

Universidad de Costa Rica

Facultad de Microbiología

**Trabajo Final de Graduación para optar por el grado
de Licenciatura en Microbiología y Química Clínica**

**Caracterización fisiológica de *Fusarium spp.* aislado a
partir de Oncomicosis.**

Maylin Serrano Víquez

**Ciudad Universitaria Rodrigo Facio
Enero, 2009**



UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
VICERRECTORÍA DE DOCENCIA

FACULTAD DE MICROBIOLOGÍA
CIUDAD UNIVERSITARIA RODRIGO FACIO

Acta de presentación de Requisito Final de Graduación

Sesión del Tribunal Examinador celebrada el viernes 09 de enero del año 2009 con el objeto de recibir el informe oral de la estudiante **MAYLIN SERRANO VIQUEZ**, carné 983453, quien se acoge al Reglamento de Trabajos Finales de Graduación bajo la modalidad de **PRACTICA DE GRADUACIÓN**, para optar por el grado académico de **LICENCIADA EN MICROBIOLOGÍA Y QUÍMICA CLÍNICA** y el título profesional de **DOCTORA EN MICROBIOLOGÍA Y QUÍMICA CLÍNICA**.

Están presentes los siguientes miembros del tribunal:

- Dra. Norma Gross Martínez **PRESIDENTA**
- Dra. Mónica Prado Porras
- Dra. Ingrid Salas Campos
- Dr. Pedro Carrillo Dover
- Dr. Carlos Chacón Díaz

ARTICULO 1

La presidenta informa que el expediente de **MAYLIN SERRANO VIQUEZ**, contiene todos los documentos de rigor, incluyendo el recibo de pago de los derechos de graduación. Declara que la postulante cumplió con todos los demás requisitos del plan de estudios correspondientes, y por lo tanto, se solicita que proceda a hacer la exposición.

ARTICULO 2

La postulante **MAYLIN SERRANO VIQUEZ**, hace la exposición oral de su trabajo de graduación título "Caracterización fisiología de cepas de *Fusarium Sp.* aisladas a partir de onicomycosis".

ARTICULO 3

Terminada la disertación, los miembros del Tribunal Examinador interrogan a la Postulante durante el tiempo reglamentario y, una vez concluido el interrogatorio, el Tribunal se retira a deliberar.

ARTICULO 4

El tribunal considera el trabajo final de graduación satisfactorio y le confiere la calificación de: 92,6

ARTICULO 5

La presidenta del Tribunal comunica a la Postulante el resultado de la deliberación y la declara acreedora al grado de Licenciada en Microbiología y Química Clínica y al título profesional de Doctora en Microbiología y Química Clínica.

Se le indica la obligación de presentarse al acto público de juramentación al que será oportunamente convocado. Se da lectura al acta que firman los Miembros del Tribunal Examinador y la Postulante, a las 9:17 horas.

Norma G. Gross

Dra. Norma Gross Martínez
Presidenta

Mónica Prado

Dra. Mónica Prado Porras

Ingrid Salas

Dra. Ingrid Salas Campos

Pedro Carrillo

Dr. Pedro Carrillo Dover

Carlos Chacón

Dr. Carlos Chacón Díaz

Maylin Serrano Viquez

Maylin Serrano Viquez
Postulante

*A lo que ha de venir,
porque para mí es ahora cuando comienza el mayor reto.*

Agradecimientos

Le agradezco a Dios por haberme dado lo necesario para concluir este proceso y por habérmelo dado de la forma y en el tiempo que él consideró más convenientes.

También doy las gracias a la Dra. Ingrid Salas por confiarme este proyecto y por la ayuda y consejo que me brindó siempre.

A los doctores Pedro Carrillo y Carlos Chacón, por sacrificar de manera desinteresada parte de su tiempo en pro de mi investigación.

Agradezco especialmente a mi hermano Johan por ser siempre el mayor de mis admiradores y el mejor de mis maestros.

Por último, a mi familia por que con sus palabras o silencios me alientan día a día a seguir mi estrella sin importar a donde esta me pueda guiar.

Índice general

Páginas

Preliminares	
Página de firmas	i
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Índice de Cuadros	vii
Índice de Figuras	viii
Abreviaciones	ix
Resumen	1
Justificación	2
Capítulo I	
Antecedentes	
Características del género <i>Fusarium</i>	3
Epidemiología	4
Factores de riesgo y patologías asociadas	5
Factores de virulencia	8
Tratamientos utilizados en las infecciones por <i>Fusarium</i> spp.	10
Onicomycosis	11
Tipos de onicomycosis	12
Etiología de las onicomycosis	13
Diagnóstico	14
Tratamiento	16
Capítulo II	
Objetivos generales y específicos	17
Capítulo III	
Materiales y métodos	18
Crecimiento 35, 37, 40 y 42 °C	18
Producción de hemolisinas	18
Producción de proteinasas	18
Producción de fosfolipasas	19

Producción de gelatinasas	19
Producción de ureasa	
Producción de queratinasas	19
Capítulo IV	
Resultados	20
Capítulo V	
Discusión	25
Referencias	32
Anexos	42

Índice de Cuadros**Páginas**

Cuadro 1. Medición del halo de crecimiento (en centímetros) de 17 aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. a partir de Agar Caseína.	22
Cuadro 2. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de las cepas de <i>Fusarium</i> spp.	45
Cuadro 3. Resultados obtenidos para cada uno de los aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. según prueba positiva.	47

Índice de Figuras

	Páginas
Figura 1. Porcentaje de crecimiento de los aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. según temperatura.	20
Figura 2. Crecimiento de tres aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. obtenidos a partir de onicomycosis luego de tres días de cultivo a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.	21
Figura 3. Vista superficial del aislamiento 39 en Agar Caseína.	21
Figura 4. Agar Caseína. Producción de halo claro alrededor del inóculo 39.	22
Figura 5. Aislamiento β hemólisis positivo luego de 5 días de incubación en AS.	23
Figura 6. <i>Izquierda</i> : Aislamiento ureasa positivo. <i>Derecha</i> : Control ureasa negativo.	24
Figura 7. Representación esquemática de las características morfológicas microscópicas del género <i>Fusarium</i> .	46

Abreviaciones

AB: Abundante crecimiento

AC: Agar Caseína

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AG: Agar Gelatina

APD: Agar Papa Dextrosa

ARN : Ácido ribonucleico

AS: Agar Sangre

AUCh: Agar Urea de Christensen

AYH: Agar Yema de Huevo

° C: Grados centígrados

FU: Aislamiento de *Fusarium* spp.

KOH : Hidróxido de Sodio

MIC: Concentración mínima inhibitoria

MQW: Medio queratínico de Wawrzkievicz.

NC: No crece

PC: Poco crecimiento

TA: Temperatura ambiente

Resumen

Se utilizaron aislamientos de *Fusarium* spp. a fin de determinar su capacidad de crecimiento a 25, 35, 37, 40 y 42 °C, así como su habilidad para producir hemolisinas, proteinasas, fosfolipasas, gelatinasas, ureasas y finalmente de generar queratinasas. Estas últimas, al ser inoculadas en el medio queratínico de Wawrzkievicz (1991). Todas las 50 muestras fueron aisladas a partir de onicomiosis. Los aislamientos analizados crecieron abundantemente a 25 y 35 °C. Ninguno de los mismos fue capaz de crecer a 40 y 42 °C, mientras que a 37 °C sólo 68% presentó crecimiento evidente. De estos 34 aislamientos, 18 crecieron de manera abundante y 16 presentaron poco crecimiento y los 16 restantes no presentaron crecimiento evidente. Diecisiete cepas de *Fusarium* spp. lograron crecer en el Agar Caseína generando halos claros alrededor del inóculo inicial. Los diámetros de los halos oscilaron entre 1,5 y 3,9 cm.

Ninguno de los aislamientos estudiados presentó crecimiento evidente en el Agar Yema de Huevo ni en Agar Gelatina. Además, del total de cepas estudiadas solo 19 fueron capaces de producir zonas de hemólisis evidentes al ser cultivadas en Agar Sangre, sin embargo, todas crecieron de manera abundante luego de transcurrido el periodo de incubación.

La totalidad de los medios Agar Urea de Christensen inoculados con estos hongos presentaron cambio de color luego 2 días de incubación.

