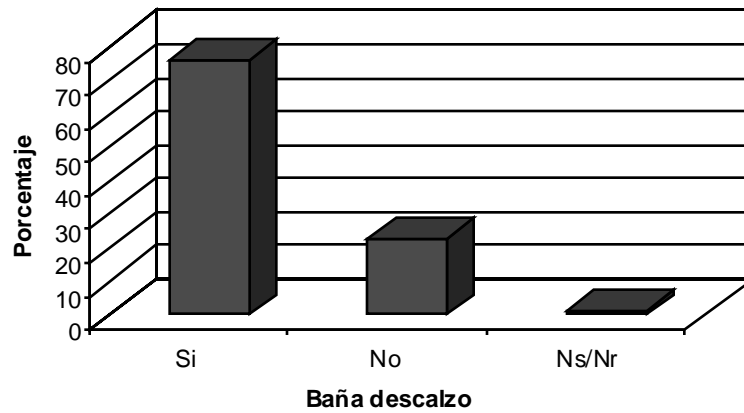


Figura 9. Frecuencia de las personas que se realizan pedicura



El 75.9% de los pacientes afirman que frecuentemente se bañan descalzos (Figura 10).

Figura 11. Frecuencia de los pacientes que se bañan descalzos



La mayoría de los pacientes no frecuenta la piscina o el turco (56.7%, 72.3% respectivamente), figuras 12 y 13.

Figura 12. Frecuencia de los pacientes que frecuentan las piscinas

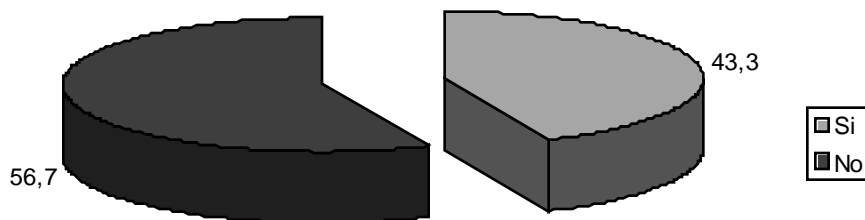
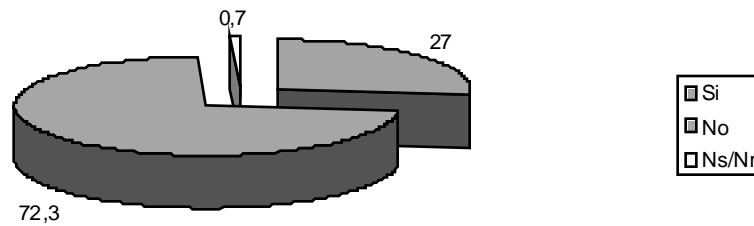


Figura13. Frecuencia de los pacientes que frecuentan los turcos o saunas



5.7. Relación entre deporte y onicomicosis por *Fusarium*

La mayoría de los pacientes que padecen de onicomicosis por *Fusarium* practican deporte (55.3%). Entre los pacientes que practican algún deporte el más frecuente es caminar, seguido por el gimnasio, y algunos practican deportes varios como natación, spinning, entre otros (Tabla 7).

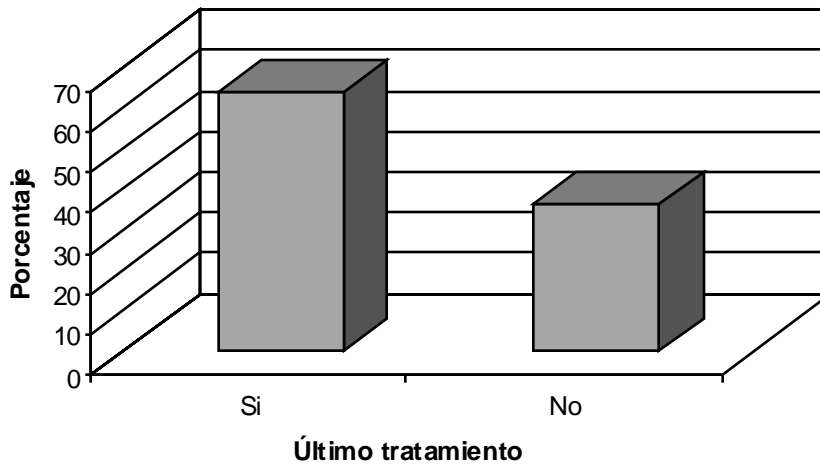
Tabla 7. Frecuencia de los deportes practicados por los pacientes con onicomicosis por *Fusarium*

				Acumulativo	
	Deporte	Frec	Porcentaje	Frec	porcentaje
Si		78	55.3	78	55.3
No		58	41.1	136	96.5
Ns/Nr		5	3.5	141	100.0
TOTAL	141	100.0			

5.8. Relación entre el tratamiento previo y la onicomicosis por *Fusarium*

En la figura 14 se muestra que la mayoría de los pacientes que consultaron han recibido tratamientos previos (68%), ya sea medicado o empírico.

Figura 14. Frecuencia de los pacientes que se han realizado tratamientos previos



5.9. Pruebas de susceptibilidad en caldo

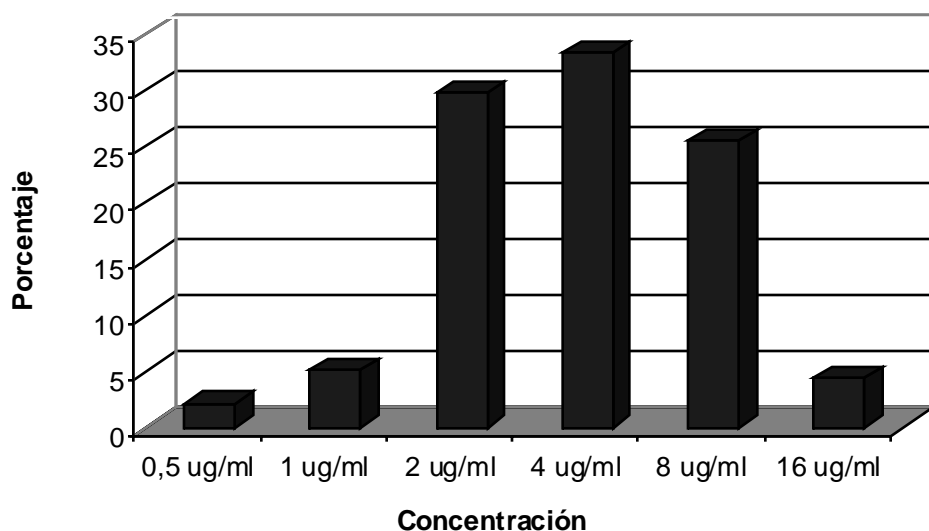
Los valores de la CIMs para las levaduras control *Candida parasilopsis* ATCC 22019 y *Candida krusei* ATCC 6258 estuvieron entre los rangos determinados por el CLSI a las 24 horas y a las 48 horas (25), los resultados se observan en la tabla 8.

Tabla 8. Rango de las CIM para las levaduras control por microdilución

Cepa control	voriconazol Rango (ug/ml) (n)		
	24 h	48 h	48h CLSI
<i>Candida parasilopsis</i> ATCC 22019	0,03-0,06 (47)	0,03-0,06 (47)	0,03-0,25
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	0,062-0,25 (47)	0,125-0,25 (47)	0,12-1,0

Se determinó la susceptibilidad frente a voriconazol de los 140 aislamientos de *Fusarium* sp. en la figura 15; la media geométrica determinada para el voriconazol es 3,02 ug/ml.

Figura 15. Resultados de la CIM para *Fusarium* sp. por microdilución en caldo



Al observar la frecuencia de las especies comparada con la CIM para voriconazol, observamos que *F. solani* (n=84) tiene la CIM más alta entre 8-16 µg/ml, mientras que un 42.7% de los aislamientos tienen una CIM de 4 µg/ml, para *F. oxysporum* (n=54) la CIM más alta fue de 4 µg/ml, y mayoría de los aislamientos tiene la CIM en 2 µg/ml (63%), mientras que *F. verticillioides* [= *F. moniliforme*] (n=3) el rango está entre 1-4 µg/ml.

Tabla 9. Concentración mínima inhibitoria para las especies de *Fusarium* por microdilución en caldo

Especies	Rango (µg/ml)	CIM ₅₀ ⁺ (µg/ml)	CIM ₉₀ ⁺ (µg/ml)
<i>F. solani</i>	0,5-16	4	8
<i>F. oxysporum</i>	0,5-4	2	4
<i>F. moniliforme</i>	1-4	2	4

⁺CIM₅₀: Concentración inhibitoria mínima a la cual el 50% de las cepas detienen su crecimiento y CIM₉₀: concentración inhibitoria mínima a la cual el 90% de las cepas detienen su crecimiento.

