REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE "RAFAEL RANGEL"
GERENCIA DE DOCENCIA E INVESTIGACIÓN
COORDINACIÓN DE POSTGRADO
ESPECIALIZACIÓN EN MICOLOGÍA MÉDICA

SUSCEPTIBILIDAD *IN VITRO* DEL COMPLEJO *Fusarium solani* FRENTE A CINCO ANTIFUNGICOS POR CONCENTRACIÓN MINIMA INHIBITORIA SEGÚN EL METODO M38-A2 DEL CLSI

AUTORA: ANDREINA DUARTE
TUTORA: MARÍA MERCEDES PANIZO

CARACAS, NOVIEMBRE 2012

República Bolivariana de Venezuela
Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"
Gerencia de Docencia e Investigación
Coordinación de Postgrado
Especialización en Micología Médica

SUSCEPTIBILIDAD *IN VITRO* DEL COMPLEJO *Fusarium solani* FRENTE A CINCO ANTIFUNGICOS POR CONCENTRACIÓN MINIMA INHIBITORIA SEGÚN EL METODO M38-A2 DEL CLSI

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE ESPECIALISTA EN MICOLOGÍA MÉDICA

AUTORA: ANDREINA DUARTE
TUTORA: MARIA MERCEDES PANIZO

CARACAS, NOVIEMBRE 2012

CONSTANCIA

En mi carácter de Tutor del Trabajo Especial de grado titulado "Susceptibilidad *in vitro* del complejo *Fusarium solani* frente a cinco antifúngicos por concentración mínima inhibitoria según el método M38-A2 del CLSI" presentado por la ciudadana Andreína Duarte Rojas para optar al Grado de Especialista en Micología Médica, considero que dicho trabajo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser evaluado por parte del jurado examinador que se designe.

En la ciudad de Caracas, a los 5 días del mes de octubre de 2012.

María Mercedes Panizo

C.I. 6.792.327

República Bolivariana de Venezuela
Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"
Gerencia de Docencia e Investigación
Coordinación de Postgrado
Especialización en Micología Médica

SUSCEPTIBILIDAD *IN VITRO* DEL COMPLEJO *Fusarium solani* FRENTE A CINCO ANTIFUNGICOS POR CONCENTRACIÓN MINIMA INHIBITORIA SEGÚN EL METODO M38-A2 DEL CLSI

Autora: Andreína Duarte

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE ESPECIALISTA EN MICOLOGÍA MÉDICA

Noviembre, 2012

APROBADO:

Liset Lage	**María Teresa Maniscalchi**

María Mercedes Panizo

ACEPTADO:

Gladys González

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se llevo a cabo gracias a Dios y a la colaboración de muchas personas, entre ellas:

A la profesora Mercedes Panizo, por darme la oportunidad de realizar esta investigación, por creer en mí, por su apoyo, por su paciencia para enseñarme, por sus consejos y amistad, eres un ejemplo de profesionalismo.

A mis profesores: Vera, Maribel, y Giuseppe por todas sus enseñanzas, perseverancia y cariño.

A todo el personal de Micología, al Departamento de Medios de Cultivo, al Departamento de Cultivo Celular y al Departamento de Química del Instituto Nacional de Higiene, por la colaboración brindada para llevar a cabo esta investigación.

A mi esposo porque en los momentos más duros de mi vida has estado apoyándome para que yo siga adelante, por tantas noches de trasnochos que vivimos juntos para que me sintiera acompañada y no sintiera cansancio. Por todo eso gracias, ¡TE AMO!

A mis compañeros del postgrado: Andreina y Javier, con quienes compartí no solo estos dos años de estudio sino también la parte experimental de mi tesis, a Olguita, Maríalejandra, María Teresa, les deseo mucho éxito en sus vidas. ¡Gracias por su cariño y amistad!

A mis amigas y compañeras del postgrado Anny y Nancy, con quienes he compartido alegrías, tristezas, cansancio y experiencias únicas e irrepetibles, ¡las quiero mucho!

A mis padres por ser el pilar de mi vida, por estar conmigo siempre para que yo siga adelante, todo lo que soy es gracias a ustedes. ¡Los amo!

A mi hermana y mi sobrino por ser parte esencial para el logro de mis metas, siempre estarán en mi corazón. ¡Los extraño!

A la Dra. María Eugenia Landaeta y toda la cátedra de Microbiología de la escuela “Luis Razetti” por el apoyo brindado y darme el permiso para llevar a fin mis estudios.

A mis amigos: Giorgina, Irani, Mariana, Yolanda, Gladis, Pablo, Morelis, Gracias de todo corazón por el cariño, la paciencia y el apoyo incondicional que me brindaron sin esperar nada a cambio. ¡Los quiero mucho!

DEDICATORIA

A Dios por haberme dado la vida para lograr mis objetivos y afianzar más mi fe y la esperanza todos los días de mi vida.

A mi madre, por su ejemplo de entrega y dedicación, porque creíste en mi en el momento más difícil de tu vida y la mía, eres un ejemplo de vida, de perseverancia y constancia, te amo mamá, me has enseñado y demostrado que cuando se quiere se puede.

A mi padre, por la motivación constante, por el valor mostrado para salir adelante, por las llamadas que me haces diariamente para darme tus bendiciones.

A mi esposo, por estar a mi lado, brindándome su amor y apoyo incondicional, por tu comprensión y paciencia durante estos años de mi vida, por prestarme tu hombro para llorar cuando más lo necesite.

A mi hermana y amiga, mil palabras no bastarían para agradecerte tu apoyo y comprensión, gracias hermanita por cuidar de mi madre, eres un ejemplo a seguir, te admiro.

A mi sobrino Jesús Andrés, por ser una luz maravillosa que vino a llenar mi vida de alegría, ternura y felicidad, que Dios te bendiga siempre.

A mis sobrinitos Cristian y Adriana, por tanto cariño, siempre los tengo presente y les deseo lo mejor.

A mis tíos Ciro, Edelmira, Pilar, Cirilo, Eduardo y Vicente, les agradezco su apoyo, sus consejos y tanto amor…

A mis abuelitos, que ya no están aquí físicamente, pero sé que en donde estén me envían sus bendiciones.

A mis primos Nancy, Juan Pablo, Alvaro y todos quienes creyeron en mí y me ayudaron a salir adelante.

A toda mi familia, porque a pesar de la distancia siempre están conmigo…

INDICE GENERAL

	Página
Título, Autor, Tutor	ii
Constancia de aceptación del tutor	iii
Aprobación del proyecto por el jurado	iv
Agradecimientos	v
Dedicatoria	vi
Índice General	vii
Índice de Tablas	ix
Índice de Figuras	x
Resumen	xi
Summary	xii
Introducción	1
Marco Teórico	3
Objetivos: General y Específicos	9
Metodología	10
Diseño de la investigación	10
Microorganismos	10
Preparación de las muestras	10
Determinación del inóculo por densitometría	10
Contaje de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL)	11

Estudio de la susceptibilidad *in vitro* a los antifúngicos por concentración mínima inhibitoria 12

A) Preparación de los antifúngicos 12

B) Preparación de las microplacas 13

C) Lectura de los resultados 13

D) Interpretación de los resultados 14

E) Control de calidad 14

Análisis de los datos 15

Resultados 18

Discusión de resultados 23

Conclusiones 31

Recomendaciones 32

Referencias bibliográficas 33

INDICE DE TABLAS

		Páginas
Tabla 1	Identificación y valores de CMI obtenidos por el método M38-A2 del CLSI para los 30 aislamientos del Complejo *Fusarium solani*	20
Tabla 2	Susceptibilidad *in vitro* del Complejo *Fusarium solani* a 5 antifúngicos por el método M38-A2 del CLSI (n=30)	21
Tabla 3	Comparación entre los rangos de concentración mínima inhibitoria y medidas geométricas obtenidos en este estudio para el complejo *Fusarium solani* versus otros estudios.	30

INDICE DE FIGURAS

Páginas

Figura 1 Esquema de procedimiento experimental para la preparación de las cepas, preparación del inoculo y contaje de colonias 16

Figura 2 Esquema del procedimiento experimental para la preparación de los antifúngicos, llenado e inoculación de las microplacas 17

Figura 3 Distribución de las CMI de voriconazol (A) y anfotericina b (B) según el número de aislamientos. PS: población salvaje; punto de corte epidemiológico. 22

República Bolivariana de Venezuela
Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"
Gerencia de Docencia e Investigación
Coordinación de Postgrado
Especialización en Micología Médica

SUSCEPTIBILIDAD *IN VITRO* DEL COMPLEJO *Fusarium solani* FRENTE A CINCO ANTIFUNGICOS POR CONCENTRACIÓN MINIMA INHIBITORIA SEGÚN EL METODO M38-A2 DEL CLSI

Autora: Andreina Duarte. 2012

RESUMEN

El complejo *Fusarium solani* (CFS) se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, causando un amplio espectro de infecciones en los humanos, desde superficiales, como la queratitis, hasta infecciones fúngicas invasoras, caracterizándose por presentar una escasa actividad frente a los antifúngicos. El objetivo de esta investigación fue determinar la susceptibilidad *in vitro* del CFS frente a 5 antifúngicos según el método M38-A2 del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI). Se utilizaron 30 aislamientos clínicos de úlceras corneales provenientes de la colección de cultivos del Departamento de Micología del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" y del Hospital Universitario de Caracas. Se siguió el protocolo descrito en el documento M38-A2, que consistió en determinar las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) por microdilución en caldo para anfotericina b (AB), itraconazol (IZ), posaconazol (POS), voriconazol (VZ) y fluconazol (FZ). En general, todas las drogas presentaron CMI elevadas, siendo VZ y AB los antifúngicos que mostraron mejor actividad, mientras que para IZ, POS y FZ la actividad fue nula. Los resultados de este estudio aportaron información importante sobre el comportamiento del CFS ante los antifúngicos de uso común en la práctica clínica por primera vez en Venezuela. Es imprescindible conocer la actividad de estas drogas para poder tomar decisiones y orientar una conducta terapéutica adecuada.