Finalmente, no se lograron las condiciones adecuadas para el crecimiento de los microorganismos estudiados en el medio queratínico de Wawrzkievicz (1991) por lo que no se pudo determinar la actividad queratinolítica de estos aislamientos.

Justificación

A nivel mundial los laboratorios de micología invierten grandes cantidades de recursos, tanto económicos como humanos, a fin de diagnosticar los agentes causales de las micosis superficiales más comunes. Entre estas destaca la onicomicosis, considerada la enfermedad más frecuente de las uñas (Salas, 2005). Las especies más relacionadas con este tipo de afecciones pertenecen a los géneros *Trichophyton* sp. y *Candida* sp. Otros géneros menos comunes aislados a partir de onicomicosis han sido tradicionalmente considerados como contaminantes o agentes de menor importancia. Este es el caso del género *Fusarium*. Algunas especies de este género han sido ampliamente estudiadas por tratarse de hongos fitopatógenos capaces de producir grandes pérdidas a nivel de cultivos agrícolas, con las consecuentes repercusiones económicas que esto implica; en este sentido destaca *F. oxysporum*. Sin embargo, la información existente sobre el papel de *Fusarium* spp. como agente patógeno de humanos no es tan vasto. Por ser un hongo de crecimiento rápido, cosmopolita y de amplia distribución en la naturaleza, puede ser fácilmente catalogado como un aislamiento fortuito, más de tipo contaminante que de tipo etiológico. Pese a esto, el número de aislamientos de *Fusarium* spp. a partir de onicomicosis va en aumento en todo el mundo y por supuesto Costa Rica no es la excepción (Salas y Chaves, 2004). Este hecho cobra importancia si consideramos la posibilidad de que se generen infecciones sistémicas diseminadas a partir de onicomicosis causadas por *Fusarium* spp.

En vista de que el número de personas inmunológicamente comprometidas aumenta día a día, de que *Fusarium* spp. no responde a los medicamentos normalmente utilizados para el tratamiento de la onicomicosis y de la dificultad que representa la identificación de las diferentes especies de *Fusarium* spp. debido en parte, a la escasa información disponible sobre estas, se hace necesario el contar con un mayor número de investigaciones enfocadas a proporcionar las herramientas necesarias para la identificación y tratamiento de las patologías tanto superficiales como sistémicas en las que se encuentre involucrado dicho género.

Este estudio pretende contribuir con la generación de este banco de conocimiento mediante la caracterización fisiológica de cepas de *Fusarium* spp. aisladas a partir de onicomicosis, con la esperanza de que estos hallazgos sirvan de base para el desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas y terapéuticas a corto o mediano plazo.

CAPITULO I

Antecedentes

Características del género *Fusarium*

El género *Fusarium* es un saprófito común del suelo y un importante patógeno de plantas. Este organismo causa un amplio espectro de enfermedades en humanos incluyendo micotoxicosis e infecciones, las cuales pueden ser, superficiales, localmente invasivas o diseminadas (Dignani y Anaissie, 2004). Existen 50 especies dentro de este género, las más frecuentemente relacionadas con infecciones son *F. solani*, *F. oxysporum* y *F. verticillioides*; llegando a ser la segunda causa más frecuente de infecciones por hongos filamentosos después de *Aspergillus* sp. (Olivares et al., 2005).

Fusarium spp. crece rápidamente en muchos medios, siempre que estos no contengan cicloheximida, la cual es inhibitoria para este género. En Agar Papa Dextrosa (APD), las colonias de *Fusarium* spp. son de superficie blanca algodonosa y producen pigmentos que pueden ser de color rosado, salmón, gris, amarillo o morado (Salas, 2005, Salas y Chávez, 2004, Dignani et al., 2004).

A nivel microscópico presenta filamentos hialinos, septados de 3 a 81 micrómetros de diámetro dependiendo de la especie. Son características la presencia de macroconidias fusiformes, hialinas, multicelulares que pueden llegar a sobrepasar los 100 micrómetros de largo y que pueden agruparse a manera de racimos de banano dependiendo de la especie. También están presentes microconidias de hasta 12 micras de largo, hialinas, unicelulares, ovoides o cilíndricas. Estas características son de gran importancia para la identificación del género. Las clamidosporas podrían estar presentes, aparecer solas, agrupadas o en cadenas con paredes lisas o rugosas (Mayer, 1953).

Este hongo tiene la habilidad de producir colagenasas y proteasas con las cuales pueden causar daño en tejidos, además generan micotoxinas capaces de suprimir la inmunidad celular y humoral del hospedero. Estas micotoxinas han sido asociadas a intoxicaciones alimentarias desde hace casi cien años. *Fusarium* spp. es el hongo más prevalentemente encontrado en granos como el maíz almacenado durante la época de invierno e incluso se ha relacionado con cáncer esofágico en Sur África (Mayer,

1953). Tiene también la habilidad de adherirse a diversas superficies de importancia médica como catéteres y lentes de contacto (Dignani y Anaissie, 2004), lo que amplía aún más su posibilidad de causar patología.

Epidemiología

Fusarium spp. se encuentra naturalmente presente en suelo, aire y plantas (Anaissie et al., 2001). Son más comunes en zonas tropicales y húmedas pero pueden ser encontrados en desiertos y zonas árticas (Nelson et al., 1994). La mayor parte de los casos reportados por fusariosis diseminada han sido diagnosticados en zonas de clima cálido; en las zonas árticas estos casos rara vez han sido vistos por lo que el número de publicaciones al respecto en esas áreas es mucho menor (Guarro y Gene, 1995)

La principal puerta de entrada de este agente al organismo es vía aérea, seguido por piel en caso de daño a tejido y/o membranas mucosas (Nucci y Anaissie, 2007). En este sentido se ha comprobado que el viento y la lluvia son efectivos dispersadores ambientales de este hongo (Ooka y Kommedahl, 1977). Además, estudios realizados por Anaissie y colaboradores demuestran la supervivencia y diseminación de especies patógenas de *Fusarium* spp. a través del sistema de aguas en un hospital estadounidense, el cual sirvió como reservorio para este agente (Anaissie et al, 2001). Esto deja en evidencia la gran capacidad de adaptación que presenta este hongo filamentoso, llegando incluso a conquistar sistemas acuáticos, lo que aumenta aún más, el rango de ambientes en los cuales es capaz de sobrevivir, multiplicarse y servir como agente potencialmente patógeno para humanos, plantas y animales.

Estudios realizados por Raad y su grupo de investigadores, evidencian la alta prevalencia de infecciones sistémicas causadas por *Fusarium* spp en países de clima cálido y con alta pluviosidad, durante prácticamente todo el año (Raad et al, 2002). Estas características concuerdan perfectamente con el sistema biestacional costarricense, por lo que la posibilidad de que se presenten infecciones localizadas y sistémicas por *Fusarium* spp. durante los 12 meses del año es alta. Lamentablemente en nuestro país no se cuenta con suficiente información epidemiológica al respecto.

Las especies de *Fusarium* más comúnmente aisladas de infecciones sistémicas en pacientes inmunosuprimidos, sobre todo en pacientes con enfermedad hematológica de

fondo son *F. solani*, *F. oxysporum* y *F. verticillioides*. Esta primera es considerada la especie más agresiva y diseminada (Guarro et al., 2000).

Como lo señalan Guarro y su grupo de investigadores *Fusarium* spp. exhibe una patogenicidad muy variable dependiendo de la especie que este involucrada en la infección (Guarro et al., 2000). Así por ejemplo tenemos a *F. chlamydosporum*, el cual hasta ahora, no ha sido reportada como causante de infección diseminada, por lo que se cree que presenta una patogenicidad relativamente débil (Summerbell, 2001).

Factores de riesgo y patologías asociadas

Fusarium spp. puede ser introducido al organismo mediante daño al tejido provocado por trauma directo con algún objeto contaminado previamente con este, esta es una causa frecuente de contaminación en pacientes inmunocompetentes que realizan actividades al aire libre, los cuales presentan infecciones principalmente localizadas e incluyen a las queratitis pos-trauma o por medio de lentes de contacto (Gopinathan et al., 2002) onicomycosis, celulitis, peritonitis en pacientes sometidos a diálisis peritoneal ambulatoria (Hiemenz et al., 1990), infecciones nasales, artritis séptica, endoftalmítis, cistitis, abscesos cerebrales, alergias, sinusitis, neumonía, tromboflebitis, osteomielitis, entre otras (Jensen et al., 2004, Chang et al., 2006).