Figura 16. Resultados de la CIM para las especies de *Fusarium* por microdilución en caldo

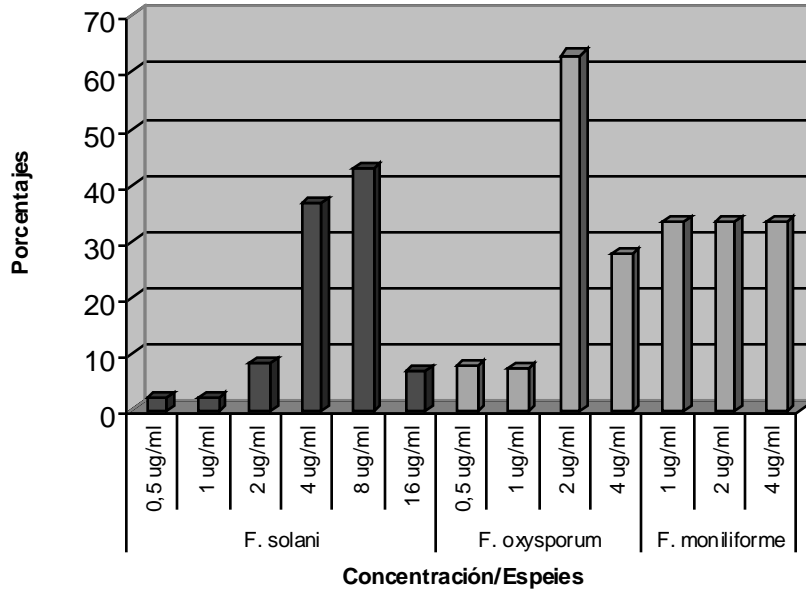


Tabla 10. Rangos de sensibilidad y resistencia de las cepas aisladas frente a voriconazol

CMI (ug/ml)	VORICONAZOL
16	6* (4.3%) ⁺
8	36 (25.5%)
4	47 (33.3%)
2	42 (29,8%)
1	7 (5%)
0,5	3 (2,1%)
0,25	0
0,125	0
0,0625	0
0,0325	0

*Frecuencia del rango de CMI del total de las cepas ⁺ Porcentaje obtenido

5.10. Pruebas de susceptibilidad en difusión en disco

Los valores de la CIMs para las levaduras control *Candida parasilopsis* ATCC 22019 y *Candida krusei* ATCC 6258 estuvieron entre los rangos determinados por el CLSI a las

24 horas y a las 48 horas (26), los resultados ser observan en la tabla 9.

Tabla 11. Rango de las CIM para las levaduras control por difusión en placa

Cepa control	voriconazol (1 ug)Rango (mm) (n)		
	24 h	48 h	48h CLSI
<i>Candida parasilopsis</i> ATCC 22019	29-37 (7)	28-35 (7)	28-37
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	16-32 (7)	19-27 (7)	16-25

Se determinó la susceptibilidad frente a voriconazol de los 140 aislamientos de *Fusarium* sp., para la metodología de difusión en disco; el 80.1% de los aislamientos son resistentes al voriconazol a una concentración de 1 µg, mientras que el 1.4% de los aislamientos presenta un halo de inhibición entre 3-8 mm de diámetro, el 16.8% presentan un halo entre los 10-20 mm de diámetro y el 2.8% un halo entre 21-30 mm de diámetro.

El 83.9% de los aislamientos de *F. solani* (n=84) son resistentes al voriconazol en una concentración de 1 ug/ml, mientras que para *F. oxysporum* (n=54) el 66.7% de los aislamientos son resistentes y 66.7% para *F. verticillioides* [= *F. moniliforme*] (n=3).

Figura 17. Porcentaje de inhibición para *F. solani* método de difusión en disco

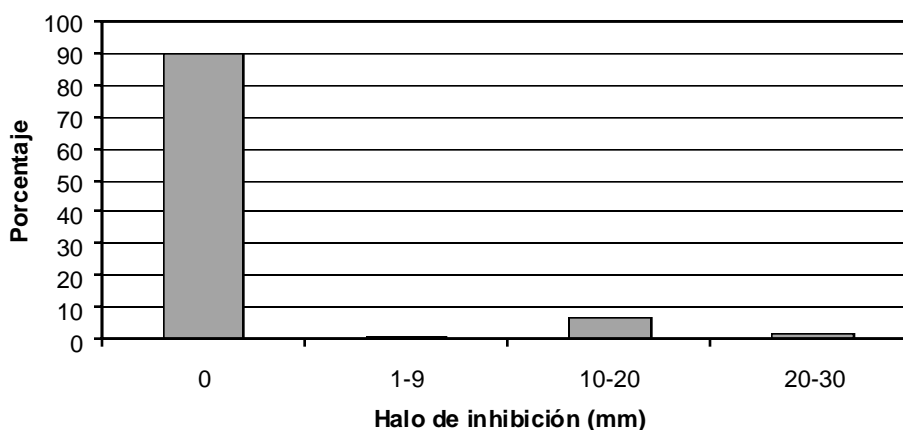


Figura 18. Porcentaje de inhibición para *F. oxysporum* método de difusión en disco

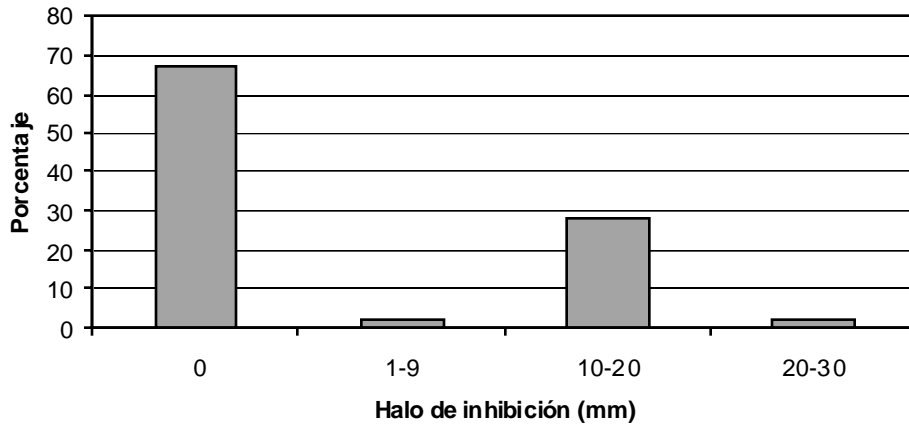


Figura 19. Porcentaje de inhibición para *F. moniliforme* método de difusión en disco

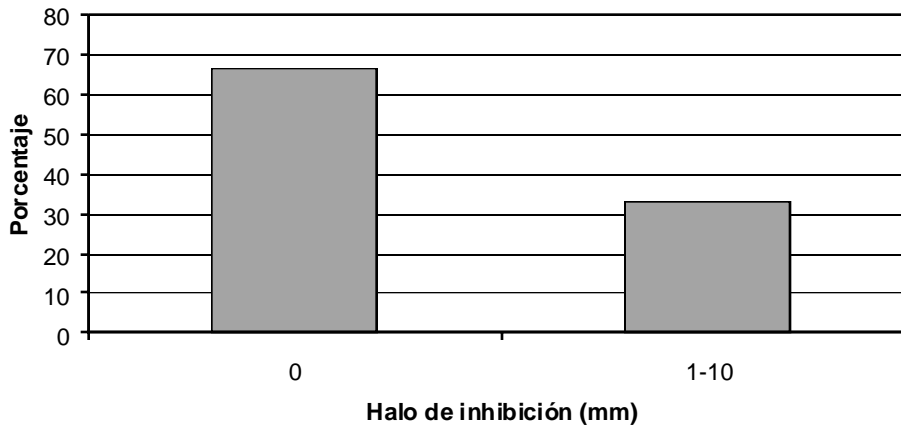


Tabla 12. Actividad *in vitro* de voriconazol contra 140 cepas de *Fusarium* sp.