Palabras claves: Complejo *Fusarium solani*, pruebas de susceptibilidad *in vitro*, antifúngicos, documento M38-A2.

República Bolivariana de Venezuela
Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"
Gerencia de Docencia e Investigación
Coordinación de Postgrado
Especialización en Micología Médica

IN VITRO SUSCEPTIBILITY OF *Fusarium solani* SPECIES COMPLEX AGAINST FIVE ANTIFUNGAL AGENTS BY MINIMUN INHIBITORY CONCENTRATION ACCORDING TO THE CLSI M38-A2 METHOD

Author: Andreina Duarte. 2012

SUMMARY

The *Fusarium solani* species complex (FSSC) is widely distributed in nature, causing a wide spectrum of human infections, from superficial as keratitis to invasive fungal infections, characterized by having low antifungal activity. The objective of this research was to determine the *in vitro* susceptibility of FSSC to 5 antifungal agents, according to the M38-A2 method of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). It was used 30 clinical isolates of corneal ulcers, coming from the culture collection of the Departamento de Micología del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel and the Hospital Universitario de Caracas. It was followed the protocol described in the document M38-A2 to determine the minimum inhibitory concentrations (MIC) by broth microdilution for amphotericin B (AB), itraconazole (IZ), posaconazole (POS), voriconazole (VZ), and fluconazole (FZ). In general, all the drugs showed elevated MICs, being VZ and AB the drugs presenting the best antifungal activity, while IZ, POS and FZ showed no activity. The results of this study provided important information about the behavior of the FSSC against antifungal agents commonly used in clinical practice for the first time in Venezuela. It is essential to know the activity of these drugs in order to make decisions and to orient an appropriate therapeutic behaviour.

Keywords: *Fusarium solani* species complex, *in vitro* susceptibility testing, antifungal agents, M38-A2 document.

INTRODUCCIÓN

El género *Fusarium* se encuentra ampliamente distribuido en el suelo, plantas y diferentes sustratos orgánicos. Contiene actualmente más de 50 especies identificadas, de las cuales los patógenos más comunes son las especies del Complejo *Fusarium solani* (CFS) y *F. oxysporum*, aunque otras especies del género también han sido reconocidas como patógenas, destacándose *F. moniliforme* y *F. verticillioides* [1-4].

La presentación clínica de las infecciones causadas por *Fusarium* spp. depende, en gran parte, del estado inmune del hospedero y de la vía de entrada del hongo. Las infecciones superficiales como queratitis y onicomicosis se observan generalmente en individuos inmunocompetentes, mientras que las infecciones invasoras se presentan en pacientes inmunocomprometidos. Los pacientes que desarrollan queratítis o úlceras corneales, así como infecciones invasoras, tienen mal pronóstico, debido a su difícil tratamiento [1,4-6].

La incidencia de las infecciones causadas por especies de *Fusarium* ha aumentado durante la última década y actualmente este género representa la segunda causa más frecuente de infecciones por hongos filamentosos, asociada con elevadas tasas de morbilidad y mortalidad; esta última puede exceder el 70% [1,5].

El manejo terapéutico de las fusariosis permanece aún incierto y constituye un problema significativo, independientemente del tipo de paciente que sufra

la infección. Por otra parte, las opciones terapéuticas disponibles son limitadas, particularmente para los hongos patógenos resistentes a los antifúngicos. Se ha documentado que estas infecciones se caracterizan por su resistencia a prácticamente todas las drogas antifúngicas disponibles en el mercado actualmente, y se considera que el CFS es el más resistente [1,3,7].

Las pruebas de susceptibilidad *in vitro* a los antifúngicos constituyen una guía muy valiosa para los médicos en el tratamiento de las infecciones fúngicas [8]. Si bien estas pruebas generalmente no predicen la respuesta terapéutica individual del paciente, si pueden ayudar a establecer una asociación entre Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) elevadas y pobre respuesta al tratamiento antifúngico [1,7]. En Venezuela no se han realizado investigaciones ni se conoce el comportamiento *in vitro* del CFS frente a los antifúngicos.

Debido a lo expuesto anteriormente, se planteó una investigación para determinar la susceptibilidad *in vitro* de aislamientos clínicos del CFS frente a 5 antifúngicos que representan las alternativas terapéuticas más comúnmente utilizadas en la práctica clínica, según el método M38-A2 del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI), con la finalidad de determinar las CMI y establecer rangos de susceptibilidad para este complejo. Los resultados de este estudio aportarán información importante sobre el perfil de susceptibilidad del CFS y orientarán la instauración oportuna y efectiva de una terapia adecuada.

MARCO TEORICO

El género *Fusarium* está representado por un conjunto de hongos filamentosos hialinos que habitan áreas tropicales e intertropicales, y están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Son capaces de producir enfermedades en las plantas que ocasionan grandes pérdidas económicas en la agricultura, así como micotoxicosis, alergias, infecciones ocasionales en animales e infecciones superficiales y diseminadas en el humano, estás últimas usualmente fatales [2,3,5]. La distribución generalizada de las especies de *Fusarium* se atribuye a su habilidad de crecer en un amplio rango de sustratos (suelo, plantas aéreas y subterráneas, materia orgánica y agua) y a su eficiente mecanismo de dispersión [2].

Se han identificado más de 50 especies del género *Fusarium*, pero sólo 12 han sido descritas como patógenas para el humano: *F. solani* es el más frecuente (más del 50% de los casos), seguido de *F. oxysporum* (aproximadamente 20%) y *F. verticillioides* (20%) [2,4].

La identificación a nivel de especie para el género *Fusarium* tradicionalmente se ha basado en el estudio de las características morfológicas, siendo esta tarea muy laboriosa y reservada a micólogos bien entrenados en taxonomía [1]. Recientemente, diversos autores han utilizado criterios moleculares para dilucidar la taxonomía de *Fusarium*, basados en la secuenciación de diversos genes, lo que les ha permitido demostrar que las clásicas especies patógenas del género, como son *F. verticillioides* (*F. moniliforme*), *F.*

oxysporum y *F. solani* constituyen en realidad complejos de especies. Zhang y col. [9], utilizando técnicas de biología molecular basadas en un enfoque del análisis de las secuencias multilocus, demostró que bajo el nombre genérico de *F. solani* existen al menos 45 especies filogenéticamente distintas, muchas de las cuales no han sido descritas formalmente; sin embargo, otros investigadores han documentado que son 21 las especies filogenéticas de interés clínico [10]. Debido a esta variabilidad, actualmente este conjunto de especies ha sido reconocido como Complejo *Fusarium solani* (CFS).

La expresión clínica de las infecciones causadas por *Fusarium* spp. depende en gran medida del estado inmune del hospedero y de la puerta de entrada, constituida principalmente por las vías respiratorias, seguido de traumatismos en la piel y las membranas mucosas [2,4]. En los individuos inmunocompetentes el trauma es el factor predisponente. Las queratitis, debidas a abrasiones, heridas o presencia de cuerpos extraños en los usuarios de lentes de contacto, así como las onicomicosis, son las infecciones más frecuentes; en las primeras el principal agente causal es el CFS, mientras que *F. oxysporum* representa la mayoría de los casos en la segunda patología [2,11,12]. Las infecciones menos frecuentes son las heridas, sinusitis, neumonía, tromboflebitis, fungemia, endoftalmítis, artritis séptica, osteomielitis y peritonitis, descritas en pacientes que reciben diálisis peritoneal ambulatoria. En pacientes inmunocomprometidos, existe un alto riesgo de fusariosis en aquellos con neutropenia profunda y prolongada, así

como inmunodeficiencia severa de células T, con expresión diseminada de la infección y una mortalidad aproximada del 75% [2]. De acuerdo con Nucci y col. [13], se han documentado en la literatura casi 300 casos de fusariosis entre los años 1970 al 2005.