La inmunidad innata juega el papel más importante en la respuesta del hospedero contra la infección (Shoham y Levitz 2005). En un individuo inmunocompetente los macrófagos inhiben la germinación de conidias así como el crecimiento de las hifas, mientras que los granulocitos inhiben únicamente el crecimiento de las hifas (Nelson et al., 1994).

Las infecciones fúngicas representan una complicación importante para pacientes inmunocomprometidos y están asociados con alta morbilidad y mortalidad (Pauw y Meunier, 1999, Walsh et al., 1996). Por lo tanto estados de inmunosupresión provocados por malignidades hematológicas, cáncer, infecciones microbianas, síndromes metabólicos, desnutrición, enfermedades autoinmunes o terapias con corticoesteroides son factores de riesgo importantes que favorecen la fusariosis diseminada (Boutati y Anaissie, 1997). Existen varios estudios que relacionan este tipo de infección sistémica con estados prolongados de inmunosupresión, en los mismos se han llegado a reportar tasas de mortalidad que alcanzan el 75% en pacientes con fusariosis sistémica (Boutati y Anaissie,

1997, Kovacicova et al., 2001). Esta alta mortalidad probablemente se deba tanto a la infección por el hongo como a la patología de fondo que afecta al paciente (Jensen et al., 2004). Es importante señalar que un adecuado diagnóstico, la detección temprana y resolución del estado neutropénico, el uso de antimicóticos eficientes, así como la identificación y remoción del foco primario a partir del cual se esta dando la diseminación del agente (tal como la infección en uñas o la colonización en catéteres intravenosos) no siempre es posible (Jensen et al., 2004), lo cual favorece que solo uno de cada cuatro pacientes afectados sobreviva (Boutati y Anaissie, 1997, Kovacicova et al., 2001).

Las infecciones fúngicas diseminadas causadas por *Candida* sp. y *Aspergillus* sp. son la principal causa de morbilidad y mortalidad entre los pacientes con algún tipo de malignidad hematológica. Sin embargo, el número de casos de pacientes de este tipo afectados por hongos considerados hasta ahora como oportunistas ha aumentado considerablemente y dentro de estos las especies mas comúnmente aisladas pertenecen al género *Fusarium* (Boutati y Anaissie, 1997). Más del 90% de estos casos presenta fiebre refractaria, con lesiones en piel tipo eritema o infecciones pulmonares, las cuales ocurren aproximadamente en el 75% de los casos (Dornbusch et al., 2005).

En la literatura existen varios casos en los que se reporta a *Fusarium* spp. como el agente causal de osteomielitis en pacientes inmunológicamente competentes cuyo factor de riesgo ha sido el trauma o cirugía (Nuevo et al., 1988, Bourguignon et al., 1997, Page et al., 1982). La osteomielitis por *Fusarium* spp. forma parte de la amplia gama de patologías diseminadas vistas en pacientes inmunosupresos. Varias especies de *Fusarium* han sido reportadas como causantes de infecciones cutáneas en pacientes diabéticos. Estas infecciones se desarrollaron a partir de lesiones en piel que dieron origen a lesiones neurológicas, celulitis, úlceras crónicas y abscesos (English, 1968). La osteomielitis es una de las complicaciones más serias que puede llegar a afectar a los pacientes que sufren de pie diabético. Mazen y su grupo reportan el primer caso documentado de osteomielitis diabética por *F. solani*, con afección importante en piel y tejidos blandos, estos investigadores consideran que dicho microorganismo pudo haber diseminado a partir de la onicomycosis que afectaba previamente a este paciente (Mazen et al., 1988). El considerar a *Fusarium* dentro de la lista de microorganismos causantes de dicho mal y a la onicomycosis como el posible foco de diseminación de este hongo puede contribuir a realizar

diagnósticos diferenciales oportunos que favorezcan la instauración de esquemas de tratamiento más eficaces a fin de prevenir la amputación del miembro afectado.

Las manifestaciones clínicas de una fusariosis dependen de la puerta de entrada de la infección y de la intensidad y duración del estado de inmunosupresión. La fusariosis diseminada se ha asociado típicamente a pacientes severamente inmunocomprometidos mientras que en las infecciones localizadas existe algún nivel de preservación en la función inmune. (Nucci y Anaissie, 2007).

La endoftalmitis en inmunocompetentes ocurre como una complicación a partir de una queratitis avanzada (Dursun et al., 2003) o secundaria a alguna cirugía ocular (Ferrer et al., 2005). En pacientes inmunocomprometidos la queratitis se presenta comúnmente como resultado de la llegada del hongo vía hematogena en caso de infección diseminada (Rezai et al., 2005).

Fusarium spp. está asociado a reacciones alérgicas o a sinusitis crónica, invasiva o no invasiva mientras que en el caso de pacientes con compromiso inmune la sinusitis es siempre invasiva (Nucci y Anaissie, 2007). Al respecto existen estudios que sugieren que la sinusitis podría servir como sitio de diseminación a partir del cual se podría generar infección sistémica (Nucci et al., 2003).

En la fusariosis invasiva es común el desarrollo de neumonías, con el consecuente daño a pulmón, esto ocurre casi siempre en el contexto de infecciones diseminadas donde los pacientes están afectados por algún nivel de inmunosupresión. Como es de esperar el compromiso a nivel de pulmón se asocia con alto riesgo de mortalidad aún después de resuelto el estado de inmunosupresión (Nucci y Anaissie, 2007).

La piel podría ser tanto foco primario de infección como una manifestación metastásica en pacientes con fusariosis diseminada. En pacientes inmunológicamente normales las lesiones suelen ser localizadas y ocurrir después de daño directo al tejido (trauma u onicomicosis preexistente). Las lesiones de piel causadas por *Fusarium* spp. pueden presentarse en cualquier parte del cuerpo, pero suelen afectar mayormente extremidades con evolución rápida de las lesiones, usualmente de pocos días (Nucci y Anaissie, 2007).

En los casos de fungemias causadas por *Fusarium* spp. la recuperación del agente a partir del hemocultivo suele ser alta, sobretodo en el contexto de una infección diseminada. Ocasionalmente la fungemia es la única manifestación de fusariosis, sobre todo en pacientes sometidos a cateterización venosa en ausencia de neutropenia. En la mayor parte

de estos casos el tratamiento antifúngico y la remoción del catéter resulta ser suficiente para resolver el cuadro (Nucci y Anaissie, 2007).

La infección diseminada es la forma clínica más frecuente y nociva de la fusariosis en pacientes inmunocomprometidos. Ocurre aproximadamente en el 70% de todos los casos de fusariosis en esta población, donde las evidencias más frecuentes del cuadro la constituyen las lesiones cutáneas junto con hemocultivos positivos por dichos microorganismos, ya sea en presencia o ausencia de afección a otros órganos como pulmones, ojos, senos nasales, entre otros. La presentación clínica típica es de un paciente con neutropenia prolongada (10 días) y profunda, fiebre persistente, presencia de lesiones a nivel de piel y con un hemocultivo positivo como mínimo. La tasa de mortalidad es alta por lo que muchos de los cuadros terminan en el fallecimiento del paciente (Nucci y Anaissie, 2007).

Factores de virulencia

Fusarium spp. es considerado como un microorganismo capaz de producir patologías en plantas, animales y humanos. *F. oxysporum*, *F. solani* y *F. verticillioides*, son responsables prácticamente de todos los casos de fusariosis invasiva en humanos (Guarro y Gene, 1995). Mediante diversos estudios, Ortopeda y colaboradores han comprobado la capacidad de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (cepa 4287) para producir patología tanto en plantas de tomate como en ratones OF-1 inmunosupresos, siendo esta misma cepa capaz de crecer en diversos tejidos, llegando en algunos casos a provocar la muerte de los ratones estudiados. Estos mismos investigadores encontraron que algunos genes del hongo responsables de causar patologías en plantas (Δfmk , $\Delta pacC$, $\Delta chsV$) no son requeridos para el desarrollo de infección en ratones, lo que sugiere que los mecanismos de patogenicidad utilizados por este microorganismo varían dependiendo del hospedero, evidenciando así la amplia gama de factores de virulencia que tienen estos hongos (Ortopeda et al., 2004).