Especies de <i>Fusarium</i> (n)	DD ⁺ (mm)		MD ⁺ (ug/ml)	
	Rango	MA*	Rango	MG*
<i>F. solani</i> (84)	0-32	2	0,5-16	5,2
<i>F. oxysporum</i> (54)	0-24	5	0,5-4	2,2
<i>F. moniliforme</i> (3)	0-10	3	1-4	2,0

⁺DD: Difusión en disco, MD: Microdilución, *MA: Promedio, MG: Media geométrica

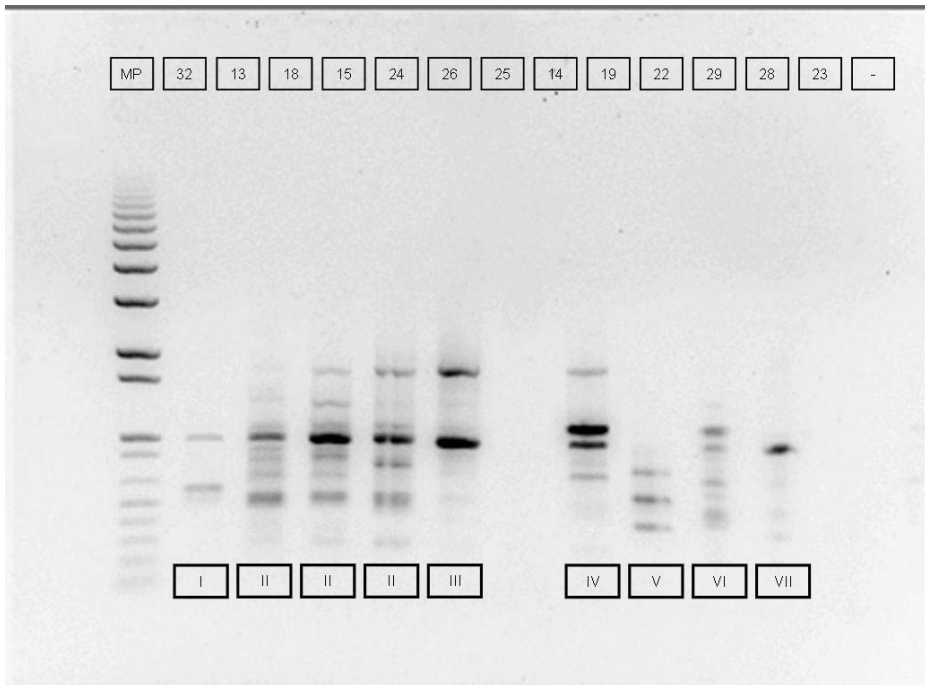
Tabla 13. Correlación entre los resultados de los métodos de microdilución (MD) y difusión en disco (DD) después de 76 h de incubación

zona de inhibición (mm)	MIC de MD						Total
	0,5 ug/ml	1 ug/ml	2 ug/ml	4 ug/ml	8 ug/ml	16 ug/ml	
0	1	3	24	44	35	6	113
8			1				1
10	1	1	1				3
11			2				2
12			4				4
13			4				4
14			1				1
15		1	1				2
16			1	1			2
17				1			1
18			1				1
19			1	1			2
21		1	1				2
24	1				1		2
32		1					1
Total	3	7	42	47	36	6	141

5.11. Selección de los aislamientos de *Fusarium oxysporum* por RAPDs

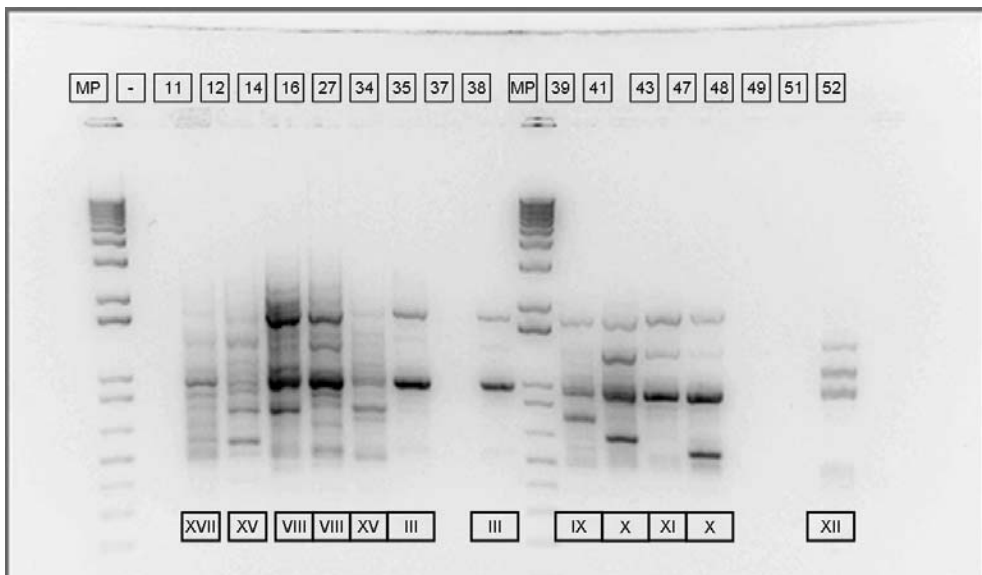
Se escogieron 20 aislamientos de *F. oxysporum* para su posterior identificación de la forma especial *dianthi*, para la selección de estos aislamientos se agruparon los aislamientos según el patrón de bandeo de RAPDs, con los tres cebadores OPA 2, 4 y 13. Los cuales se muestran en las figuras 20 a 26.

Figura 20. Agrupación de los aislamientos con el cebador OPA 2



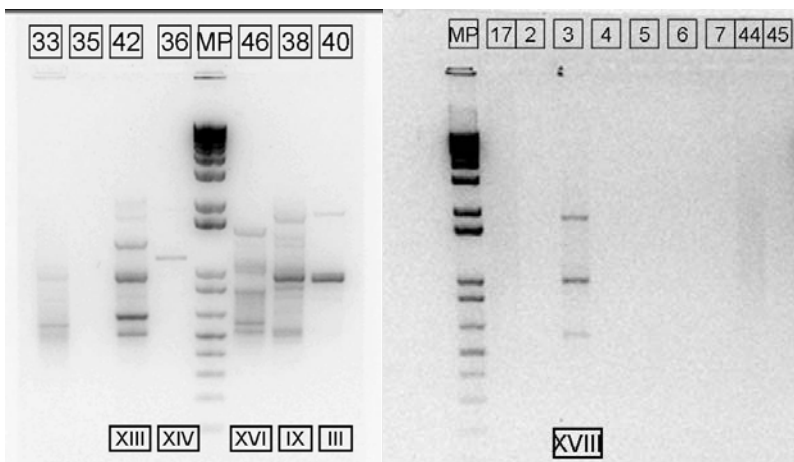
MP: Marcador de peso molecular, - control negativo

Figura 21. Agrupación de los aislamientos con el cebador OPA 2



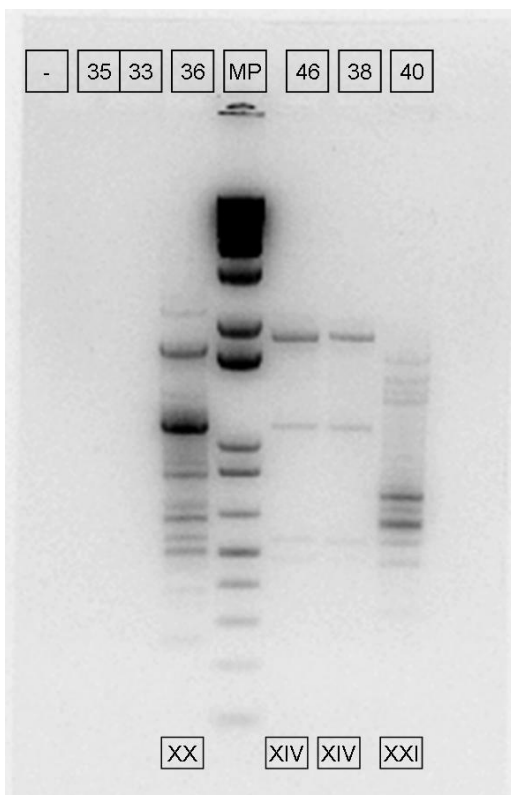
MP: Marcador de peso molecular, - control negativo

Figura 22. Agrupación de los aislamientos con el cebador OPA 2



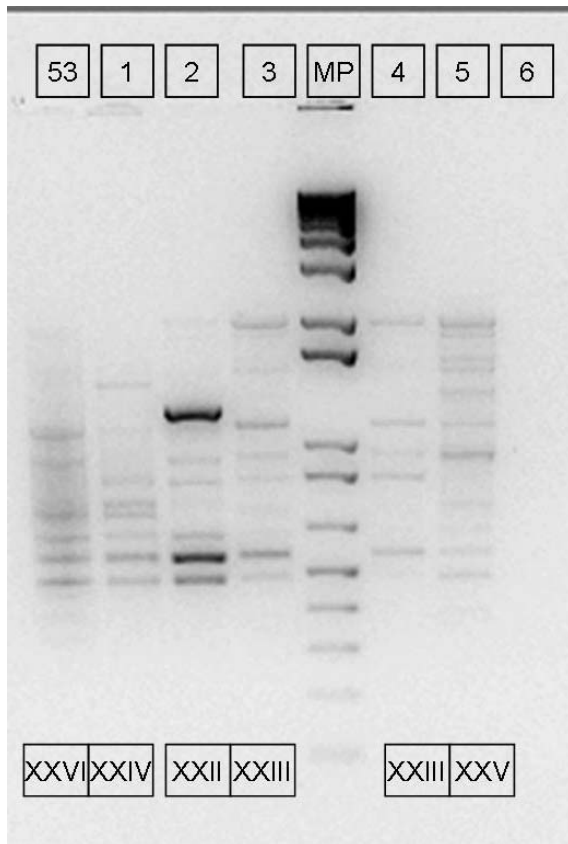
MP: Marcador de peso molecular, - control negativo

Figura 23. Agrupación de los aislamientos con el cebador OPA 13



MP: Marcador de peso molecular, - control negativo

Figura 24. Agrupación de los aislamientos con el cebador OPA 4



MP: Marcador de peso molecular, - control negativo

Se hicieron 26 grupos a partir de los patrones y se escogieron las cepas 1, 3, 11, 12, 14, 18, 16, 22, 26, 28, 29, 32, 36, 38, 39, 41, 42, 47 y 52, los cuales serán usados estudios posteriores para determinar si alguna de estas cepas son forma especial dianthi, la cual ataca el clavel.

6. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los hongos del género *Fusarium* son reconocidos en el campo de la fitopatología, por ser patógenos de cultivos importantes, además debido a la producción de micotóxicas cobraron importancia por ser causantes enfermedades en animales y humanos, adicional a las enfermedades asociadas a las micotóxicas (27, 28), se encuentran otro tipo de enfermedades causadas por el microorganismo en sí, se conoce como hialohifomicosis a las enfermedades producidas por hongos hialinos, entre ellos *Fusarium* sp. que puede causar infecciones en uñas y cornea en pacientes inmunocompetentes, últimamente han sido reconocidos como patógenos emergentes en pacientes inmunosuprimidos, especialmente en pacientes neutropénicos (22, 43).

En este estudio se encontraron que las especies implicadas fueron *F. solani*, *F. oxysporum* y *F. verticillioides* [= *F. moniliforme*] con un porcentaje de 59.6%, 38.3% y 3% respectivamente, en general estas especies son las que se aíslan con más frecuencia en todas las patologías, aunque existen otras 12 especies que han sido implicadas en las diversas patologías causadas por este género (43). Esta misma conducta se ha observado en otros estudios llevados a cabo, donde *F. solani* y *F. oxysporum* ocupan los primeros lugares variando entre el primer y segundo lugar, mientras que *F. verticillioides* [= *F. moniliforme*] ocupa el tercer lugar (12, 50). En otros estudios se ha reportado a *F. subglutinans* entre las especies más frecuentes antes de *F. verticillioides* [= *F. moniliforme*], pero en este estudio no se encontró ningún aislamiento de esta especie (41).

Algunos autores consideran que *F. oxysporum* es un agente tanto en uñas de manos como de pies; mientras que *F. solani* es aislado con mayor frecuencia de uñas de pies (17). En este estudio se observó que la mayoría de los aislamientos fueron a partir de las uñas de los pies, especialmente de la uña grueso artejo, también se realizaron aislamientos de las uñas de las manos pero en menor grado (datos no mostrados). Es posible que el alto número de aislamiento de *F. solani* se deba precisamente a que la

mayoría de muestras provienen de las uñas de los pies, aunque sería necesario demostrarlo comparándolo con otros estudios, otro factor que puede influenciar en la distribución de las especies son las diferencias geográficas, se ha observado que la incidencia de onicomycosis varía según la región donde se realiza el estudio (16), mientras que para con el género *Fusarium* en Colombia se ha visto que la especie más frecuente es *F. solani*, en otros estudios en Italia y Suiza la especie más común fue *F. oxysporum* (12, 29, 41, 50).

Los estudios de onicomycosis por *Fusarium* sp. son escasos, principalmente porque este género fue reconocido hace relativamente poco como agente etiológico de esta y otras patologías, por lo cual no son muchos los estudios acerca de las características clínicas y la respuesta al tratamiento (2, 3, 8, 18, 35, 51, 52, 54). Debido a los cambios de hábitos y al aumento de la población inmunosuprimida los casos van en aumento. En las onicomycosis por hongos dermatofitos se ha observado que existen ciertos factores del huésped que predisponen a la infección, en las onicomycosis por hongos no dermatofitos, incluido *Fusarium* sp., se ha observado que hay algunos factores que pueden predisponer a la infección no han sido claramente establecidos, los estudios se limitan a los factores ya conocidos en las onicomycosis por hongos no dermatofitos (12, 17, 50, 54).

Entre los factores asociados a las onicomycosis están el sexo y la edad, siendo más común en mujeres que en hombres y con un aumento en la prevalencia cuando aumenta la edad y siendo menos común en los primeros años de vida (6, 20). En este estudio se observa la misma tendencia en cuanto al sexo, es más frecuente en las mujeres (73.8%) que en los hombres (26.2%), este mismo patrón se ha observado en otros estudios (12, 17, 50, 54), el hecho que las mujeres tiendan a infectarse más frecuentemente que los hombres puede estar dado principalmente por los hábitos, aunque podría estar asociado a factores hormonales. En cuanto a la edad, la onicomycosis por *Fusarium* sp. fue más frecuente en pacientes entre los 21-30 años, seguido por pacientes entre los 31-40 años, lo cual difiere de lo visto en las onicomycosis en general, la cual es más frecuente en pacientes mayores (20), pero los otros estudios realizados con *Fusarium* sp. muestran la misma tendencia

que aquí siendo más común en los individuos adultos entre 20-40 años, pero se presenta en todas las edades (12, 17, 50, 54).

Otro de los factores que se estudia frecuentemente es el periodo de evolución de la enfermedad, la cual tiene un rango bastante amplio entre un mes a 40 años (17, 54), en este caso el periodo de evolución fue similar a los reportados entre 1 año y 30 años, en nuestro caso la mayoría de los individuos presentan menos de 5 años con la enfermedad, aunque existen casos de 30 años, lo cual indica que hay casos difíciles de tratar y tienden a persistir en el tiempo.

Como se ha mencionado anteriormente el aumento de la población inmunocomprometida se ha asociado con el aumento de esta patología, considerándolo un factor de riesgo (20), así mismo enfermedades como la diabetes han estado asociadas a la onicomycosis (42), lo que indica que pueden existir ciertas enfermedades de base que aumenten el riesgo a la infección, en los individuos estudiados se observó que el 60.3% al momento de realizar el diagnóstico no presentaba ninguna enfermedad de base, entre el 36.2% que presentaba alguna enfermedad, las más comunes son hipertensión, diabetes, hipotiroidismo, entre otras.

Los deportes han sido considerados un factor de riesgo, debido a los frecuentes traumas que se pueden sufrir en la práctica de los mismos, al igual que el uso compartido de baños y otras cosas, se ha observado que los jugadores de baloncesto en Estados Unidos tienen una alta incidencia de onicomycosis (6), en este caso el 55.3% de los pacientes practica algún deporte, la mayoría tienden a caminar o ir al gimnasio, algunos autores sugieren que el uso de calzado cerrado es un factor que ha hecho aumentar la incidencia de esta enfermedad (12, 20), esto sumado a la práctica de deportes donde generalmente se usan zapatos cerrados y se tiende a sudar crean un ambiente propicio para el desarrollo de los hongos, al igual que el uso compartido de baños y saunas en el caso de los gimnasios.

Como se mencionó anteriormente algunas practicas aumentan la probabilidad de infectarse por hongos tanto dermatofitos como no dermatofitos, los cambios en el estilo de vida han influenciado en este aumento, por ejemplo, prácticas tan comunes como realizarse un manicura y un pedicura, aumentan el riesgo de infección debido a los traumas que se pueden generar por el uso de herramientas mal desinfectadas, en este estudio se encontró que la mayoría de los individuos tienden a practicarse frecuentemente el manicura y el pedicura (66% y 63% respectivamente), por lo cual podría considerarse como un factor de riesgo.

Otro de los hábitos que puede estar esta vinculado con la onicomycosis es el bañarse descalzo, ya que entre en el baño se puede crear un ambiente propicio para el desarrollo de los hongos, y algunos hongos dermatofitos han sido aislados en baños y piscinas, en este estudio observamos que el 75.9% de los individuos se baña descalzo, lo que aumentaría el riesgo de infección. Otro de los factores de riesgo es el uso frecuente de piscinas y turcos o saunas, ya que al igual que las piscinas tienden a ser un ambiente propicio para el desarrollo de los hongos, en este caso la mayoría de los individuos no tienden a frecuentar piscinas, turcos o saunas, a pesar de estos no pueden descartarse estos factores de riesgo.

Los traumas tienden a aumentar la incidencia de la onicomycosis, ya que facilitan la entrada de los hongos al tejido del huésped, principalmente en hongos no dermatofitos, los cuales no poseen todas la enzimas para infectar fácilmente, entre los traumas se encuentran los golpes, cirugías, cortadas, entre otras, en los individuos estudiados el 71.6% no han sufrido ningún trauma, lo cual podría sugerir que estos hongos no dermatofitos, en este caso *Fusarium* sp., podrían infectar de otro modo, aun sin poseer todos los mecanismos necesarios.