Según algunos autores, la incidencia de las infecciones en humanos causadas por *Fusarium* spp. pareciera ser estable o mostrar un ligero aumento, particularmente en pacientes con leucemia mieloide aguda [2,5,14-16]. Mientras que otros autores afirman que estas infecciones han aumentado durante la última década y que, actualmente, este género representa la segunda causa más frecuente de infecciones por hongos filamentosos [1,13]. En Venezuela los reportes de casos sobre infecciones causadas por hongos filamentosos, y particularmente por el género *Fusarium*, son limitados, independientemente del tipo de pacientes [17-20].

Datos recopilados recientemente en un estudio de frecuencia de hongos filamentosos aislados de muestras clínicas relevantes de pacientes hospitalizados en el período 2007 al 2009 en Venezuela [21], informó que *Aspergillus* spp. fue el género más frecuentemente aislado (53,3%), seguido por *Fusarium* spp. (20%), siendo el CFS el más representativo del género.

El manejo terapéutico de las infecciones por *Fusarium* spp. es incierto y constituye un problema, debido a la ausencia de estudios clínicos que comparen la actividad de los diferentes antifúngicos disponibles en el mercado frente a las especies de este género. Por lo tanto, las decisiones

terapéuticas frecuentemente se toman basadas en el análisis de estudios comparativos de susceptibilidad *in vitro* a estas drogas [1,22].

Se ha documentado que las especies del género *Fusarium* son resistentes *in vitro* a la mayoría de los antifúngicos conocidos y tienen diferentes patrones de susceptibilidad; entre ellas, se considera que el CFS es el más resistente [1,4,23-25].

Las pruebas de susceptibilidad *in vitro* a los antifúngicos constituyen una guía muy valiosa para los médicos en el tratamiento de las infecciones fúngicas. De hecho, el desarrollo de nuevas drogas debería acompañarse de la realización de estas pruebas. Varios métodos están disponibles para la determinación de la susceptibilidad *in vitro* a los antifúngicos. Entre ellos se encuentra el M38-A2, desarrollado por el CLSI para la evaluación de estas drogas frente a hongos filamentosos. Actualmente, es uno de los protocolos estandarizados aceptados a nivel mundial, que recomienda la determinación de la CMI por microdilución en caldo para conocer la susceptibilidad o actividad de los antifúngicos [8,26].

La susceptibilidad o resistencia de los antifúngicos, determinada por los métodos de susceptibilidad *in vitro*, generalmente no predicen la respuesta terapéutica individual del paciente frente a las infecciones causadas por especies del género *Fusarium*, pero está bien documentado que existe algún tipo de asociación entre CMI elevadas y una pobre respuesta terapéutica. Por lo tanto, conocer el perfil de susceptibilidad o actividad de este género es una herramienta valiosa para la escogencia de la mejor alternativa

terapéutica. Además, ya que los valores de susceptibilidad pueden ser específicos, la identificación de la especie es importante para la epidemiología y es de gran ayuda para la elección de un tratamiento antifúngico adecuado [1,4].

El documento M38-A2 del CLSI no ha establecido puntos de corte para la lectura de las CMI en hongos filamentosos. Debido a esto, su utilización suministrará información únicamente sobre los rangos de concentración que poseen estos hongos frente a los antifúngicos probados. Sin embargo, estudios multicéntricos de susceptibilidad, utilizando la metodología descrita en este documento, han propuesto puntos de corte microbiológicos, que se han asignado sólo para propósitos analíticos [26,27]. Por otra parte, la obtención de las CMI puede ayudar en el análisis de algunos parámetros importantes como definir la presencia de poblaciones salvajes, establecer puntos de corte epidemiológicos y determinar la resistencia cruzada entre las drogas antifúngicas [28,29].

Entre los antifúngicos más usados para el tratamiento de las infecciones por *Fusarium* spp. figuran anfotericina B, fluconazol, voriconazol, itraconazol y posaconazol. Otras alternativas son natamicina, 5-fluocitosina, clotrimazol y miconazol [2,12]. En las queratitis y/o endoftalmitis en individuos inmunocompetentes se usa como primera línea de terapia la anfotericina B tópica; si las lesiones son más profundas se adiciona terapia sistémica con itraconazol o fluconazol oral. También ha sido utilizado con éxito voriconazol tópico y sistémico [2,12,22]. En pacientes inmunosuprimidos con infecciones

diseminadas se usa tratamiento sistémico sólo o en combinación con otras medidas terapéuticas tales como cirugía y uso de factores estimuladores de colonias [6]. Actualmente, y de acuerdo con Nucci y col. [2], se recomienda el uso de anfotericina B combinada o no con voriconazol, así como el tratamiento de la condición de base del paciente en el caso de las infecciones invasoras por *Fusarium* spp.

En Venezuela no se han realizado investigaciones para conocer la susceptibilidad *in vitro* de especies del género *Fusarium*, en particular del CFS, por lo tanto, se desconoce el comportamiento de estas especies frente a los antifúngicos.

Debido a lo expuesto anteriormente, el objetivo de esta investigación fue determinar la susceptibilidad *in vitro* de aislamientos clínicos del CFS frente a 5 antifúngicos, que representan las alternativas terapéuticas más comúnmente utilizadas en la práctica clínica, según el método M38-A2 del CLSI, con la finalidad de determinar las CMI y establecer rangos de susceptibilidad para este complejo. Los resultados de este estudio aportarán información importante sobre el perfil de susceptibilidad del CFS y orientarán en la instauración oportuna y efectiva de una terapia adecuada. Este estudio representa un esfuerzo pionero en Venezuela en el desarrollo de una línea de investigación dedicada al estudio de la susceptibilidad antifúngica de hongos filamentosos de importancia clínica.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la susceptibilidad *in vitro* del complejo *Fusarium solani* frente a 5 antifúngicos por concentración mínima inhibitoria según el método M38-A2 del CLSI.

Objetivos específicos

1. Determinar la susceptibilidad *in vitro* del complejo *Fusarium solani* por concentración mínima inhibitoria frente a anfotericina B, fluconazol, itraconazol, posaconazol y voriconazol.
2. Establecer rangos de susceptibilidad o actividad para los distintos antifúngicos frente al complejo *Fusarium solani*.
3. Comparar descriptivamente los resultados de los diferentes antifungicos.

METODOLOGÍA

Diseño de la investigación. Se diseñó un estudio prospectivo, experimental y descriptivo para determinar la susceptibilidad *in vitro* del complejo *Fusarium solani* frente a cinco antifúngicos.

Microorganismos. Se utilizaron 30 aislamientos clínicos del complejo *Fusarium solani* provenientes de úlceras corneales: 3 del Servicio de Micología del Hospital Universitario de Caracas y 27 suministrados por la Micoteca del Departamento de Micología del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, los cuales estaban conservados desde 1978 bajo los métodos de preservación de agua por *Castellani* y bajo capa de aceite mineral [30].

Preparación de las muestras. La recuperación de los aislamientos suministrados por la Micoteca se realizó cultivándolos por 7 días a 28 ºC en agar papa dextrosa (PDA) y agar extracto de malta, verificándose viabilidad y pureza. Los aislamientos provenientes del Hospital Universitario de Caracas se mantuvieron mediante cultivo en PDA a 28 ºC (Figura 1).

Determinación del inóculo por densitometría. Se procedió a la preparación del inóculo siguiendo la metodología descrita por el documento M38-A2 del CLSI [26] con modificaciones al momento de la determinación

del mismo, el cual se realizo de acuerdo al trabajo validado por Lage y colaboradores, quienes compararon el ajuste del inoculo por espectrofotometria versus densitometria, siendo este ultimo concordante con la preparación del inoculo establecida por el documento M38-A2 del CLSI [31,32]. Se realizó el cultivo por duplicado de los 30 aislamientos del CFS en PDA, incubándolos 48 h a 35 °C y luego a 28 ºC hasta completar 7 días. Se agregaron 3 mL de solución salina estéril al 0,85% a cada tubo y con un asa de platino se rasparon las porciones superficiales de las colonias. Los contenidos se transfirieron a tubos de ensayo estériles y se dejaron sedimentar de 3-5 min. Luego se tomaron los sobrenadantes, se colocaron en nuevos tubos estériles, se agitaron en vortex por 15 seg y se procedió al ajuste de las suspensiones de los inóculos en un densitómetro (Densimat™ bioMérieux) a 550 nm entre 0,5-0,7 unidades McFarland. La presencia de hifas y conidias fue verificada mediante observación microscópica, realizando un examen directo a las suspensiones ajustadas en el densitómetro. No se procedió al filtrado de las mismas ya que la presencia de hifas no superó el 5% [25,30-32] (Figura 1). Posteriormente se realizo una dilucion 1/50 con el medio de cultico RPMI 1640 más glucosa al 2% para obtener una suspensión se trabajo correspondiente a 0,4-5 $x10^4$ Unidades Formadoras de Colonias por mililitros (UFC/mL)

Contaje de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL). Para verificar las conidias viables se realizaron diluciones 1:10 de las

suspensiones de trabajo de los inoculos por duplicado, se sembraron 10 µL por agotamiento en placas de agar Sabouraud y se incubaron a 28 ºC por 72 horas. Luego se realizaron los contajes de las UFC/mL, los cuales debían oscilar entre 0,4-5 $x10^4$ UFC/mL según la metodología de referencia [26] (Figura 1).