Existe un conocimiento limitado sobre la toxigenicidad de *Fusarium* spp, asociadas a infecciones humanas. Pocos esfuerzos han sido realizados para clarificar la habilidad de las diversas especies de *Fusarium* para producir micotoxinas (Nelson et al., 1991). La producción de Fumonisina B1 ha sido determinada por Nelson et al. en cepas de *F. moniliforme* causante de patología ocular, mas específicamente, en casos de queratitis micótica (Nelson et al., 1991). Sugiura y su grupo de investigadores demostraron la

producción de fumonisina B1 a partir de cepas de *F. moniliforme* aisladas de piel, sangre y ojos de pacientes con fusariosis (Sugiura et al., 1999).

Los principales agentes etiológicos de la queratitis fúngica son *F. solani* y *F. oxysporum*, estos comúnmente producen ácido fusárico y moniliformina cuando se encuentran contaminando cultivos como granos y cereales, esto se constituye en un importante mediador de daño vegetal (Bacon et al., 1996). Existen reportes de cepas de *Fusarium* spp. aisladas a partir de queratitis micótica capaces de sintetizar ácido fusárico y moniliformina (Naiker y Odhav2004). Naiker y Odhav encontraron que dichas toxinas muestran una relación lineal entre la concentración de las mismas y la muerte de las líneas celulares estudiadas, conforme la concentración de estas sustancias crece la viabilidad de los cultivos celulares analizados disminuye. Sin embargo, las líneas celulares utilizadas muestran diferentes niveles de susceptibilidad ante estas micotoxinas. Así A549 (células de carcinoma pulmonar humano) mostró mayor sensibilidad al ácido fusárico y a la moniliformina que a la fumonisina B1. Caso contrario a la línea VK (células de riñón de mono), la cual parece ser más susceptible a fumonisina B1. Estos hallazgos pueden ser un reflejo de la habilidad de las partículas de dichas micotoxinas para ligar receptores celulares y/o penetrar membranas dependiendo del tamaño, conformación estructural y polaridad de la toxina (Naiker y Odhav, 2004).

Otra especie de *Fusarium* reconocida alrededor del mundo como patógeno de plantas es *F. sporotrichioides*, el cual es capaz de producir tricotecinas Tipo A (T-2, HT-2), estas han sido encontradas comúnmente contaminando varios tipos de cereales (maíz, avena, arroz, entre otros). La toxicidad, hematotoxicidad e inmunotoxicidad de la T-2 es considerada de gran importancia durante el desarrollo de varios tipos de fungemias. La T-2 tiene la capacidad de inhibir la síntesis de proteínas y, en altas dosis, la síntesis de ADN y ARN (Opinion of the Scientific Committee on Food on *Fusarium* Toxins, 2001). Esto puede llegar a suprimir la respuesta humoral y celular con el consecuente daño en tejidos. La tricotecina más comúnmente encontrada afectando granos es la Deoxynivalenol (DON), la cual es conocida como vomitoxina, sin embargo, no es la única. Durante su investigación, Demeke y Randy encuentran que compuestos como el 15-acetil DON (15-ADON), 3- acetil DON (3-ADON), 3,15-diacetil DON, diacetoxiscerpenol (DAS), junto con la T-2 y HT-2 han sido detectadas frecuentemente afectando la producción de granos para consumo humano en Canadá (Demeke y Randy, 2005). Hoy se sabe que todas las

especies de *Fusarium* capaces de producir tricotecinas expresan los genes *tri5* y *tox5*. Son muchas las especies de *Fusarium* que pueden expresar dichos genes y por lo tanto generar micotoxinas de importancia para la salud pública (Clear et al., 2000).

Tratamientos utilizados en las infecciones por *Fusarium* spp.

Generalmente los pacientes con infecciones localizadas se ven beneficiados con la remoción quirúrgica del área afectada (Nucci y Anaissie, 2007). Por ejemplo, en casos de onicomicosis se suele recomendar la extirpación de la uña o uñas afectadas, además del tratamiento antifúngico (Monzón y Rodríguez, 2002). Se han realizado estudios en los cuales el uso de antimicóticos como la Terbinafina, el Itraconazol (Roberts et al., 2003, Gupta et al., 2001) o el Ciclopirox en laca sobre el área afectada (posterior a aplicación de urea al 40% y consecuente eliminación de la uña) han sido tratamientos eficaces en la eliminación del cuadro (Cribier y Baskshi, 2004).

En casos de queratitis es común el tratamiento con antifúngicos tópicos como la Natamicina (Pimaricina). Recientemente se han reportado casos de tratamientos exitosos utilizando Voriconazol de forma tópica y oral. Algunos medicamentos que han mostrado una actividad reservada frente a cuadros provocados por *Fusarium* spp. son la Flucitocina (5-Fluorocitocina), Fluconazol y el Ketoconazol, los cuales han registrado pobres resultados al ser utilizados terapéuticamente en cuadros como la queratitis (Bunya et al., 2007).

El patrón de susceptibilidad antifúngico de *Fusarium* spp. varía considerablemente de una especie a otra. En la literatura se reporta que *F. solani* y *F. verticillioides* usualmente son resistentes a los azoles y exhiben altas MIC ante la anfotericina B. En contraste, *F. oxysporum* y *F. moniliforme* suelen ser susceptibles a Voriconazol y a Posaconazol. En pacientes con afección diseminada se requiere el uso de agentes sistémicos e inmunoterapia (Nucci y Anaissie, 2007). La Anfotericina B suele ser el tratamiento de elección contra la fusariosis, sin embargo, varios estudios sugieren una mejor actividad por parte del Voriconazol. Este último es un triazol que actúa inhibiendo el citocromo P-450 del cual depende la síntesis de ergosterol (Hoffman y Rathbun, 2002). Pese a esto, existen reportes sobre casos de fusariosis en donde el tratamiento con este agente falló, por lo que se recomienda en uso de terapias combinadas con anfotericina B liposomal, cirugía y potenciadores de la respuesta inmune. (Nature Publishing Group, 2003).

El efecto de transplantar células estimuladoras de granulocitos o la administración de Interferones no está claro todavía, sin embargo, dado el poco consenso que existe sobre el uso y la efectividad de los tratamientos combinados en la lucha contra la fusariosis, estas terapias podrían ser de utilidad si se administran conjuntamente con antimicóticos (Nucci y Anaissie, 2007).

Onicomycosis

El término onicomycosis procede del griego *onychos* que significa uñas y *mycosis* que significa infección por hongos (Del Palacio-Herranz y García-Bravo, 1993). La onicomycosis es una infección fúngica crónica de las uñas de los dedos ya sea de manos y/o de los pies, la cual genera destrucción gradual de las placas de la uña (Seebacher et al., 2007). Varios estudios reportan que la onicomycosis es más frecuente en uñas de pies que en uñas de manos (Bokhari et al., 1999). Se caracteriza por un engrosamiento anormal, aumento de fragilidad, formación de estrías y coloración amarilla o café oscuro de la uña (Padilla-Desgarenes, 2000). Es considerada la enfermedad más frecuente de las uñas, llegando incluso a representar de 18 a 40% de las onicopatías reportadas (Joish y Armstrong, 2001) y el 30% de las micosis superficiales (Salas, 2005). Así pues, numerosos estudios sugieren que la incidencia de onicomycosis va del 2 al 26% en la población general (Joish y Armstrong, 2001). La infección no resuelve por si sola, pudiendo incluso llegar a ser la fuente de dispersión de más lesiones a nivel de piel. Además es considerada una enfermedad contagiosa por lo que es necesaria la instauración de tratamiento (Bacon et al., 1996). Las onicomycosis son difíciles de tratar por factores intrínsecos de la misma uña, a esto se suma que no todos los agentes causantes son sensibles a las mismas drogas por lo que muchas veces, necesitan un esquema de tratamiento diferente (Mejía, 1997). También se debe tomar en cuenta que, por lo general, estos medicamentos son de alto costo para el paciente.