Un punto importante en el estudio de la diferentes enfermedades causadas por microorganismos, en este caso por hongos, es el tratamiento y la resistencia a los mismos, por lo cual es importante conocer si los pacientes han recibido o no algún

tratamiento previo, para los estudios de resistencia y respuesta frente a los medicamentos, ya que la respuesta *in vivo* difieren por los diversos factores que influyen en la enfermedad; en este trabajo el 68% de los individuos han recibido algún tratamiento previo, algunos tratamientos empíricos, como el uso de hipoclorito de sodio, tintas o yodo, y la gran mayoría han usado tratamientos medicados, entre los cuales se encuentran el fluconazol, ketokonazol, terbinafina, entre otros. El uso de estos medicamentos antes de realizar el diagnóstico, no es recomendable puesto que en las levaduras del género *Candida* sp. se ha visto que la respuesta a los antifúngicos varía según la especie, haciendo así que los microorganismos adquieran resistencia. (53).

Como ya se ha mencionado en repetidas ocasiones las infecciones por hongos han cobrado auge en las últimas décadas(2, 3, 6, 8, 12, 18, 35, 43, 51, 54), pero los tratamientos para estas infecciones no se desarrollan de manera tan ágil como los tratamientos para las infecciones bacterianas, por lo cual aun no se cuentan con una gran gama de tratamiento y muchos de los actuales suelen ser ineficientes para muchos hongos, en los últimos años, es cuando más desarrollo han tenido los tratamientos para infecciones fúngicas, desarrollando nuevos compuestos, haciendo necesario el desarrollo de pruebas para determinar la susceptibilidad de los hongos frente a los antifúngicos ya existentes como los nuevos (30, 32, 33, 36, 37, 39, 40, 46, 49).

Las pruebas de susceptibilidad se llevaron a cabo siguiendo la metodología M38-A para hongos filamentosos, establecida por el Comité para estándares de Laboratorio internacionales (CLSI por sus siglas en inglés), los puntos de corte se establecieron hace poco, y aun son tentativos, para el *Fusarium* se usó la cepa *F. moniliforme* ATCC MYA-3629, la cual puede ser usada como referencia y el punto de corte para el voriconazol es de 1-4 µg/ml (14), hay que tener en cuenta que *F. moniliforme* en este estudio fue el que menos aislamientos tenía y adicionalmente quien presentaba una CIM menor que las otras dos especies, por lo cual aun no se puede establecer la relevancia clínica de los resultados, aunque en general para los azoles, en especial para el ketoconazol, una

concentración inhibitoria mínima mayor a 8 µg/ml se asocia con resistencia a este agente (25).

Para estas pruebas se usó como control de calidad dos levaduras *Candida parasilopsis* ATCC 22019 y *Candida krusei* ATCC 6258, ya que son los controles de calidad establecidos por el CLSI y han dado excelentes resultados en trabajos realizados con anterioridad, existen otras cepas de referencia que fueron incluidas hace un año(14).

En la literatura se reportan numerosos estudios sobre hongos filamentosos frente a diferentes azoles, entre ellos el voriconazol, el cual ha mostrado ser muy efectivo contra varios hongos pero no contra *Fusarium* sp. debido a que la CIM en muchos estudios está por encima de los 8 µg/ml (4, 13, 24, 34). En este estudio se observó un comportamiento similar al observado en los demás estudios, ya que el rango varió entre 0.5-16 µg/ml.

En cuanto a las especies *F. solani* es la que presenta la CIM más alta de 16 µg/ml, seguida por *F. oxysporum* con una CIM de 8 µg/ml y finalmente *F. verticillioides* [= *F. moniliforme*] con una CIM de 4 µg/ml, estos datos son similares a los reportados en la literatura (4, 13, 24), es posible que *F. solani* y *F. oxysporum* debido a la formación de clamidosporas presenten una mayor resistencia al voriconazol y otros azoles que *F. verticillioides* [= *F. moniliforme*] la cual no forma clamidosporas. Si se considera que un aislamiento con una CIM mayor a 8 µg/ml se considera resistente, en este estudio la resistencia para el voriconazol fue del 29.8% lo cual es un porcentaje muy bajo y difiere de los resultados hallados hasta el momento que indican que el porcentaje de resistencia suele estar por encima del 50%, aunque en general para considerar un antifúngico como efectivo la CIM debe ser menor a 1 µg/ml, y en este caso el porcentaje de inhibición es del 7.1%, lo que indica que la mayoría de los aislamientos tienen una CIM entre 2-4 µg/ml, donde el 63.1% de los aislamientos son sensibles a estas concentraciones, estos podrían considerarse susceptibles dependiendo de la dosis (S-DD) (4, 13, 24, 34). En la tabla 9 se observa que la CIM₉₀ para *F. oxysporum* y *F. verticillioides* [= *F. moniliforme*] es de 4 µg/ml, es decir que a esta concentración el 90% de los aislamientos

son inhibidos, mientras que *F. solani* tienen un CIM₉₀ mayor de 8 µg/ml, siendo esta especie la que mostró una mayor resistencia al voriconazol.

En las pruebas de sensibilidad en disco se encontró que el 80.1% de los aislamientos son resistente a una concentración de 1 µg, lo cual es concordante con las pruebas de microdilución en placa, donde el 92.9% presentan una CIM mayor a 1 µg/ml, mientras que solo un 19.6% son sensibles a esta cantidad de voriconazol, hasta el momento no existe un punto de corte para este antifúngicos en las pruebas de difusión en disco en levaduras, ni mucho menos para hongos filamentosos (26). Al igual que en el método de microdilución en placa, en el método de difusión en disco, la especie que muestras un mayor porcentaje de resistencia es *F. solani* (83.9%), seguida por *F. oxysporum* (66.7%) y finalmente *F. verticillioides* [= *F. moniliforme*] (66.7%), a pesar que *F. oxysporum* y *F. moniliforme* presentan el mismo porcentaje de resistencia, cabe anotar que el número de aislamientos para *F. verticillioides* [= *F. moniliforme*] es muy limitado (n=3), lo cual podría estar sesgando los resultado.

Aunque para la prueba de difusión en disco aun no se ha estandarizado la metodología y no se conoce la correlación entre la prueba de difusión en disco y el resultado clínico, debido a lo fácil, reproducible y barata puede ser usada como una herramienta para identificar en estudios con grandes muestras patrones de distribución en la población(10), aunque es necesario realizar más estudios al respecto.

En la tabla 12 se observa que existe una muy buena correlación entre ambos métodos, ya que 109 de los 140 aislamientos mostraron resistencia mayor a 2 µg/ml por el método de microdilución y no mostraron un halo de inhibición por el método de difusión en disco, los aislamientos que se encuentran 1-4 µg/ml en el método de microdilución son aquellos se muestran un halo de inhibición en el rango medio entre 13-19 mm, mientras que los aislamiento que mostraron un halo de inhibición entre 21-32 mm se encuentran en la concentración de 0.5-1 µg/ml, aunque hay algunos aislamientos con una concentración de 8 µg/ml. Estos resultados muestran que existen una correlación aunque

muy pobre entre ambos métodos, pero aun es necesario establecer la concentración del inóculo, el tiempo de incubación, los puntos de corte y otras variables para que esta metodología sea válida para los hongos filamentosos, a pesar que falta estandarizar la metodología algunos autores sugieren, principalmente para las levaduras, que se puede hacer un análisis muy similar al realizado con fluconazol, teniendo en cuenta los puntos de corte del mismo (23).

El voriconazol es uno de los últimos compuestos azólicos que ha salido al mercado y se ha reportado su uso para el tratamiento en infecciones a pacientes inmunocomprometidos con infecciones por hongos, entre ellas las causadas por *Fusarium* sp., adicionalmente se ha reportado en la literatura su éxito en el tratamiento de diferentes pacientes, en contraste con esto se encuentra que las pruebas *in vitro* muestran CIM muy altas para los aislamientos evaluados, en este y otros estudios. Nuestro objetivo era evaluar este antifúngico con aislamientos provenientes de pacientes con onicomycosis, para evaluar su posible uso en este tipo de infecciones, el cual puede ser una excelente alternativa para estos pacientes.

Finalmente se realizó la selección de 20 de las 54 cepas de *F. oxysporum*, mediante RAPDs, para en estudios posteriores determinar si pertenecen o no a la forma especial *dianthi*, para la selección se usaron tres cebadores OPA 2, 4 y 13, los cuales dieron diferentes perfiles que permitieron la selección de las 20 cepas, se escogieron estos primeros debido a su disponibilidad y su amplio uso en los estudios donde usan RAPDs.

7. CONCLUSIONES

Debido a la importancia que ha cobrado el género *Fusarium* sp. como causante de enfermedades se ha hecho necesario conocer cuales son las especies involucradas, en el caso de la onicomycosis se ha encontrado que las especies más frecuentemente involucradas son *F. solani*, *F. oxysporum* y *F. verticillioides* [=*F. moniliforme*].

Existen diversos hábitos y factores de factores de riesgo en los pacientes que pueden estar involucrados en la infección por *Fusarium* sp., entre los cuales están el sexo, es más frecuente en mujeres que en hombres, realizarse manicura y pedicura, se bañarse descalzo y realizan deporte.