Estudio de la susceptibilidad *in vitro* a los antifúngicos por concentración mínima inhibitoria. Se siguió la metodología descrita por el documento M38-A2 del CLSI, pero utilizando el medio RPMI 1640 más glucosa al 2%, recomendado por el documento EUCAST E.Def 9.1, para asegurar el crecimiento adecuado de los hongos filamentosos en las pruebas de susceptibilidad [26,33].

A) Preparación de los antifúngicos. Se prepararon soluciones madre de AB, IZ, POS y VZ a una concentración de 1.600 µg/mL y de FZ a 12.800 µg/mL. Para AB, IZ y VZ se utilizó como solvente dimetil sulfóxido (DMSO), mientras que para FZ y POS el solvente utilizado fue agua destilada estéril (ADE). Posteriormente se prepararon soluciones de trabajo en tubos conteniendo 1 mL de DMSO o ADE según el antifúngico a utilizar. Seguidamente, se realizaron diluciones dobles seriadas de cada antifúngico en tubos (del 1 al 10) y el contenido de cada tubo se diluyó a su vez 1:50 con medio de cultivo RPMI 1640 más glucosa al 2% [RPMI 1640 con glutamina sin bicarbonato de sodio y glucosa al 2%, tamponado con ácido morfolino

propano sulfónico (MOPS) a una concentración de 0,164 M y ajustado a pH entre 6,9-7,1] (Figura 2).

B) Preparación de las microplacas. Las diluciones 1:50 de los antifúngicos se dispensaron en microplacas de 96 pozos fondo U en orden creciente hasta la columna 10, a razón de 100 µL por pocillo con ayuda de una pipeta multicanal, obteniéndose rangos de 0,03-16 µg/mL para AB, IZ, POS y VZ y de 0,25-128 µg/mL para FZ. Las placas se congelaron a -70 °C para su conservación hasta un máximo de dos meses. Al momento de su uso se descongelaron y se dispensaron 100 µL por pocillo del inóculo previamente preparado y diluido 1:50 con RPMI 1640 más 2% de glucosa. En la columna 11 se dispensaron 100 µL por pocillo de RPMI 1640 más glucosa al 2% y 100 µL del inóculo diluido 1:50 (control de crecimiento), mientras que en la columna 12 se dispensaron 200 µL de RPMI 1640 más glucosa al 2% (control de esterilidad). La distribución de las diferentes diluciones seriadas de los antifúngicos en las placas permitió realizar las pruebas de susceptibilidad a 7 aislamientos (uno por fila), reservando la fila 8 para la cepa de control de calidad. Las microplacas se incubaron a 35 °C durante 48 horas. Todos los ensayos se realizaron por duplicado (Figura 2).

C) Lectura de los resultados. Las placas se leyeron a las 48 horas de forma visual con ayuda de un espejo invertido. Para AB, VZ, POS, e IZ la CMI correspondió a la menor concentración del antifúngico capaz de inhibir el 100% de crecimiento del hongo. Para FZ la CMI se consideró como la menor

concentración capaz de inhibir el 50% del crecimiento del hongo, comparándolo con el control de crecimiento.

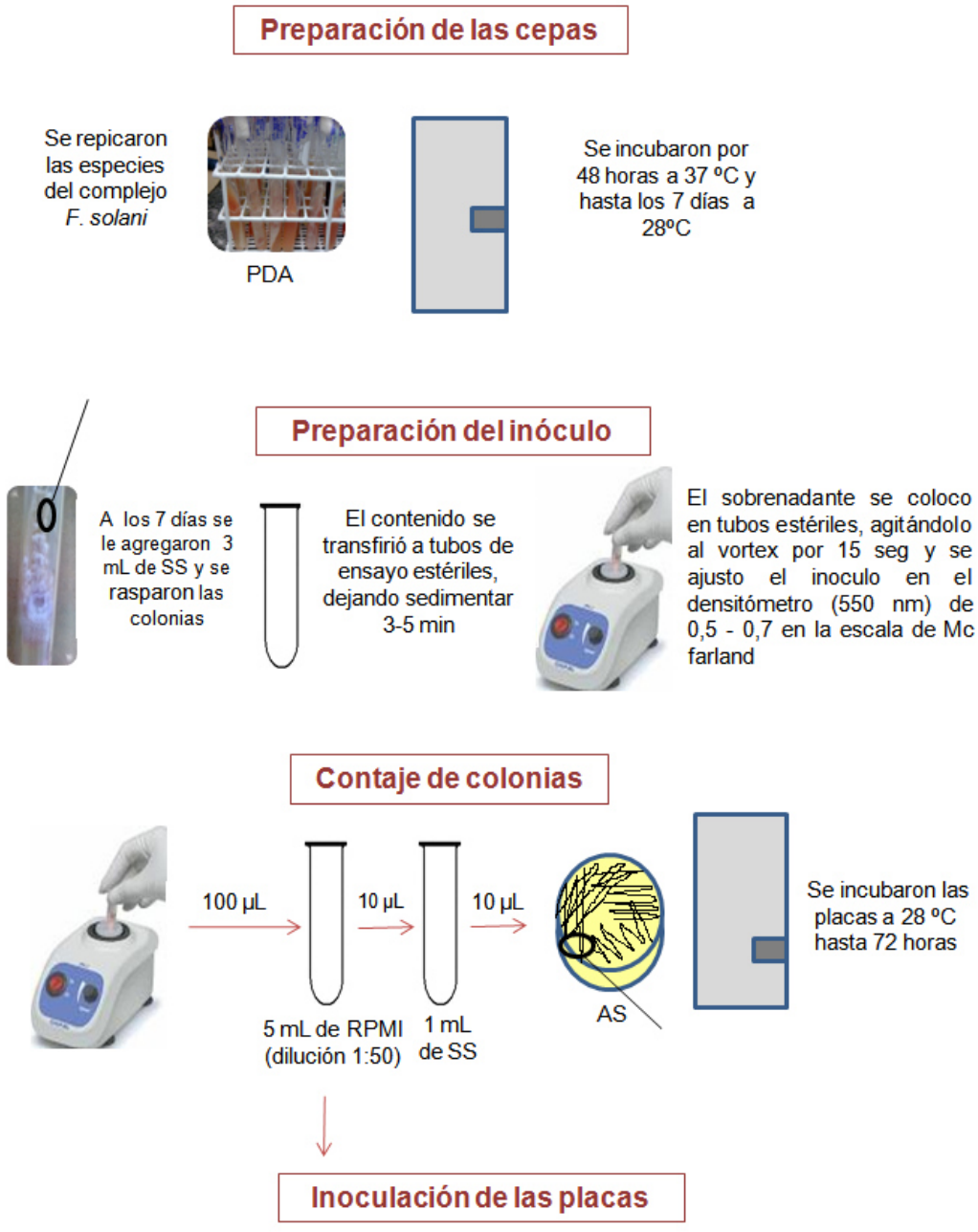
D) Interpretación de los resultados. Debido a que no se han establecido puntos de corte para el complejo *Fusarium solani* según el método M38-A2 del CLSI, los resultados fueron interpretados en términos de actividad del hongo frente al antifúngico probado. Sin embargo, existen puntos de corte microbiológicos propuestos por estudios multicéntricos, asignados sólo para propósitos analíticos. Para AB, IZ, VZ y POS los puntos de corte propuestos (en µg/mL) son: Sensible: $\leq$1; Intermedio: 2; Resistente: $\geq$4. Para FZ se considera que prácticamente todos los hongos filamentosos son resistentes a este antifúngico, con excepción de algunos hongos dimórficos y dermatofitos; las CMI deben encontrarse por encima de 64 µg/mL [26,27]. Para los fines de este trabajo, ambas consideraciones fueron tomadas en cuenta para el análisis de los resultados.

E) Control de calidad. Se utilizaron las cepas *Aspergillus flavus* ATCC®204304, *Candida krusei* ATCC®6258 y *Candida parapsilosis* ATCC® 22019, recomendadas en el documento M38-A2 del CLSI [26], las cuales fueron tratadas de igual forma que los aislamientos empleados en este estudio. Para la preparación de los inóculos de *Candida krusei* ATCC®6258 y *Candida parapsilosis* ATCC® 22019 se siguieron las recomendaciones del documento M27-A3 del CLSI [34]: se tomaron 5 colonias a partir de cultivos de 24 h de crecimiento incubados a 28 ºC y se prepararon suspensiones de estas levaduras en 5 mL de solución salina estéril al 0,85%; posteriormente

se ajustaron en el densitómetro a 0,5 unidades McFarland. Se realizaron suspensiones de trabajo diluyendo el inóculo 1:100 con solución salina estéril al 0,85% y posteriormente se realizaron diluciones 1:20 con RPMI 1640 más glucosa al 2%, para ser utilizadas en la inoculación de las placas.