Escobar y Carmona consideran que la incidencia mundial de estas micosis está en aumento, principalmente por el advenimiento de poblaciones más susceptibles (ancianos, inmunodeficientes), por cambios sociales y culturales como desplazamientos de poblaciones, práctica más generalizada de deportes, mayor uso de calzado oclusivo, la utilización masiva de duchas o piscinas, el arreglo de las uñas de pies y manos y por supuesto el reconocimiento de estas micosis como entidades que necesitan ser

correctamente diagnosticadas y tratadas (Escobar y Carmona, 2003). Hoy en día, las onicomycosis son consideradas un desorden de salud importante y constituyen un problema creciente de índole público (Elewski, 1997). En la población inmunodeficiente estas lesiones adoptan un carácter más intenso y pueden causar formas diseminadas y fatales a partir de lesiones inicialmente superficiales (Virgili et al., 2002).

Existe evidencia a cerca del impacto que tiene esta patología en la calidad de vida de las personas que las padecen. Son causa importante de consulta y de ausencia laboral, además generan estrés psicológico al representar un problema estético en sí mismo (Drake et al., 1998), se puede presentar dolor al caminar, dificultad para recortarlas las uñas o elegir calzado apropiado (Svejgaard y Nilsson, 2004, Garg et al., 2004) y en personas mayores con diabetes o enfermedad vascular puede llevar a graves complicaciones como la celulitis (Salas, 2005).

Tipos de onicomycosis

Las onicomycosis se clasifican dependiendo del sitio de entrada del hongo y del mecanismo que este utilice para invadir la uña (Albert y Weis, 2004). Tenemos la onicomycosis subungual distal-lateral; en esta el hongo entra por el borde libre anterolateral y se extiende al lecho y lámina subungueal (Salas, 2005), expandiéndose gradualmente a la matriz de la uña en sentido de distal a proximal, desarrollándose una hiperqueratosis gradual. Esta es además, la forma de onicomycosis más frecuentemente encontrada (Seebacher et al., 2007).

La onicomycosis subungueal proximal es mucho más rara que la anterior (Seebacher et al., 2007) afecta la parte proximal de la lámina y se extiende hacia el borde libre continuando por la cutícula y progresando hasta el epitelio bajo la uña en dirección proximal (Salas, 2005). El hongo invade la matriz y prolifera distalmente dentro de las placas de la uña afectada (Seebacher et al., 2007). Este cuadro está más asociado a pacientes inmunosuprimidos, pero no es exclusivo de estos (Bokhari et al., 1999).

En la onicomycosis superficial blanca, o leuconiquia tricofítica, la invasión fúngica se manifiesta como manchas o depresiones en la superficie de la uña (Salas, 2005). Es principalmente causada por *Trichophyton mentagrophytes*. En este caso los elementos fúngicos se localizan en las capas superiores de la queratina de la uña (Seebacher et al., 2007).

En el caso de la onicomiosis totalmente distrófica, se da una destrucción en la totalidad de la lámina ungueal. Se observa en forma secundaria a la subungueal distal-lateral (Salas, 2005) y en presencia de candidosis mucocutánea crónica, esta última asociada frecuentemente con inmunodeficiencias congénitas (Seebacher et al., 2007).

El último cuadro clínico relacionado es la onicomiosis causada por *Candida* sp. principalmente por *C. albicans*. Otras especies como *C. parapsilosis* y *C. tropicales* han sido implicadas como agentes etiológicos de este cuadro. Es más frecuente en uñas de las manos y se presenta onicolisis y perionixis (dolor e inflamación de los tejidos periungueales). Esta es una infección típicamente oportunista (Salas, 2005). Si dicha condición se prolonga, el daño a la matriz podría generar una estructura irregular de la uña. Además, podría darse colonización bacteriana, con la consecuente inflamación y molestia en la zona afectada (Seebacher et al., 2007).

Se sabe que un mismo microorganismo puede dar varios tipos de onicomiosis, esto lleva a que, salvo en el caso de *Candida* sp., ningún cuadro esté asociado exclusivamente a un solo tipo de agente (Salas, 2005). Existen reportes de al menos tres casos de onicomiosis subungueal proximal con paroniquia en uñas de manos causada por *Fusarium* spp. (Baran et al., 1997).

Según las recomendaciones propuesta por la “International Society for Human and Animal Mycology”, el término onicomiosis debe substituirse por *tinea unguium* cuando el agente es un dermatofito, onixis cuando es por levaduras o candidosis ungueal si son levaduras del género *Candida* y por micosis ungueales en caso de que el agente causal sea un hongo filamentoso (Nomenclatura de las enfermedades fúngicas, 1992).

Etiología de las onicomiosis

Los organismos más comúnmente identificados como causantes de onicomiosis son *T. rubrum* seguido por *T. mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum* y *Microsporum* sp., aunque este último es extremadamente raro. *T. rubrum* es el dermatofito más comúnmente aislado, aproximadamente el 84% de los casos positivos por dermatofitos corresponden a este hongo (Järv et al., 2004). Los hongos denominados dermatofitos son llamados así debido a que afectan el estrato córneo de la dermis, pelo y uñas.

Se ha llegado a aislar *T. violaceum*, *T. megnini* y *T. shoeleni* en aquellos países endémicos para estos microorganismos (Rippon, 1992) y rara vez se ha reportado a *T.*

verrucosum, *M. canis* y *M. gypseum* (Garg et al., 2004). *Candida* sp. figura como la segunda causa de onicomicosis en uñas traumatizadas o con enfermedad preexistente (Svejgaard y Nilsson, 2004). Sin embargo en países como Australia, Arabia Saudita y Pakistán las onicomicosis por *Candida* sp. ocupan el primer lugar y además se reportan más frecuentemente en uñas de la manos y en mujeres (Bokhari et al., 1999).

La capacidad de producir infección en uñas no es exclusiva de los dermatofitos, así, especies pertenecientes a los géneros *Fusarium*, *Aspergillus*, *Acremonium*, *Scopulariopsis*, *Alternaria*, *Curvularia*, *Penicillium* y *Scytalidium* son capaces de hacerlo (Garg et al., 2004, Gianni et al., 2000, Gupta et al., 2001). Aunque esos otros agentes se informan de forma esporádica, su importancia está aumentando rápidamente (Salas 2005). En Europa causan entre del 1,6 a 6% de los casos estudiados (Gianni et al., 2000) y en la India representan el 39,6% de las onicomicosis, contra un 26,4% para los dermatofitos (Garg et al., 2004). Algunos autores reportan a *Fusarium* spp. como causante de onicomicosis con frecuencias que van desde un 0,97 a un 6% (Garg et al., 2004, Järv et al., 2004, Alvarez et al., 2004).

En pacientes inmunosuprimidos se debe hacer un examen exhaustivo en busca de onicomicosis o micosis en piel (Salas, 2005), ya que existen casos descritos de diseminación sistémica de *Fusarium* spp. a partir de uñas infectadas por este hongo (Boutati et al., 1997, Arrese et al., 1996, Baran et al., 1997, Gupta et al., 2001, Dignani y Anaissie, 2004).

Diagnóstico

El término onicomicosis encierra una amplia variedad de entidades, tanto por sus manifestaciones clínicas como por el tipo de agente etiológico involucrado. De ahí la importancia de realizar un diagnóstico adecuado. Este siempre ha de basarse en el aspecto clínico de la lesión, la procedencia del paciente, y en los antecedentes de otras infecciones relacionadas como el pie de atleta o tratamientos específicos (López-Jodra y Torres-Rodríguez, 1999).

El análisis debe constar del examen directo, el cultivo y la identificación ya sea morfológica y/o bioquímica. Para un diagnóstico correcto es indispensable una buena toma de muestra, esto requiere, entre otras cosas, que el paciente no esté bajo tratamiento antifúngico al momento de la recolección de la muestra. Se debe realizar una adecuada

desinfección de la zona afectada para evitar el crecimiento de contaminantes y de integrantes de la flora normal del paciente que pudieran confundirse con los agentes causales de la lesión. La toma de muestra se ha de hacer en los estratos más internos de la uña. Algunos autores proponen efectuar biopsias de las uñas para certificar la invasión fúngica, este método puede ser útil en infecciones por mohos de dudosa patogenicidad o poco comunes. Ahora bien, el instrumental usado para la toma de muestras debe ser estéril, al igual que los contenedores para recoger, conservar y transportar la muestra (López-Jodra y Torres-Rodríguez, 1999).