La mayoría de los aislamientos fueron resistentes al voriconazol a una concentración de 4 µg/ml por la metodología de micro dilución, mientras que por la técnica de difusión en disco la mayoría de los aislamientos no presentaron halo de inhibición con un disco que contiene 1 µg de voriconazol.

Aunque es necesario establecer una metodología estandarizada para la metodología de difusión en disco para hongos filamentosos, se ve que ambas técnicas tienen una correlación aceptable, y es necesario establecer la relación clínica de los resultados por estos metidos.

Es necesario hacer más estudios donde se realice un seguimiento a los pacientes para comprobar el resultado del tratamiento y su correlación con las pruebas *in vitro*.

BIBLIOGRAFIA

1. Agrios G. 1997. *Plant Pathology*: Academic Press
2. Anaissie E, Kantarjian H, Jones P, Barlogie B, Luna M, et al. 1986. Fusarium. A newly recognized fungal pathogen in immunosuppressed patients. *Cancer* 57: 2141-5
3. Anaissie EJ, Bodey GP, Rinaldi MG. 1989. Emerging fungal pathogens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 8: 323-30
4. Arian S, Lozano-Chiu M, Paetznick V, Rex JH. 2001. In Vitro Susceptibility Testing Methods for Caspofungin against Aspergillus and Fusarium Isolates. In *Antimicrob. Agents Chemother.*, pp. 327-30
5. Arian S, Rex JH. 2003. Antifungal Agents. In *Manual of clinical microbiology*, ed. P Murray. Washington, D.C: ASM Press
6. Ballesté R, Mousqués N, Gezuele E. 2003. Onicomycosis. Revisión del tema. *Rev Med Uruguay* 19: 93-106
7. Baran R, Hay RJ, Tosti A, Haneke E. 1998. A New Classification of onychomycosis. *Br J dermatol* 139: 567-71
8. Boutati EI, Anaissie EJ. 1997. Fusarium, a significant emerging pathogen in patients with hematologic malignancy: ten years' experience at a cancer center and implications for management. *Blood* 90: 999-1008
9. Castro N, Cepero MC, Sopo L. 2004. *Estudio descriptivo y observacional sobre la Onicomycosis producida por Fusarium spp.* Universidad de los Andes, Bogotá
10. Colombo AL, Matta Dd, Almeida LPd, Rosas R. 2002. Fluconazole Susceptibility of Brazilian Candida Isolates Assessed by a Disk Diffusion Method. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 6: 118-23
11. Elewski BE. 1998. Onychomycosis: Pathogenesis, diagnosis and management. *Clin Micro Rev* 11: 415-29
12. Escobar ML, Carmona-Fonseca J. 2003. Onicomycosis por hongos ambientales no dermatofíticos. *Revista Iberoamericana de Micología* 20: 6-10
13. Espinel-Ingroff A. 2001. In Vitro Fungicidal Activities of Voriconazole, Itraconazole, and Amphotericin B against Opportunistic Moniliaceous and Dematiaceous Fungi. In *J. Clin. Microbiol.*, pp. 954-8
14. Espinel-Ingroff A, Fothergill A, Ghannoum M, Manavathu E, Ostrosky-Zeichner L, et al. 2005. Quality Control and Reference Guidelines for CLSI Broth Microdilution Susceptibility Method (M38-A Document) for Amphotericin B, Itraconazole, Posaconazole, and Voriconazole. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 5243-6
15. Ghannoum M, Rex J, Galgiani J. 1996. Susceptibility testing of fungi: current status of correlation of in vitro data with clinical outcome. In *J. Clin. Microbiol.*, pp. 489-95
16. Ghannoum MA, Hajjeh RA, Scher R, Konnikov N, Gupta AK, et al. 2000. A large-scale North American study of fungal isolates from nails: The frequency of

- onychomycosis, fungal distribution, and antifungal susceptibility patterns. *J Am Acad Dermatol* 43: 641-8
17. Godoy P, Nunes E, Silva V, Tomimori-Yamashita J, Zaror L, Fischman O. 2004. Onychomycosis caused by *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* in Sao Paulo, Brazil. *Mycopathologia* 157: 287-90
 18. Helm TN, Longworth DL, Hall GS, Bolwell BJ, Fernandez B, Tomecki KJ. 1990. Case report and review of resolved fusariosis. *J Am Acad Dermatol* 23: 393-8
 19. Hoog GS, Guarro J, Gene J, Figueras MJ. 2003. *Atlas of Clinical Fungi*: Centraalbureau voor Schimmelcultures
 20. Jain S, Sehgal VN. 2000. Onychomycosis: an epidemio-etiological perspective. *International Journal of Dermatology* 39: 100-3
 21. Kauffman CA. 2006. Fungal infections. *The Proceedings of the American Thoracic Society* 3: 35-40
 22. López-Jodra O, Torres-Rodríguez JM. 1999. Especies fúngicas poco comunes responsables de onicomicosis. *Revista Iberoamericana de Micología* 16: S11-S5
 23. Matar MJ, Ostrosky-Zeichner L, Paetznick VL, Rodríguez JR, Chen E, Rex JH. 2003. Correlation between E-Test, Disk Diffusion, and Microdilution Methods for Antifungal Susceptibility Testing of Fluconazole and Voriconazole. *Antimicrobial Agents and chemotherapy* 47: 1647-51
 24. Meletiadi J, Meis JFGM, Mouton JW, Donnelly JP, Verweij PE. 2000. Comparison of NCCLS and 3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazyl)-2,5-Diphenyl-2H-Tetrazolium Bromide (MTT) Methods of In Vitro Susceptibility Testing of Filamentous Fungi and Development of a New Simplified Method. In *J. Clin. Microbiol.*, pp. 2949-54
 25. National SLCfC. 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved Standard. In *National Committee for Clinical Laboratory Standard*
 26. National SLCfC. 2004. Method for Antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeast, Approved guideline.
 27. Nelson PE, Dignani MC, Anaissie EJ. 1994. Taxonomy, Biology, and Clinical Aspects of *Fusarium* species. *Clinical Microbiology Reviews* 7: 479-504
 28. Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WFO. 1983. *Fusarium Species. An illustrated Manual for Identification*: The Pennsylvania State University. 193 pp.
 29. Ninet B, Jan I, Bontems O, Léchenne B, Jousson O, et al. 2005. Molecular Identification of *Fusarium* Species in Onychomycoses. *Dermatology* 210: 21-5
 30. Paphitou NI, Ostrosky-Zeichner L, Paetznick VL, Rodríguez JR, Chen E, Rex JH. 2002. In Vitro Activities of Investigational Triazoles against *Fusarium* Species: Effects of Inoculum Size and Incubation Time on Broth Microdilution Susceptibility Test Results. In *Antimicrob. Agents Chemother.*, pp. 3298-300
 31. Pardo GA, Duran OE. 1999. Revisión taxonómica del género *Fusarium*. *Revista de Investigaciones. Universidad de Pamplona* 3: 133-43
 32. Petrikkou E, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Gomez A, Molleja A, Mellado E. 2001. Inoculum Standardization for Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi Pathogenic for Humans. In *J. Clin. Microbiol.*, pp. 1345-7