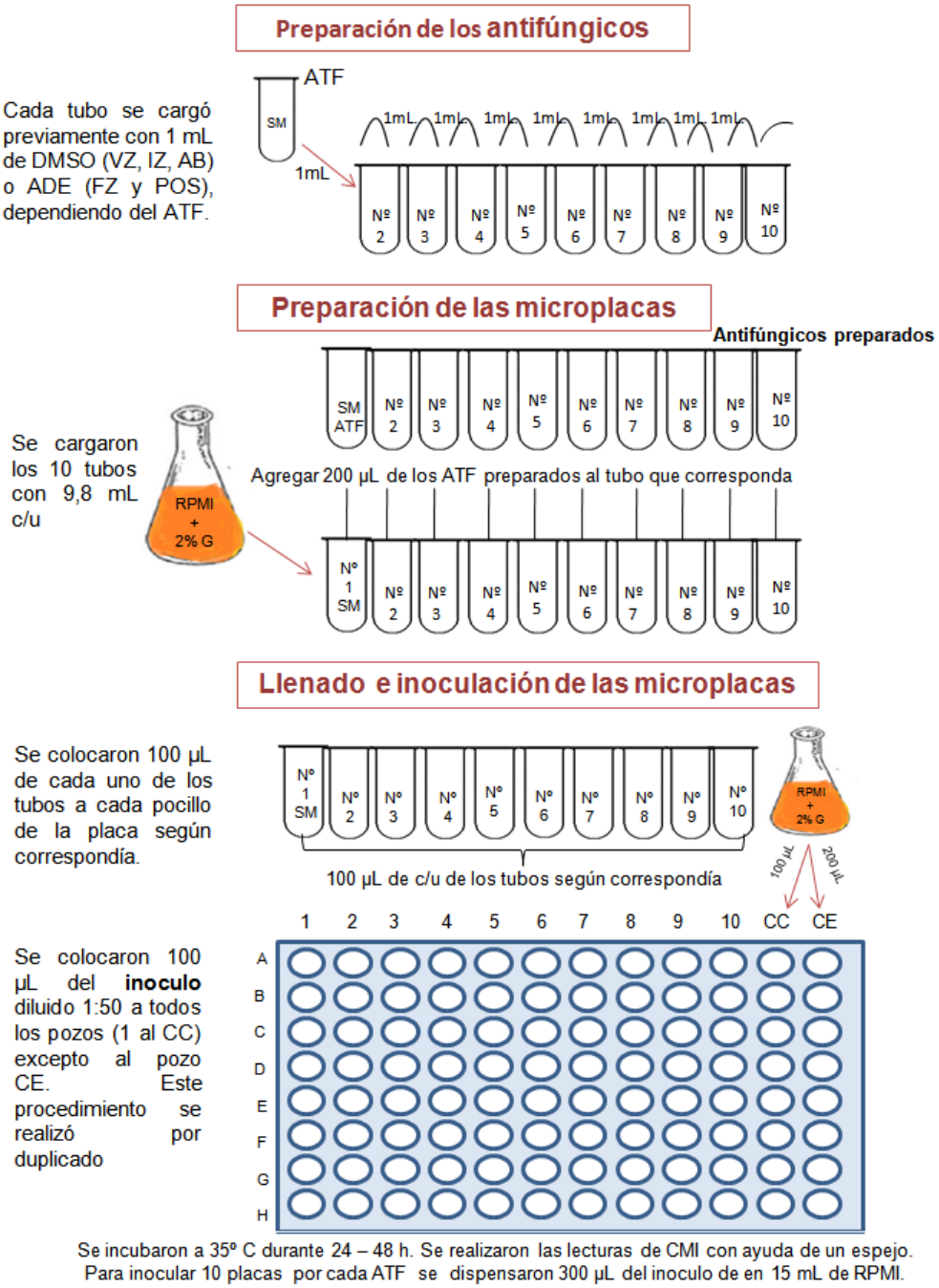
Análisis de los datos. Se realizo una base de datos en Excel en la que se incorporaron los datos obtenidos para su posterior análisis mediante porcentajes y medidas de tendencia central: media geométrica (MG), desviación estándar (DS), moda (M), y rangos de concentración para cada antifúngico. También se realizaron histogramas para observar la distribución de las CMI de cada antifúngico. Para el análisis de la susceptibilidad del CFS a los antifúngicos se calcularon el percentil 50 (CMI_{50}) y el percentil 90 (CMI_{90}), que representan los valores que inhiben al 50 y 90% de los aislamientos, respectivamente. Para determinar la población salvaje y los puntos de corte epidemiológicos se realizó una inspección visual de los histogramas, observando la distribución de las CMI de cada antifúngico. El punto de corte epidemiológico es el valor de CMI obtenido después de tomar en consideración la moda $\pm$ 1 dilución del antifúngico, verificando la reproducibilidad de las CMI; generalmente este valor corresponde a la CMI que define el límite superior de una población salvaje. La CMI de una población salvaje se encuentra a $\pm$ 2 diluciones alrededor de la moda y se categoriza aplicando los puntos de corte epidemiológicos [28,29].

Figura 1. Esquema de procedimiento experimental para la preparación de las cepas, preparación del inoculo y contaje de colonias.



PDA: Agar papa dextrosa; SS: Solución salina; AS: Agar sabouraud.

Figura 2. Esquema del procedimiento experimental para la preparación de los antifúngicos, llenado e inoculación de las microplacas.



ATF: Antifúngico; DMSO: Dimetil Sulfoxido; ADE: Agua Destilada Esteril; VZ: Voriconazol; IZ: Itraconazol, AB: Anfotericina B; FZ: Fluconazol; POS: Posaconazol; CC: Control de Crecimiento, CE: Control de Esterilidad.

RESULTADOS

Se evalúo la susceptibilidad *in vitro* por el método M38-A2 del CLSI de cinco drogas antifúngicas frente a 30 aislamientos del CFS, provenientes de úlceras corneales, recopilados entre los años 1978 al 2012. En general, todas las drogas probadas presentaron CMI elevadas, siendo VZ y AB los antifúngicos que mostraron mejor actividad con respecto a los demás antifúngicos usados. Sólo 3 aislamientos (10,0%) exhibieron CMI de 2 µg/mL para AB, mientras que 4 (13,3%) la exhibieron para VZ. IZ, POS y FZ mostraron una escasa o nula actividad (Tabla 1).

Los resultados correspondientes a los cálculos de MG, DS, M, rangos de CMI, CMI_{50}, CMI_{90}, distribución de las CMI por antifúngico y porcentajes de sensibilidad y resistencia, según los puntos de corte microbiológicos se muestran en la tabla 2. AB, VZ y POS presentaron rangos de CMI similares, pero la distribución de las CMI de POS fue muy diferente, ya que sólo un aislamiento mostro una CMI de 1 µg/mL y 29 exhibieron una CMI de 16 µg/mL. No se calcularon rangos de concentración para IZ y FZ, ya que los 30 aislamientos del CFS mostraron CMI $\geq$ 16 y 128 µg/mL, respectivamente.

Los valores de CMI de las MG de AB y VZ fueron semejantes, en cambio, sus valores para la M se diferenciaron en una dilución (8 y 4 µg/mL, respectivamente). AB agrupó el 43,3% de los aislamientos alrededor de su M y VZ agrupó el 33,3%. Tomando en cuenta los puntos de corte microbiológicos, todos los antifúngicos probados presentaron elevados

porcentajes de resistencia El antifúngico con el menor porcentaje de resistencia fue VZ (83,3%) seguido de AB (90%).

En la figura 3 se muestran los histogramas correspondientes a las distribuciones de las CMI de VZ y AB. No se realizaron los histogramas para IZ, POS y FZ debido a que prácticamente los 30 aislamientos exhibieron CMI similares (16, 16 y 128 µg/mL, respectivamente).

La CMI de la M ± 1 dilución abarcó el 90% de los aislamientos para AB y el 76% para VZ Los puntos de corte epidemiológicos para ambos antifúngicos correspondieron a una CMI de 8 µg/mL, agrupando el 90% de los aislamientos para AB y el 76,7% para VZ Los rangos para la población salvaje se ubicaron entre 2-8 µg/mL para ambos antifúngicos, con distribuciones de CMI muy similares entre sí.

Todas las cepas utilizadas para el control de calidad de las pruebas de susceptibilidad se mantuvieron dentro de los valores límites establecidos por el documento M38-A2.

El contaje de la UFC/mL fue muy variable entre los aislamientos del complejo, sin embargo los resultados permanecieron dentro del rango establecido por el documento de referencia: 0,4-5 x 10^4 UFC/mL.

Tabla 1. Identificación y valores de CMI obtenidos por el método M38-A2 del CLSI para los 30 aislamientos del Complejo *Fusarium solani*.