El examen directo se realiza KOH al 40%, esto permite digerir la queratina de manera que se pueda visualizar el contenido fúngico (López-Jodra y Torres-Rodríguez, 1999). Aparte del examen directo se debe inocular la muestra en Agar Glucosado de Sabouraud y en medios con cicloheximida; es importante contar con ambos medios pues los últimos inhiben la flora contaminante así como a algunas especies de *Candida* y hongos filamentosos agentes de onicomycosis (Guého et al., 1992).

El diagnóstico de las onicomycosis es complicado, en especial en las uñas de los pies, debido a que los hongos se localizan en las partes más bajas de la lámina ungueal (Rippon, 1992), por ello se debe tomar varias muestras y repetir los estudios cuando el cultivo es negativo, ya que se han reportados casos en los que el examen directo es positivo, pero los cultivos son negativos (Campbell et al., 2004, Marín, 1991).

El diagnóstico se complementa no sólo con el cultivo sino con la valoración de éste, el hallazgo de un dermatofito de una lesión ungueal es causa de una *tiña unguium*, el aislamiento de moho o levadura puede ser efecto de la contaminación ambiental, de la flora normal del paciente, o el agente de una infección real (English, 1973).

Es importante el análisis de los crecimientos recuperados a partir de un examen directo positivo, ya que el número de colonias respecto al número y posición de puntos de inóculo son orientativos en uno u otro sentido, sin embargo, de ser posible se deben solicitar muestras posteriores para comprobar el diagnóstico inicial. La procedencia del enfermo, el contacto con posibles focos infectantes como otras personas enfermas o animales, la ocupación que favorezca el desarrollo de la micosis y el país de donde procede el paciente, han de orientar sobre el valor de los cultivos positivos por especies poco habituales (López-Jodra y Torres-Rodríguez, 1999).

Tratamiento

Hasta el momento no se conoce de ningún medicamento capaz de resolver todos los cuadros de onicomycosis existentes. Se considera que las onicomycosis son las micosis superficiales más difíciles de tratar (Salas, 2005), esto en vista de su tendencia a la cronicidad, a la dificultad de acceso por parte del medicamento a las zona afectada (dada la estructura misma de las uñas) y la propensión a las recaídas (Albert y Weis, 2004). En el caso de infecciones por dermatofitos y *Candida* sp. se cuenta con tratamientos orales y tópicos como fluconazol, itraconazol, griseofulvina y terbinafina, entre otros (Salas, 2005). Dado que la lista de hongos capaces de generar esta patología ha aumentado en los últimos años, no se aconseja la prescripción de medicamentos sin tener identificado el agente causal con anterioridad, ya que se sabe que algunos de estos hongos son resistentes a los agentes antimicóticos de uso frecuente como los imidazoles y la flucitosina (Gianni et al., Gupta et al, 2001). La griseofulvina es el único medicamento aprobado actualmente para tratar la onicomycosis infantil, sin embargo, en caso de no contar con este, el fluconazol puede ser utilizado en pacientes a partir de un año de edad (Seebacher et al., 2007). Todos los antifúngicos sistémicos desarrollados hasta ahora podrían causar reacciones adversas como alergias, hepatotoxicidad, pigmentación de la piel, entre otros, por lo que se hace necesaria la identificación del agente en procura de la optimización de los esquemas de tratamiento (Mycoses. Journal Compilation, 2007).

CAPITULO II

Objetivos

Objetivo general:

Caracterizar fisiológicamente aislamientos de *Fusarium* spp. provenientes de pacientes con onicomiosis del servicio de Micología del Hospital Calderón Guardia y la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica.

Objetivos específicos:

- Determinar la capacidad de los aislamientos de *Fusarium* spp. para crecer a 35, 37, 40 y 42 °C.
- Caracterizar enzimáticamente los aislamientos de *Fusarium* spp. según su habilidad de producir fosfolipasas, gelatinasas, proteinasas, queratinolisinas, ureasas y hemolisinas.
- Evaluar la capacidad de crecimiento de cada aislamiento en el medio queratínico de Wawrzkievicz.

CAPITULO III

Materiales y métodos:

Para el presente estudio se trabajó con 50 aislamientos de *Fusarium* spp. obtenidos a partir de 50 casos de oncomicosis, de los cuales 35 pacientes fueron atendidos en el Laboratorio Clínico del Hospital Calderón Guardia y 15 en la Sección de Micología de la Facultad de Microbiología, en la Universidad de Costa Rica. Cada aislamiento fue clasificado dentro del género *Fusarium* mediante la observación de las características macro y microscópicas típicas de este género.

Cada aislamiento se repicó en Agar Papa Dextrosa (APD) y se incubó por 8 días a temperatura ambiente (TA) antes de realizar cada una de las pruebas, a fin de tener un cultivo fresco y de estandarizar las condiciones de crecimiento previas.

Crecimiento 35, 37, 40 y 42 ° C

Para evaluar el crecimiento a diferentes temperaturas se cortaron cuatro cuadros de 1 cm² a partir de cada uno de los cultivos y se colocó un cuadro en cada placa de 96 mm de diámetro con APD, hasta completar 4 placas. Luego se incubó cada placa a una temperatura diferente, a saber 25, 35, 37, 40 y 42 ° C por un periodo de 5 días, luego de los cuales se midió el crecimiento de cada aislamiento según temperatura. Se utilizó como control positivo el crecimiento a 25 ° C.

Producción de hemolisinas

La capacidad hemolítica de los aislamientos se determinó a partir de una suspensión de esporas 0,5 MacFarland, de la cual se colocó 10µL en el centro de una placa de Agar Sangre (Ver Anexo 2) y se incubó a TA por 5 días. Transcurrido el periodo de incubación se determinó la presencia de zonas de hemólisis. Se usaron como controles positivos cepas de *Streptococcus pyogenes* y como control negativo cepas de *Candida albicans*.

Producción de proteinasas

A fin de determinar la presencia de proteinasas se procedió de la manera indicada anteriormente en cuanto a tipo de suspensión, volumen del inóculo, temperatura y

periodo de incubación. Sin embargo, se utilizó Agar Caseína (Ver Anexo 3) pH 7, en donde se determinó la presencia o ausencia de un halo claro alrededor de cada inóculo. Luego se procedió a medir el diámetro del mismo. Se usaron como control positivo cepas de *Candida albicans* y como control negativo cepas de *Candida krusei*.

Producción de fosfolipasas

Para el caso de las fosfolipasas se utilizó Agar Yema de Huevo (Ver Anexo 4), siguiendo el mismo protocolo ya mencionado en lo que a tipo de suspensión, volumen del inóculo, temperatura y periodo de incubación se refiere. En este caso se consideran como positivas aquellas cepas que presentaron halo de precipitación alrededor del inóculo.

Producción de gelatinasas

Con el fin de determinar la presencia de gelatinasas se repicó cada aislamiento en el centro de una placa con Agar Gelatina (Ver Anexo 5). Se incubó por 5 días a TA. Luego se colocó a 4^o C por 30 minutos. Después de este tiempo se determinó si hubo o no solidificación completa del medio. Cepas de *Staphylococcus aureus* y *Alcaligenes faecalis* fueron utilizados como controles positivos y negativos respectivamente.

Producción de ureasa

Se repicó cada cepa en Agar Urea de Christensen (Ver Anexo 6). Luego de una incubación de 5 días a TA, se determinó si hubo algún cambio de color en el medio. Como control negativo se utilizaron cepas de *Escherichia coli* y como control positivo cepas de *Proteus vulgaris*.

Producción de queratinasas

La presencia de queratinasas se analizó mediante el repique de cada aislamiento en el medio queratinofílico de Wawrzkievicz (1991). Se incubó cada placa a TA por 6 días. Luego de este periodo se determinó la capacidad de crecimiento de cada aislamiento en este medio (Ver Anexo 7), para luego determinar la existencia y diámetro del halo claro alrededor de cada colonia en estudio. Como control positivo se utilizaron cepas de *T. rubrum* y *M. gypseum*.

CAPITULO IV

Resultados

De los 50 aislamientos hechos a partir de onicomiosis se observó un crecimiento del 100% al ser repicados en Agar Papa Dextrosa (APD) y mantenidos a 25 y 35 °C durante 5 días. Al someter los aislamientos de *Fusarium* spp. a temperaturas de crecimiento de 40 y 42 °C, durante el mismo periodo de tiempo no se obtuvo crecimiento de ninguno de los aislamientos analizados. A 37 °C se dio la mayor variabilidad tanto en número como en intensidad de crecimiento, ya que de los 50 aislamientos sólo 34 (68%) crecieron a esta temperatura, como se evidencia en la figura 1.