33. Pfaller M, Bale M, Buschelman B, Lancaster M, Espinel-Ingroff A, et al. 1995. Quality control guidelines for National Committee for Clinical Laboratory Standards recommended broth macrodilution testing of amphotericin B, fluconazole, and flucytosine. In *J. Clin. Microbiol.*, pp. 1104-7
34. Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ, Jones RN. 2002. Antifungal Activities of Posaconazole, Ravuconazole, and Voriconazole Compared to Those of Itraconazole and Amphotericin B against 239 Clinical Isolates of *Aspergillus* spp. and Other Filamentous Fungi: Report from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2000. In *Antimicrob. Agents Chemother.*, pp. 1032-7
35. Ponton J, Ruchel R, Clemons KV, Coleman DC, Grillot R, et al. 2000. Emerging pathogens. *Med Mycol* 38 Suppl 1: 225-36
36. Pujol I, Guarro J, Sala J, Riba M. 1997. Effects of incubation temperature, inoculum size, and time of reading on broth microdilution susceptibility test results for amphotericin B against *Fusarium*. In *Antimicrob. Agents Chemother.*, pp. 808-11
37. Radford S, Johnson E, Warnock D. 1997. In vitro studies of activity of voriconazole (UK-109,496), a new triazole antifungal agent, against emerging and less-common mold pathogens. In *Antimicrob. Agents Chemother.*, pp. 841-3
38. Restrepo A, Robledo J, Leiderman E, Restrepo M, Botero D, Bedoya V. 2003. *Enfermedades Infecciosas. Fundamentos de Medicina.*: Corporación para Investigaciones Biológicas
39. Rex J, Pfaller M, Lancaster M, Odds F, Bolmstrom A, Rinaldi M. 1996. Quality control guidelines for National Committee for Clinical Laboratory Standards--recommended broth macrodilution testing of ketoconazole and itraconazole. In *J. Clin. Microbiol.*, pp. 816-7
40. Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, et al. 2001. Antifungal Susceptibility Testing: Practical Aspects and Current Challenges. In *Clin. Microbiol. Rev.*, pp. 643-58
41. Reyes C, Sopo L, Cepero MC. 2001. *Onicomycosis por Fusarium: determinación de especies y correlación de datos clínicos*. Universidad de los Andes, Bogotá
42. Rich P, Hare A. 1999. Onychomycosis in a special patient population: focus on the diabetic. *International Journal of Dermatology* 38: 17-9
43. Richardson MD, Warnock DW. 2003. *Fungal Infection. Diagnosis and Management*: Blackwell Publishing. 366 pp.
44. Sagnelli C, Fumagalli L, Prigitano A, Baccari P, P.Magnani, Lazzarin A. 2006. Successful voriconazole therapy of disseminated *Fusarium verticillioides* infection in an immunocompromised patient receiving chemotherapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 57: 796-8
45. Sheehan DJ, Hitchcock CA, Sibley CM. 1999. Current and Emerging Azole Antifungal Agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12: 40-79
46. Sheehan DJ, Hitchcock CA, Sibley CM. 1999. Current and Emerging Azole Antifungal Agents. In *Clin. Microbiol. Rev.*, pp. 40-79
47. Stanzani M, Vianelli N, Bandini G, Paolini S, Arpinati M, et al. 2006. Successful treatment of disseminated Fusariosis after allogeneic hematopoietic stem cell

- transplantation with the combination of voriconazole and liposomal amphotericin B. *Journal of Infection* 53: e243-e6
48. Summerrell BA, Leslie JF, Backhouse D, Bryden WL, Burgess LW, eds. 2001. *Fusarium*. *Paul E. Nelson Memorial Symposium*: APS Press. 392 pp.
 49. Tawara S, Ikeda F, Maki K, Morishita Y, Otomo K, et al. 2000. In Vitro Activities of a New Lipopeptide Antifungal Agent, FK463, against a Variety of Clinically Important Fungi. In *Antimicrob. Agents Chemother.*, pp. 57-62
 50. Tosti A, Piraccini BM, Lorenzi S. 2000. Onychomycosis caused by nondermatophytic molds: clinical features and response to treatment of 59 cases. *J Am Acad Dermatol* 42: 217-24
 51. Veglia KS, Marks VJ. 1987. *Fusarium* as a pathogen. A case report of *Fusarium* sepsis and review of the literature. *J Am Acad Dermatol* 16: 260-3
 52. Walsh TJ, Groll A, Hiemenz J, Fleming R, Roilides E, Anaissie E. 2004. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. *Clin Microbiol Infect* 10 Suppl 1: 48-66
 53. White TC, Marr KA, Bowden RA. 1998. Clinical, Cellular, and Molecular Factors That Contribute to Antifungal Drug Resistance. In *Clin. Microbiol. Rev.*, pp. 382-402
 54. Zuluaga Á, Tabares ÁM, Arango M, Robledo MA, Restrepo Á, Lotero MC. 2001. Importancia creciente de los géneros *Fusarium* y *Scytalidium* como agentes de onicomicosis. *Revista Asociación Colombiana de Dermatología & Cirugía Dermatológica* 9: 593-9

ANEXOS

Anexo 1. Composición de los medios utilizados

Nash and Snyder Medium (NSM)

Peptona.....	15 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ * 7H ₂ O.....	0.5 g
Agar.....	20 g
Pentacloronitrobenzeno.....	1 g
Agua.....	1 Lt

pH 5.5-6.5

Después de autoclavar agregar 20 ml de estreptomicina y 12 ml de neomicina.

La solución stock de estreptomicina es preparada agregando 5 g a 100 ml de agua destilada estéril y la de neomicina agregando 1 g a 100 ml de agua destilada estéril.

Se producen grandes cantidades de amonio, por lo cual el hongo puede morir después de 20-30 días (28).

En este medio el crecimiento de *Fusarium* es lento, se forman colonias pequeñas e inhiben no solo bacterias sino otros hongos. Las colonias que se forman no son características de *Fusarium* y la esporulación es pobre y atípica.

Papa dextrosa Agar o Potato Dextrose Agar (PDA)

Dextrosa.....	15 g
Agar.....	20 g
Papa.....	200 g ¹
Agua.....	1 Lt
Cloranfenicol.....	500 mg

El PDA es usado principalmente para ver una morfología global (a grandes rasgos) y observar el pigmento de la colonia. Debido a la alta cantidad de carbohidratos en este medio se enfatiza el crecimiento, en vez, de la esporulación. La esporulación es pobre y generalmente toma más de un mes, los conidios producidos son atípicos. La alta cantidad de carbohidratos hace también que aumente la probabilidad de que ocurran las mutaciones (28).

¹ El extracto de papa se prepara a partir de 1800 g de papas peladas y cortadas en forma de cubos, se agregan 4500 ml de agua y se calienta por 10 minutos. Las papa se descartan y el líquido se almacena y luego se autoclave a 15 psi por 15 min. Se puede almacenar en el refrigerador hasta su uso

28. Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WFO. 1983. *Fusarium Species. An illustrated Manual for Identification*: The Pennsylvania State Unveristy. 193 pp..

Agar Agua o Agar Hojas de Clavel (CLA, Carnation-Leaf Agar)

Agar.....15 g

Agua.....1 Lt

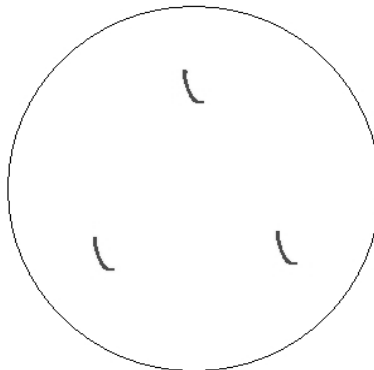
Hojas de clavel joven (*Dianthus caryophyllus*)

KCl (opcional).....4-8g

Este medio promueve la esporulación en vez del crecimiento micelial (28).

Se puede agregar KCl, ya que este favorece la formación de microconidios en cadena, especialmente en la Sección Liseola (28).

Figura 20. Esquema de siembra en CLA



Anexo 2. Datos de los pacientes en estudio

historia clínica	sexo	edad	evolución	enf. base*	trauma	ab*	ultimo tratamiento	animales	ma*	pe*	b. de.*	mar*	gu*	t/s*	ps*	deporte
42725	m	29	2 años		si	si	si	perro	no	no	si	si		si	si	no
42638	f	49	4 meses	hipotiroidismo	no	no	si	no	no	no	si	no		no	no	no
42384	f	48	8 meses	hipotiroidismo	no	si	si	no	si	si	si	si		si	si	aerobicos
42369	f	43	2 meses	tiroides	no	no	si	perro	si	si	si	si		no	si	caminar
42367	f	45	6 meses	no	no	no	no	no	no	no	si	no		no	si	gimnasio
42331	f	33	4 años	no	no	no	no	no	si	si	si	si		si	si	gimnasio
42327	f	57	2 años	gastritis	no	no	si	no	si	si	si	si		si	si	tenis
42291	f	39	6 meses	no	no	no	no	hamster	si	si	si	no		no	si	spinnig
42290	f	55	6 meses	no	no	no	si	p/g	si	si	si	si		si	no	gimnasio
42277	f	33	6 meses	rinitis	si	si	no	no	si	si	si	si		si	si	no
42272	m	74	3 años	no		si	si	no	si	si	si	no		no	no	caminar
42271	f	31	2 meses	no	no	no	si	perro	si	si	si	si		si	si	no
42260	m	71	2 años	hipertension por inf. venosa	no	no	si	no	si	si	si	no		no	no	no
42185	f	30	2 meses	no	no	no	si	no	si	si	si	no		no	no	si
42174	m	48	10 años	dislipidemia mixta	si	no	no	perro	no	no	no	no		no	no	trotar
41999	f	59	7 años	no	no	no	si	no	si	si	si	no		no	no	no
41955	f	38	6 meses	no		no	si	no	si	si	si	no		no	no	no
41923	f	43	2 años	no	no	si	si	no	si	si	si	no	si	no	si	no
41901	f	63	15 años	hipertensa	si	no	no	no	no	no	si	si	no	no	si	natacion
41898	f	28	6 meses	no	no	no	no	no	si	si	si	no		si	si	no
41851	m	39	2 años	linfoma	si	no	si	no	si	si	si	si		si	si	trotar
41844	f	61	2 años	no	no	no		no	no	no	no	no	no		no	no
41818	f	28	1 año	no	no	no	si	no	no	no	no	si	no	no	no	no
41768	f	24	3 años	no	no	no	si	no	si	si	si	no	no	no	no	bak
41747	f	68	1 año	ht	no	si	si	no	si	si	si	si	si	no	no	caminar
41615	m	56	3 años	no	no	no	si	no	si	no	si	no		si	no	tenis
41594	f	27	10 años	gastritis	si	si	si	perro	si	si	no	no		no	no	bicicleta