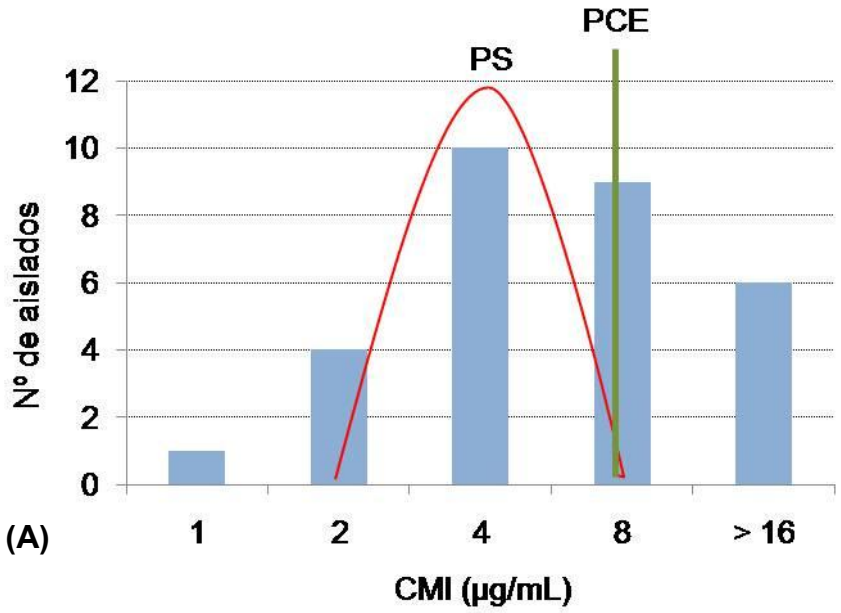
Aislamiento	Año de conservación	CMI (µg/mL)				
		AB	VZ	IZ	POS	FZ
F-412000-3	-	16	8	>16	>16	>128
F-412000-64	1979	4	8	>16	>16	>128
F-412000-67	1983	2	8	>16	>16	>128
F-412000-92	1978	8	8	>16	>16	>128
F-412000-93	1978	4	8	>16	>16	>128
F-412000-98	1990	4	4	>16	>16	>128
F-412000-99	1992	8	4	>16	>16	>128
F-412000-102	1983	4	2	>16	>16	>128
F-412000-103	-	4	1	>16	>16	>128
19164	1978	2	>16	>16	>16	>128
19429	1978	8	8	>16	>16	>128
20249	1978	16	8	>16	>16	>128
20357	1979	>16	>16	>16	>16	>128
20573	1979	2	4	>16	>16	>128
29449	1982	8	>16	>16	>16	>128
30294	1983	8	>16	>16	>16	>128
30782	1983	8	2	>16	>16	>128
30845	1984	4	4	>16	>16	>128
31120	1984	8	2	>16	>16	>128
32067	-	8	>16	>16	>16	>128
32383	-	4	4	>16	1	>128
32723	-	16	4	>16	>16	>128
34517	1988	4	4	>16	>16	>128
34522	1988	4	4	>16	>16	>128
35146	1988	8	>16	>16	>16	>128
37120	1992	8	4	>16	>16	>128
37121	1992	4	8	>16	>16	>128
93037	2012	8	>16	>16	>16	>128
868 HUC	2012	8	2	>16	>16	>128
819 HUC	2012	4	16	>16	>16	>128

CMI: concentración mínima inhibitoria; AB: anfotericina b; VZ: voriconazol; IZ: itraconazol; POS: posaconazol; FZ: fluconazol; HUC: Hospital Universitario de Caracas.

Tabla 2. Susceptibilidad *in vitro* del Complejo *Fusarium solani* a 5 antifúngicos por el método M38-A2 del CLSI (n=30).

Antifúngicos	Rangos*	MG*	M*	CMI_{50}*	CMI_{90}*	Número de aislamientos con CMI*								n (%)**		
						1	2	4	8	16	32	64	128	S	I	R
AB	2 - >16	5,8	8	8	8,8		3	11	13	3				-	3 (10)	27 (90)
VZ	1 - >16	5,7	4	6	16	1	4	10	9	6				1 (3,4)	4 (13,3)	25 (83,3)
IZ	> 16	16	16	16	16					30				-	-	30 (100)
POS	1 - >16	14,6	16	16	16	1				29				1 (3,3)	-	29 (96,7)
FZ	> 128	128	128	128	128								30	-	-	30 ¤ (100)

AB: anfotericina B; VZ: voriconazol; IZ: itraconazol; POS: posaconazol; FZ: fluconazoL; CMI: concentración mínima inhibitoria; *CMI en µg/mL; MG: media geométrica; M: moda; CMI_{50}: concentración que inhibe el 50% de los aislamientos; CMI_{90}: concentración que inhibe el 90% de los aislamientos; ** tomando en cuenta los puntos de corte microbiológicos de estudios multicéntricos [26,27]; S: sensible ($\leq$1 µg/mL); I: intermedio (2 µg/mL); R: resistente ($\geq$4 µg/mL); ¤ todas las CMI fueron superiores a 64 µg/mL [26,27].



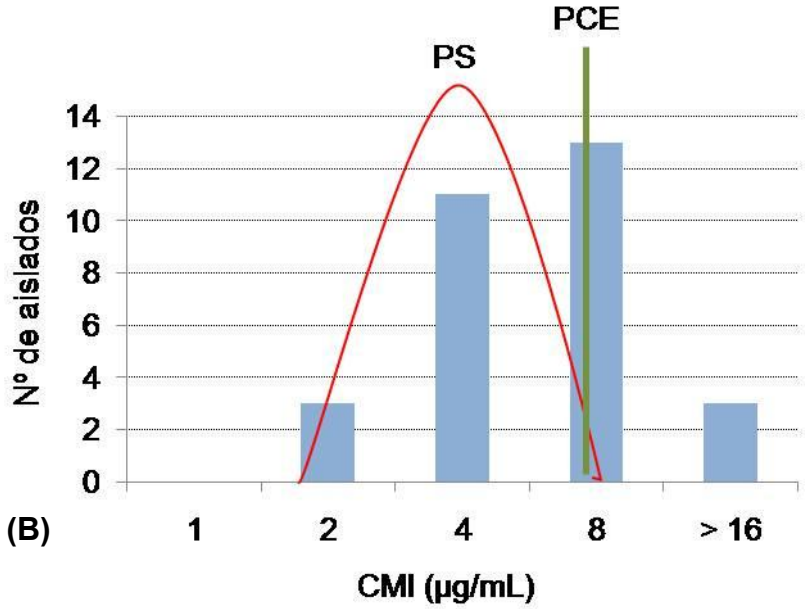


FIGURA 3. Distribución de las CIM de Voriconazol (A) y Anfotericina B (B) según el número de aislamientos. PS: población salvaje; PCE: punto de corte epidemiológico.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El CFS ha emergido en la última década como el segundo agente causal de infecciones oportunistas por hongos filamentosos [7,13]. Debido a la ausencia de estudios clínicos que comparen la eficacia de los diferentes antifúngicos en las infecciones causadas por este complejo, cobra importancia realizar pruebas de susceptibilidad *in vitro*, para conocer el comportamiento de estos hongos frente a las drogas y así proporcionar información útil como guía en la instauración de una terapia adecuada y oportuna [22].

Un elemento esencial para estudiar un número representativo de aislamientos de este género es su preservación adecuada en una colección de cultivos y así lo han demostrado gran cantidad de investigaciones a nivel mundial [1,3,4-6]. En este estudio todos los aislamientos procedían de muestras clínicas de úlceras corneales y 27 de ellos se mantuvieron preservados por duplicado en agua destilada estéril según Castellani y bajo capa de aceite mineral desde el año 1979. Estos métodos han demostrado que son capaces de preservar aislamientos fúngicos de forma estable por largos períodos de tiempo, asegurando sus características macro y microscópicas, así como su viabilidad y pureza [1,3,25,30].

De acuerdo con los resultados *in vitro* obtenidos en este estudio, VZ y AB fueron las drogas más activas frente al CFS. Resultados similares han sido reportados por otros investigadores, pero existen diferencias significativas en

cuanto a los rangos de CMI y MG (Tabla 3). Para Alastruey-Izquierdo y col. [1], AB fue la droga más activa para el CFS, seguido de VZ. En el trabajo de Azor y col. [3], aunque no se calcularon las MG, según los rangos de CMI obtenidos se puede inferir que la droga más activa también fue AB, seguida de VZ. Tortorano y col. [4] y Debourgogne y col. [6], reportaron resultados muy similares para los rangos y MG de AB y VZ, donde la primera se mostró como la droga más activa. Los resultados de este estudio son similares a los de Papithou y col. [24] y Córdoba y col. [35], con rangos y MG muy semejantes, siendo VZ la droga más activa, seguida de AB. Lewis y col. [23], sin embargo, obtuvieron resultados muy diferentes, ya que AB y VZ no presentaron actividad frente al CFS. Todos los investigadores citados anteriormente han reportado resultados semejantes para IZ, POS y FZ obteniendo escasa o nula actividad frente a este complejo [1,3,4,6,23,24,35].