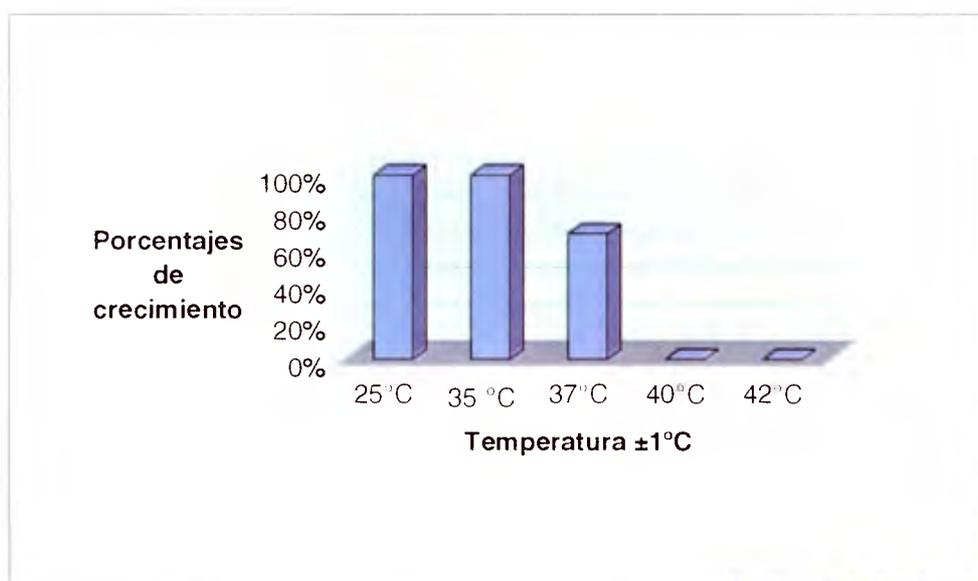


Figura 1. Porcentaje de crecimiento de los aislamientos de *Fusarium* spp. según temperatura.

De estos 34 aislamientos, 18 crecieron de manera abundante (A) y 16 presentaron poco crecimiento (B), los 16 restantes no presentaron crecimiento evidente (C), tal como se muestra en la figura 2.



Figura 2. Crecimiento de tres aislamientos de *Fusarium* spp. obtenidos a partir de onicomycosis luego de tres días de cultivo a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

Del total de aislamientos, sólo 17 cepas de *Fusarium* spp. lograron crecer en Agar Caseína (Ver figura 3), estos produjeron halos claros alrededor del inoculo inicial (Ver figura 4). Dichos halos fueron medidos y promediados utilizando los valores de las colonias analizadas por duplicado. Los datos oscilan entre 1,5 y 3,9 cm de diámetro (cuadro 1).



Figura 3. Vista superficial del aislamiento 39 en Agar Caseína.



Figura 4. Generación de halo claro por parte del aislamiento 39 en Agar Caseína.

Cuadro 1. Medición del halo de crecimiento (en centímetros) de 17 aislamientos de *Fusarium* spp. a partir de Agar Caseína.

Números de aislamientos positivos en Agar Caseína	Promedio del diámetro en centímetros
FU-34	2,1
FU-39	1,5
FU-41	2,1
FU-43	3,8
FU-45	1,6
FU-49	3,8
FU-59	3,6
FU-61	3,2
FU-62	2,2
FU-69	2,7
FU-72	1,9
FU-75	2,9
FU-79	3,9
FU-80	2,6
FU-84	2,7
FU-87	3,1
FU-92	2,7

Ninguno de los 50 aislamientos presentó crecimiento evidente en el AYH.

Del total de cepas estudiadas solo 19 fueron capaces de producir zonas de hemólisis evidentes al ser cultivadas en AS, sin embargo, las 50 cepas presentaron crecimiento abundante en este medio de cultivo una vez transcurrido dicho periodo. Todas las cepas positivas presentaron un patrón hemolítico que concuerda con el de la cepa control de *Streptococcus pyogenes*, esto es β hemólisis (Ver figura 5).

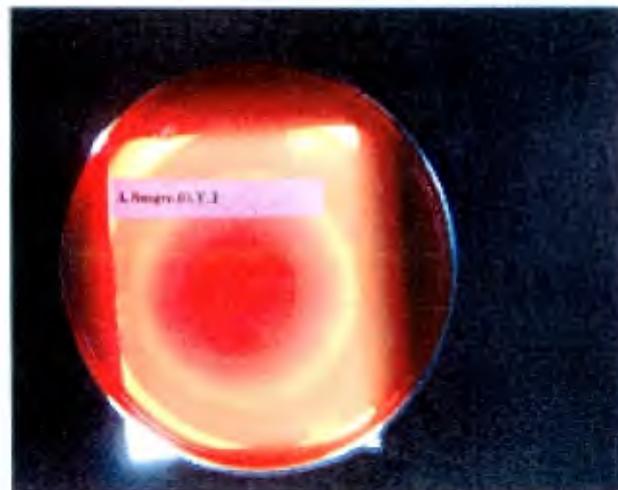


Figura 5. Aislamiento β hemólisis positivo luego de 5 días de incubación en AS.

Ninguna de las 50 muestras utilizadas presentó crecimiento ni capacidad de licuefacción al ser inoculadas en el medio AG. Caso contrario a lo ocurrido con la totalidad de los hongos inoculados en AUCH; en donde se observó no solo buen crecimiento por parte del 100 % de los aislamientos, si no que dicho medio presentó viraje de color luego 2 días de inoculadas las cepas de *Fusarium* spp, tornándose rosado intenso y manteniéndose de esta forma durante los 3 días de estudio restantes (Ver figura 6).

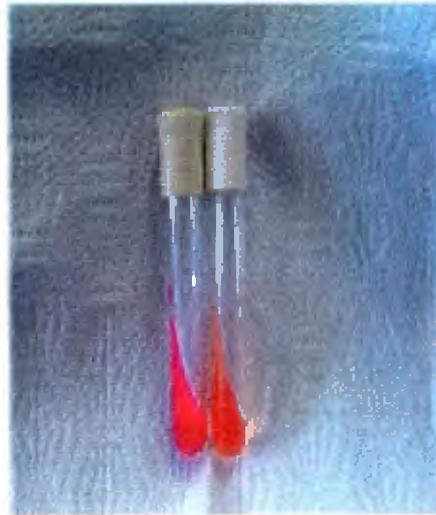


Figura 6. *Izquierda* : Aislamiento ureasa positivo. *Derecha*: Control ureasa negativo

Pese a que se realizaron varios ensayos utilizando diversas concentraciones de queratina para el MQW (1991), a saber: 0.06%, 0.6% y 6.0%, no se logró dar con las condiciones adecuadas para favorecer el crecimiento ni de los aislamientos en estudio ni de los controles utilizados.

CAPITULO V

Discusión

Fusarium spp. es un organismo comúnmente encontrado en la naturaleza, capaz de sobrevivir en una gran cantidad de ambientes diferentes incluyendo suelo, aire y acueductos (Anaissie et al., 2001). Este hongo de crecimiento rápido y de gran capacidad de adaptación a diferentes tipos de climas está ampliamente reconocido como patógeno de plantas (Nelson et al. 1994). Razones por las cuales persiste la idea de que este no es un organismo capaz de generar infección si no es de forma secundaria u oportunista. Pese a esto, se han descrito para este hongo propiedades que bien podrían considerarse como factores de virulencia, por ejemplo, la facilidad de adherirse a materiales inertes como los utilizados para fabricar catéteres y lentes de contacto (Dignani y Anaissie, 2004), la presencia de micotoxinas inmunosupresoras, colagenasas y proteasas con posible potencial para generar daño a tejidos (Mayer, 1953). Este hongo tiene la capacidad de generar infección en plantas, animales y humanos, esta amplia variedad de hospederos sugiere la existencia de varios mecanismos de patogenicidad, evidenciando así la amplia gama de procesos diferentes que pueden utilizar estos hongos para generar infección (Ortopeda et al., 2004).