40691	f	58	1 año	no	no	no	si	no	si	si	si	si	no	no	no	caminar
40687	m	43	6 meses	no	no	no	si	no	no	no	si	no	no	no	si	no
40660	f	34	1 año	no	si	no	si	no	si	si	no	no	-	no	no	ciclismo
40574	f	48	*	tiroides	no	no	si	no	si	si	si	si	-	no	no	caminar- bicicleta
40544	m	37	10 años	no	si	no	si	no	si	si	si	si	no	si	no	no
40447	f	75	6 meses	osteoporosis	no	no	si	perro	si	no	no	si	si	no	si	no
40393	m	54	e 20a p 4m	ht	no	si	no	no	si	no	si	no	-	si	si	no
40320	f	40	7 meses	hipotiroidismo	no	no	si	no	si	si	si	si	no	no	si	no
40270	m	17	2 años	no	no	no	si	perro	si	si	si	si	-	no	si	gimnasio
40258	f	39	4-5 años	lupus	no	no	si	no	si	si	si	no	-	no	no	no
40184	f	16	9 meses	no	no	-	si	perro	si	si	si	si	si	no	si	-
40162	m	43	30 años	no	no	no	no	no	no	no	si	no	-	no	no	baloncensto ciclismo
33265	f	36	3 años	no	no	no	si	no	si	si	si	si	-	no	no	danzar correr
33262	f	38	3 años	no	si	no	si	no	si	si	si	si	no	si	no	no
33254	f	38	4 años	no	no	no	si	perro	si	si	si	no	-	no	no	no
33176	m	65	1 1/2 año	no	no	no	si	no	no	no	no	si	-	si	si	trotar
33126	f	29	2 meses	no	no	no	si	si	si	si	si	no	-	no	no	caminar
33120	f	52	1 año	no	si	no	si	no	si	si	si	no	-	no	no	tenis
33088	f	54	2-3 años	no	no	no	no	no	-	si	si	no	-	si	no	caminar
33049	f	42a	> 1 año	no	si	no	no	perro	si	si	si	si	-	no	si	gimnasio
33042	f	49	30 años	no	si	no	si	perro	si	si	si	si	no	si	si	caminar trotar
33012	f	52a	> 2 años	tiroides	si	no	si	no	si	si	si	si	-	no	si	caminar ginmasio
32989	m	60	3 meses	no	no	si	no	no	si	si	si	no	no	si	si	ciclismo atletismo
32985	f	62a	> 20 años	si	si	no	no	pyg	si	no	no	si	no	si	si	trotar
32968	f	51	3 meses	no	no	si	no	no	si	si	si	no	no	no	no	no
32957	m	36	2 años	no	si	no	si	no	no	no	si	si	-	no	si	no
32874	f	46	> 20 años	no	si	no	si	no	si	si	si	si	si	no	si	no
32872	m	34a	2 años	no	no	no	si	no	no	no	si	no	-	no	si	ciclismo-

																	futbol
32843	f	62	3 años	artritis	no	no	no	no	no	no	si	no	-	no	si	caminar	
32820	f	45a	2 años o +	art. reumatoid.	si	no	si	no	si	si	no	si	si	no	si	caminar	
32814	m	38	20 años	no	no	no	si	perro	no	no	si	no	-	no	si	ciclismo	
32643	f	22	5 años	diabetes	si	no	-	no	si	si	si	no	-	no	no	microfutbol	
32638	f	29a	5 años	no	si	no	no	no	si	si	si	no	no	no	si	natacion	
32635	f	33a	1 mes	no	no	no	no	perro	-	no	si	si	-	no	no	no	
32583	f	75	1 año	hta	si	-	si	no	-	no	si	no	-	no	no	no	
32564	f	49	7 años	hta	no	-	si	no	no	no	no	no	-	no	no	no	
32557	f	50	4 años	no	no	no	si	no	si	si	si	si	-	si	si	no	
32541	f	46	3 años	tiroides	no	-	no	no	si	si	no	no	-	no	no	no	
32539	f	50	1 año	no	no	si	si	no	si	si	si	no	-	no	si	gimnasio	
32527	f	54	2 ?	no	si	no	si	perro	si	si	si	si	-	no	no	camina	
32519	f	41	1 año	no	no	-	no	no	si	si	si	no	-	no	si	no	
32451	f	39	2 años	hipoglicemia	no	no	si	no	-	si	si	no	-	no	no	no	
32426	f	36	1 mes	no	no	no	no	no	si	si	no	no	-	no	si	bicicleta est-natacion	
32386	f	40	1 1/2-2 año	anticoagula	no	si	si	no	si	si	si	si	-	no	no	no	
32364	f	52	5 años	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	
32268	f	36	2 meses	no	no	si	no	no	no	no	si	no	-	no	no	no	
32218	f	35	4 años	ht en embaraz	si	no	ojo	perro	si	si	no	si	-	no	si	no	
32181	f	41	2-3 años	-	no	-	si	-	si	no	si	no	-	no	no	-	
32136	f	57	10 años	cx de seno	si	-	si	-	si	no	no	si	-	si	si	gimnasio	
32003	f	50	5 meses	hta	no	-	-	perro	-	no	no	no	-	no	no	caminata	
32000	f	42	1 año	diabetes	no	*	no	no	si	si	si	no	-	no	si	no	
31977	f	51	4 años	hipotir. hta	no	-	si	-	si	si	si	no	-	si	no	-	
31932	f	42	1 años	no	no	-	si	perro	no	si	si	no	-	no	no	no	
31930	m	22	3 años	no	no	-	si	no	no	no	si	no	-	no	no	gimnasio	
31875	f	33	10 años	-	no	-	si	-	si	si	si	no	-	no	si	spinnig	
31860	m	72	5 años	glaucoma	no	-	si	no	-	no	si	si	-	no	no	caminar	
31858	f	54	2 años	asma	no	si	no	perro	si	si	si	si	-	si	si	no	

31822	m	53	2 años	calculos renal	no	si	no	perro	si	si	si	si	-	si	no	tenis
31816	f	51	15 años	tiroides	no	si	si	no	si	si	no	no	-	no	si	no
31753	m	53	1 año	no	no	si	no	no	si	no	si	no	-	no	no	trotar
31617	f	48	6 años	acu +- 12 a	si	cb	si	no	si	-	-	si	si	no	no	-
31509	f	30	2 años	no	no	no	si	perro	si	si	si	si	-	si	si	no
31451	m	85	30 años	hta	no	no	no	no	no	no	si	no	-	no	no	golf
31412	f	36	5 meses	no	no	no	si	no	si	si	si	no	-	no	no	no
31371	f	43	3 meses	hipotiroidismo	si	no	no	perro	si	si	si	no	-	no	si	no
31347	f	51	1 año	no	no	si	no	no	si	no	si	si	-	si	si	no
31224	f	36	1/ 3 meses	no	si	si	no	no	si	si	si	no	no	no	si	bicicleta
31175	f	47	>1 año	no	no	no	no	perro	si	si	si	si	-	no	no	no
31157	f	39	4 años	no	no	-	no	no	no	no	no	no	no	no	no	ciclismo
31130	m	30	10 años	no	si	-	no	perro	no	no	si	no	no	no	no	no
31122	f	23	8 meses	no	no	si	si	no	si	si	-	no	-	si	si	sppininig-natacion
31089	m	34	2 años	no	no	-	si	-	no	no	no	no	no	no	no	ciclismo
31071	f	38	10 meses	no	no	si	no	-	no	no	si	no	-	no	no	no
31068	f	44	5 años	no	no	no	si	no	si	si	no	no	-	no	si	tenis-trotar
31034	f	53	4 meses	hipertension hipotiroidismo	no	no	si	perro	si	si	no	no	-	no	no	caminar
30924	f	32	6-7 años	no	no	no	si	no	si	si	si	no	-	no	no	yoga
30902	m	55	2-3 años	no	no	-	-	si	no	no	si	si	no	si	no	tenis
30790	m	48	?	no	si	no	no	no	no	no	si	no	-	si	no	futbol
30133	f	24	2-3 años	no	no	no	si	no	si	si	si	no	-	si	si	no
30074	f	49	1/ 3 meses	ht alergia	no	no	no	no	si	no	no	no	si	no	no	caminar
30047	f	35	3 años	hipoglicem	no	no	si	perro	si	si	si	no	-	si	si	no

*Enf. Base: Enfermedad de base, Ab: Antibiotico, Ma: Manicura, Pe: Pedicura, B. de.: Baña descalzo, mar: visitas al mar, Gu: uso de guantes, T/S: Turco/sauna, Ps: Piscina