Estos resultados evidenciaron la elevada variabilidad existente en el CFS. Zhang y col. [9], demostraron que existen al menos 45 especies filogenéticas dentro del mismo, mientras que otros investigadores [10] han reportado la existencia de 21 especies, pero hasta el presente no se ha documentado la existencia de variaciones en relación a la susceptibilidad antifúngica. De existir estas diferencias, sería muy útil su conocimiento para orientar un tratamiento efectivo, ya que, según la literatura revisada, las diferencias son independientes del tipo de muestra donde se aisló el hongo, pero pudiesen existir diferencias de tipo geográfico. En este estudio no se planteó como objetivo realizar el análisis molecular de este complejo, pero abre las puertas

para plantear un trabajo que investigue si existe o no variabilidad en la actividad de las drogas antifúngicas relacionada con las diferentes especies filogenéticas.

Debido a que el documento M38-A2 no ha establecido puntos de corte para la lectura e interpretación de las CMI para hongos filamentosos, los resultados de este estudio se compararon con los puntos de corte microbiológicos propuestos en estudios multicéntricos [26,27]. Hasta el presente no existe ninguna publicación que haya utilizado estos puntos para interpretar los resultados de sus investigaciones, por lo tanto, no es posible comparar los resultados de este estudio con otras investigaciones. Sin embargo, los elevados porcentajes de resistencia obtenidos para todos los antifúngicos son comparables a los resultados de actividad antifúngica discutidos anteriormente [1,3,4,6,23,24,35]. Los puntos de corte microbiológicos han sido calculados en base al estudio de susceptibilidad de cepas de referencia, por lo tanto, pueden utilizarse en la vigilancia e identificación de aislamientos que potencialmente puedan desarrollar resistencia [27].

El primer paso para la obtención de puntos de corte de referencia es conocer la distribución de las CMI de una población, establecer puntos de corte epidemiológicos y definir la población salvaje. Esto es muy importante ya que suministra información clara acerca de valor de CMI a partir del cual un microorganismo puede ser considerado sensible a una droga particular en términos microbiológicos. En la actualidad sólo se han determinado estos

puntos para *Aspergillus fumigatus*, ya que es el agente causal de la mayoría de las infecciones fúngicas invasoras por hongos filamentosos [29]. En este estudio, sólo pudieron calcularse puntos de corte epidemiológicos para VZ y AB, los cuales abarcaron el 76 y 90% de los aislamientos, respectivamente, correspondiendo a una CMI de 8 µg/mL. La importancia de establecer puntos de corte epidemiológicos radica en que estos puntos no dependen del origen de la muestra, del tiempo en que se realizó el muestreo ni de la procedencia geográfica y son un indicador sensible del desarrollo de resistencia en estudios de vigilancia epidemiológica [28,29]. Los rangos obtenidos para delimitar la población salvaje en VZ y AB (2-8 µg/mL para ambas drogas) son los que mejor describen la distribución de las CMI de estos antifúngicos frente al CFS. Entre esas CMI se agrupan el 90 y el 76,7% % de los aislamientos del complejo para AB y VZ, respectivamente. El punto de corte epidemiológico de ambos antifúngicos se corresponde con el límite superior del rango establecido para las poblaciones salvajes de estas drogas. Aún cuando el punto de corte microbiológico de VZ y AB es elevado, esto posiblemente no sea indicativo de una escasa actividad antifúngica. Al no existir estudios clínicos que comparen la eficacia de estas drogas versus los resultados de las pruebas de susceptibilidad, no se puede predecir con seguridad si existe relación entre CMI elevadas y fracaso terapéutico o viceversa. Sin embargo, no se deben desestimar los resultados de las pruebas de susceptibilidad, ya que constituye la única guía para orientar la conducta terapéutica [22].

Las dificultades para correlacionar los resultados de las pruebas de susceptibilidad in vitro con los resultados de los ensayos clínicos radican en varios factores: 1) el papel crítico que juega la reconstitución inmune en las infecciones por *Fusarium* spp.; 2) sesgo en la selección de pacientes para ensayos clínicos de terapia de rescate; 3) retrasos en el inicio del tratamiento antifúngico; 4) escaso número de pacientes que reciben tratamiento; 5) la identificación del agente causal no se realiza hasta especie en la mayoría de los reportes. Este último punto dificulta aún más la correlación de los datos, ya que se han observado diferentes patrones de susceptibilidad entre las especies de este género [4].

El tratamiento óptimo para las infecciones causadas por especies del género *Fusarium*, independientemente si es invasora o superficial y del tipo de paciente involucrado (inmunocompetente o inmunosuprimido), es incierto. Se ha reportado que este género, particularmente el CFS, es resistente a las equinocandinas, aunque la susceptibilidad a AB, VZ y POS puede ser variable [1-3,22,24]. Comúnmente se ha usado AB liposomal como terapia única o en combinación con azoles. Por otra parte, el uso de VOR como agente terapéutico en infecciones causadas por *Fusarium* spp. fue aprobado en el año 2002, pero, la experiencia clínica reportada hasta el momento es dispersa y limitada [5,36].

Para las queratitis y/o endoftalmitis causadas por *Fusarium* spp. se recomienda tratamiento tópico y la droga de elección es la natamicina o piramicina. Esta droga pertenece a la familia de los polienos, donde está

incluida la AB; no se ha realizado hasta el momento ninguna investigación utilizando este antifúngico en pruebas de susceptibilidad. Otro tratamiento recomendado es el uso tópico y sistémico de VZ, cuando este antifúngico presenta rangos de CMI entre 1 - > 8 µg/mL, aunque se requieren altas concentraciones de esta droga en el humor acuoso para asegurar su eficacia [2,37,38]. El rango para VZ reportado en este estudio es similar al de los trabajos citados anteriormente (1 - ≥ 16 µg/mL). La terapia de rescate con POS o la combinación de AB liposomal más VZ también ha sido usada con buena respuesta terapéutica [2,39]. No hay estudios disponibles que correlacionen resultados de pruebas de susceptibilidad con éxito o falla terapéutica para VZ y POS. En el caso de AB se ha reportado que CMI por encima de 2 µg/mL están asociadas a falla terapéutica. Para estos antifúngicos no se puede predecir con exactitud el éxito o falla del tratamiento basado sólo en los resultados de las pruebas de susceptibilidad por razones ampliamente explicadas en párrafos anteriores [1-3,22,24,26].

Otros antifúngicos empleados en el tratamiento de las queratitis son el IZ y FZ. El IZ se usa en forma tópica o sistémica, pero debido a reportes que han demostrado su pobre actividad *in vitro* frente a *Fusarium* spp., sólo se recomienda su uso en presentaciones no complicadas de esta infección; CMI mayores a 8 µg/mL están asociadas a fracaso terapéutico. Caso similar ocurre con FZ, que se usa en forma tópica y oral; tiene una excelente penetración a nivel intraocular, pero no es activo frente a hongos filamentosos. Se han reportado casos de falla terapéutica en el tratamiento

de queratitis por *Fusarium* spp. y usualmente la CMI obtenida en las pruebas de susceptibilidad es > 64 µg/mL [11,25,40-42].

Tabla 3. Comparación entre los rangos de concentración mínima inhibitoria y medias geométricas obtenidos en este estudio para el Complejo *Fusarium solani* versus otros estudios.

Referencias	Anfotericina B		Voriconazol		Itraconazol		Posaconazol		Fluconazol	
	R	MG	R	MG	R	MG	R	MG	R	MG
Alastruey-Izquierdo y col. [1]	0,5 - 8	1,33	4 - 16	14	16	16	16	16	ND	ND
Azor y col. [3]	1 - 8	NC	4 - 32	NC	32	NC	32	NC	128	NC
Tortorano y col. [5]	0,25 - 2	1,25	1 - ≥ 16	9,21	≥ 16	≥ 16	1 - ≥ 16	15,21	ND	ND
Debourgogne y col. [6]	0,125 - 2	1,2	1 - 16	4,6	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Lewis y col. [22]	16	NC	16	NC	≥ 32	NC	ND	ND	ND	ND
Papithou y col. [23]	2 - ≥16	14,8	1 - 8	5,8	ND	ND	4 - ≥ 16	25,3	> 64	128
Córdoba y col. [32]	1 - 16	NC	4 - 16	NC	≥ 16	NC	ND	ND	ND	ND
Este estudio	2 - ≥ 16	5,8	1 - ≥ 16	5,7	≥ 16	16	1 - ≥16	14,6	≥ 128	128

R y MG en µg/mL; R: rangos; MG: media geométrica; ND: no determinado; NC: no calculado.

CONCLUSIONES

1. Las drogas más activas *in vitro* frente al CFS fueron voriconazol y anfotericina B. Itraconazol, posaconazol y fluconazol exhibieron escasa o nula actividad frente al complejo.
2. Se establecieron rangos de actividad para cinco antifúngicos de uso común en la práctica médica frente al CFS: anfoterina B: 2 - >16 µg/mL; voriconazol 1 - >16 µg/mL; itraconazol: >16 µg/mL; posaconazol: 1 - >16 µg/mL; fluconazol: >128 µg/mL. Estos rangos y la variabilidad de resultados observados en este estudio fueron similares a los reportados en la literatura a nivel mundial.
3. La realización de las pruebas de susceptibilidad utilizando el método M38-A2 resulta muy laboriosa para ser aplicada en los laboratorios de rutina de microbiología, por lo que se recomienda su uso en laboratorios de referencia con fines de investigación y/o para estudios epidemiológicos.

RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar estudios de biología molecular para tipificar y genotipificar las especies del Complejo *Fusarium solani*, así como hacer análisis filogenéticos, con la finalidad de documentar si existe o no variabilidad en la actividad de las drogas antifúngicas relacionada con las diferentes especies filogenéticas.

Se recomienda evaluar la actividad del Complejo *Fusarium solani* frente a otros antifúngicos, como por ejemplo la terbinafina.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Monzón A, Mellado E, Rodríguez-Tudela JL. Antifungal susceptibility profile of clinical *Fusarium* spp. isolates identified by molecular methods. J Antimicrob Chem 2008; 61:805-9.
2. Nucci M, Anaissie E. *Fusarium* infections in immunocompromised patients. Clin Microbiol Rev 2007; 20:695-704.
3. Azor M, Gené J, Cano J, Guarro J. Universal *in vitro* antifungal resistance of genetic clades of the *Fusariun solani* species complex. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51:1500-3.
4. Tortorano AM, Prigitano A, Dho G, Esposto MC, Gianni C, Grancini A, Ossi C, Viviani MA. Species distribution and *in vitro* antifungal susceptibility patterns of 75 clinical isolates of *Fusarium* spp. from Northern Italy. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52:2683-5.
5. Lortholary O, Obenga G, Biswas P, Caillot D, Chachaty E, Bienvenu AL, et all. International retrospective analysis of 73 cases of invasive fusariosis treated with voriconazole. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54:4446-50.
6. Debourgogne A, de Hoog S, Lozniewski A, Machouart M. Amphotericin B and voriconazole susceptibility profiles for the *Fusarium solani* species complex: comparison between the E-test and CLSI M38-A2 microdilution methodology. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2012; 31:615-8.

7. Lass-Flörl C, Perkhofer S, Mayr A. *In vitro* susceptibility testing in fungi: a global perspective on a variety of methods. Mycoses 2009; 53:1-11
8. Kondori N, Svensson E, Mattsby-Baltzer I. *In vitro* susceptibility of filamentous fungi to itraconazole, voriconazole and posaconazole by Clinical and Laboratory Standards Institute reference method and E-test. Mycoses 2010; 54:318-22.
9. Zhang N, O´ Donnell K, Sutton DA, Nalim FA, Summerbell RC, Padhye AA, Geiser DM. Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment. J Clin Microbiol 2006; 44:2186-90.
10. Guarro J. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. Enferm Infecc Microbiol Clin 2012; 30:33-9.
11. He D, Hao J, Zhang B, Yang Y, Song W, Zhang Y, Yokoyama K, Wang L. Pathogenic spectrum of fungal keratitis and specific identification of *Fusarium solani*. Invest Ophthalmol Vis Sci 2001; 52:2804-8.
12. Thomas PA. Fungal infections of the cornea. Eye 2003; 17:852-62.
13. Nucci M, Anaissie E. Cutaneous infection by *Fusarium* species in healthy and immunocompromised hosts: implications for diagnosis and management. Clin Infect Dis 2002; 35:909-20.
14. Iyer SA, Tuli SS, Wagoner RC. Fungal keratitis: emerging trends and treatment outcomes. Eye Contact Lens 2006; 32: 267-71.

15. Pagano L, Caira M, Candoni A, Offidani M, Fianchi L, Martino B, et all. The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. Haematologica 2006; 91:1068-75.
16. Raad I, Tarrand J, Hanna H, Albitar M, Janssen E, Boktour M, et all. Epidemiology, molecular mycology, and environmental sources of *Fusarium* infection in patients with cancer. Infect Control Hosp Epidemiol 2002; 23:532-7.
17. Cohén C. Sepsis por *Fusarium* en un paciente con anemia aplásica: reporte de un caso con implicaciones terapéuticas. Dermatol Ven 2000; 38:8-10.
18. Cavallera E, Asbati ML. Onicomicosis por hongos filamentosos no dermatofitos. Dermatol Ven 2006; 44: 4-10.
19. Asbati ML, Díaz Y, Bell-Smythe A, Cavallera E. Onicomicosis por hongos no dermatofitos. Estudio retrospectivo en 4 años. Rev Soc Ven Microbiol 2002; 2:147-52.
20. Terán JG. Úlceras corneales en la región centro-occidental: un problema de salud pública. Rev Oftalmol Ven 2002; 58:2-6.
21. Dolande M, Ferrara G, Panizo M, Reviakina V, Bertuglia F, Moreno X. Frecuencia de hongos filamentosos aislados de muestras clínicas relevantes de pacientes hospitalizados. Caracas-Venezuela (2007-2009). Bol Venez Infectol. 2010; 1:92.
22. Chen SCA, Geoffrey Playford E, Sorrel TC. Antifungal therapy in invasive fungal infections. Curr Opin Pharmacol 2010; 10:1-9.

23. Lewis RE, Wiederhold NP, Klepser ME. *In vitro* pharmacodinamics of amphotericin b, itraconazole, and voriconazole againts *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Scedosporium* spp. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49:945-51.
24. Paphitou NI, Ostrozky-Zeichner L, Paetznick VL, Rodríguez JR, Chen E, Rex JH. *In vitro* activities of investigational triazoles against *Fusarium* species: effects of inoculum size and incubation time on broth microdilution susceptibility test results. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46:3298-300.
25. Sabatelli F, Patel R, Mann PA, Mendrick CA, Norris CC, Hare R, et all. *In vitro* activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin b against a large collection of clinically important molds and yeasts. Antimicrob Agents Chemother 2006; 2009-15.
26. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard. Second edition. CLSI document M38-A2. Vol. 28 No. 16. Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, Pennsylvania: 2008.
27. Espinel-Ingroff A, Fothergill A, Ghannoum M, Manavathu E, Ostrozky-Zeichner L, Pfaller M, et all. Quality control and reference guidelines for CLSI broth microdilution susceptibility method (M38-A Document) for amphotericin b, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. J Clin Microbiol 2005; 43:5243-6.

28. Turnidge J, Kahlmeter G, Kronwall G. Statistical characterization of bacterial wild-type MIC value distributions and the determination of epidemiological cut-off values. Clin Microbiol Infect 2006; 12:418-25.
29. Rodríguez-Tudela JL, Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, Monzon A, Cuenca-Estrella M. Epidemiological cutoffs and cross-resistance to azole drugs in *Aspergillus fumigatus*. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52: 2468-72.
30. Panizo M, Reviakina V, Montes W, González G. Mantenimiento y preservación de hongos en agua destilada y aceite mineral. Rev Soc Ven Microbiol 2005; 25:35-40.
31. Lage L. Estandarización del inóculo por densitometría para las pruebas de susceptibilidad antifúngica en especies de Fusarium (Trabajo especial de grado para especialización). Caracas: Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, 2010.
32. Panizo MM, Lage L, Ferrara G, Reviakina V. Validación del inóculo por densitometría para las pruebas de susceptibilidad a los antifúngicos en *Fusarium* spp. Rev Soc Ven Microbiol 2011 (en prensa).
33. Rodriguez-Tudela JL, Arendrup MC, Arikan S, Barchiesi F, Bille J, Chryssanthou E, et al. EUCAST Technical Note on the method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia-forming moulds. Clin Microbiol Infect. 2008; 14:982-4.

34. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard. Third edition. CLSI document M27-A3. Vol. 28 No. 14. Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, Pennsylvania: 2008
35. Córdoba S, Rodero L, Vivot W, Abrantes R, Davel G, Vitale RG. In vitro interactions of antifungal agents against clinical isolates of *Fusarium* spp. Int J Antimicrob Agents 2008; 31:171-4.
36. Stanzani F, Turnietto F, Vianelli N, Baccarani M. Update on the treatment of disseminated fusariosis focus on voriconazole. Ther Clin Risk Manag 2007; 3:1165-73.
37. Klont RR, Eggink CA, Rijs A, Wesseling P, Verwiej PE. Successful treatment of *Fusarium* keratitis with cornea transplantation and topical and systemic voriconazole. Clin Infect Dis 2005; 40:e110-2.
38. Scott LJ, Simpson D. Voriconazole: a review of its use in the management of invasive fungal infections. Drugs 2007; 67:269-78.
39. Tu EY, McCartney DL, Beatty RE, Springer K, Levy J, Edward D. Successful treatment of resistant ocular fusariosis with posaconazole (SCH-56592). Am J Ophthalmol 2007; 143:222-7.
40. Thomas PA, Abraham DJ, Kalavathy CM, Rajasekaran J. Oral itraconazole therapy for mycotic keratitis. Mycoses 1988; 31:271-9.
41. Rao SK, Madhavan HN, Rao G, Padmanabhan P. Fluconazole in filamentous fungal keratitis. Cornea 1997; 16:700.

42. Rajasekaran J, Thomas PA, Kalavathy CM, Joseph PC, Abraham DJ. Itraconazole therapy for fungal keratitis. Indian J Ophthalmol 1987; 35:157-60.