La influencia de la temperatura sobre el crecimiento fúngico tiene una gran relevancia para comprender la ecología de las diferentes especies fúngicas, tanto en su comportamiento individual como en sus relaciones interespecíficas (Santamaría y Roselló, 2003). Este hecho se puede utilizar para identificar y aislar selectivamente las diversas especies de microorganismos patógenos como las comprendidas dentro del género *Fusarium*.

Numerosos hongos y bacterias crecen de manera óptima a temperaturas que oscilan entre 18°C y 25°C, la mayoría de los hongos lo hace bastante mal a temperaturas por encima de 35°C (López-Jodra y Torres-Rodríguez, 1999). Lo anterior se evidenció con el crecimiento de todos los aislamientos de *Fusarium* spp. en APD a 25 °C. Estos mismos organismos presentaron buen crecimiento a 35 °C, esta diferencia de aproximadamente

10°C entre ambas temperaturas, no parece haber influido de manera significativa en la capacidad de crecimiento de ninguno de los aislamientos observados.

El 68% de los aislamientos fueron capaces de crecer a 37 °C, sin embargo la intensidad de crecimiento no fue la misma en todos los casos (Ver Anexo 9). Algunos mostraron un crecimiento abundante a esta temperatura, comparable con el mostrado a 25°C y 35°C, lo cual pudo deberse al hecho de que todos los aislamientos provienen de infecciones en uñas y no de cuadros sistémicos, esto hace suponer la existencia de un entorno normal con temperaturas por debajo de los 37°C. Por lo cual, sería recomendable realizar nuevos ensayos utilizando aislamientos hechos a partir de procesos invasivos, los cuales, en principio, deberían ser capaces de generar crecimiento abundante a esta temperatura, ya que en general, la temperatura óptima de incubación para microorganismos patógenos es de 37°C (López-Jodra y Torres-Rodríguez, 1999). Estos hallazgos permiten suponer una mayor capacidad patogénica por parte de estos aislamientos, debido a la habilidad mostrada para crecer abundantemente a la temperatura corporal normal del ser humano. Basándose únicamente en este hecho se puede suponer una mayor capacidad de generar invasiones sistémicas por parte de estos aislamientos, sin embargo, deben ser considerados otros factores como el estado inmune del hospedero.

Los dieciséis aislamientos que crecieron pobremente a 37°C podrían tener una menor capacidad de producir cuadros invasivos dada su dificultad para desarrollarse a esta temperatura. Por lo tanto, aislamientos que no crecieron a 37° C no deberían ser capaces de generar patogénesis de carácter invasivas dada su poca termotolerancia.

Ninguna de las cepas estudiadas mostró crecimiento evidente cuando se encubaron a 40°C y 42 °C. Estos valores podrían corresponder con las temperaturas alcanzadas durante episodios febriles por parte del hospedero, lo cual implicaría que, aún cuando varios de los aislamientos podrían ser capaces de sobrevivir a temperatura corporal no podrían soportar un cuadro febril igual o superior a los 40 °C, sobre todo si este se mantiene por un periodo de tiempo prolongado.

Es importante destacar que en el laboratorio se procuró mantener constantes las temperaturas de 40 y 42 ±1°C, durante 5 días. Es poco probable que un hospedero pueda mantener temperaturas similares a las mencionadas tanto tiempo. Si bien es cierto, el desarrollo e invasión del hongo durante el periodo febril se podrían ver interrumpidos, una

vez resuelto el mismo, el hongo podría continuar con el cuadro sistémico dada su habilidad de crecer a 37°C.

La capacidad de crecimiento temperatura dependiente según aislamiento, puede servir como un elemento para la diferenciación entre las especies pertenecientes al género *Fusarium* incluidas en este estudio y además representar un factor de virulencia importante a la hora de determinar el potencial de patogenicidad de cada uno de los aislamientos en cuestión.

La caseína es una proteína encontrada en la leche compuesta de aminoácidos que son utilizados por los microorganismos como fuente de energía y carbono. Cuando la leche es mezclada en un medio de cultivo, el medio pierde su transparencia y se vuelve turbio debido a que la caseína reacciona con el calcio y forma complejos coloidales insolubles de caseinato de calcio. Cuando la exoenzima caseinasa cataliza la hidrólisis de la caseína, los aminoácidos resultantes se disuelven en el medio acuoso y el medio se torna de nuevo transparente alrededor de la colonia del microorganismo. Este fenómeno permite detectar la degradación de dicha proteína (Olivas y Alarcón, 2004). Diecisiete de los aislamientos del hongo analizados presentaron crecimiento en Agar Caseína, produciendo halos claros con medidas de diámetros que se distribuyen entre 1,5 y 3,9 cm. Esto supone que por lo menos el 34 % de estos microorganismos poseen caseinasas (proteinasas), capaces de metabolizar dicho compuesto proteico, sin embargo, la actividad de las enzimas implicadas no es la misma dada la variabilidad en los diámetros medidos. Este hecho plantea la posibilidad de que especies diferentes, o al menos con expresiones fenotípicas diferentes, sean las causantes de los cuadros de onicomycosis a partir de los cuales fueron aisladas.

Las lecitinas son componentes normales presentes en la yema del huevo. Se clasifican bioquímicamente dentro del grupo de los fosfoglicéridos o fosfolípidos (Macfaddin, 2004), las lecitinasas son las enzimas capaces de degradar estos compuestos. Existen diferentes tipos de actividades para esta enzima. Willis demostró la existencia de cuatro actividades de lecitinasa diferentes correspondientes a la Lecitinasa A, B, C (también llamada fosfolipasa C) y D (Willis, 1969). La Lecitinasa actúa sobre el componente lipoproteico de la yema de huevo liberando fósforo y colina, este proceso se lleva a cabo en etapas, la precipitación de las grasas insolubles (diglicéridos) produce opalescencia, la cual se manifiesta como un halo opaco alrededor de las colonias que crecen en medios que

contienen yema de huevo (Macfaddin, 2004). Ninguna de las 50 muestras produjo halo opaco o crecimiento evidente en AYH; esto demuestra la incapacidad de los aislamientos de producir actividad fosfolipasa. Lo cual, bien puede deberse a la no producción de las enzimas o la inactividad de las mismas por parte de las especies de *Fusarium* utilizadas en este estudio. Este resultado puede ser utilizado como una característica diferencial entre otros géneros de hongos patógenos de humanos y *Fusarium* spp.

Las 50 muestras analizadas presentaron crecimiento abundante en AS, lo cual no es de extrañar si se toma en cuenta que este es un medio rico y por lo tanto permisivo para muchas especies de microorganismos como bacterias, levaduras y hongos filamentosos. Del total de crecimientos en AS, sólo el 38% presentó hemólisis evidente en dicho medio. Lo cual supone una diferencia en cuanto a las propiedades hemolíticas por parte de estos aislamientos.

Las hemolisinas son proteínas tóxicas extracelulares (exotoxinas) que rompen la membrana de los eritrocitos y de otras células eucarióticas, frecuentemente producidas por cepas de determinadas especies patógenas para humanos y animales (Pineda y Rodríguez, 1990). Según lo reportado en la literatura la presencia de hemolisinas puede ser un indicador de patogenicidad en aquellos organismos que las producen. Lo cual supone que los aislamientos β hemolíticos podrían tener un mayor potencial para provocar daño celular con respecto a los restantes crecimientos que no presentaron este tipo de actividad lítica. La capacidad de generar lisis eritrocitaria y en general daño celular, bien podría ser considerado como un factor de virulencia mediador de daño tisular y consecuentemente, facilitar la invasión del hongo desde áreas superficiales hacia estratos más profundos pudiendo, incluso, generar trastornos a nivel sistémico. En este sentido se hace necesario llevar a cabo un mayor número de investigaciones a fin de dilucidar el papel que juegan las hemolisinas en los mecanismos de patogenicidad con que cuentan cada una de las especies incluidas en este estudio y en general en este género.

El 100% de las cepas utilizadas fue incapaz de crecer en el AG. La gelatina es una proteína derivada del colágeno animal que se incorpora con frecuencia a medios de cultivo, para determinar la capacidad de un determinado microorganismo de producir enzimas proteolíticas (proteinasas), las cuales se detectan por la digestión o licuefacción de la

gelatina. Las enzimas capaces de producir gelatinólisis se denominan gelatinasas. Estas enzimas proteolíticas a menudo son importantes factores de virulencia de algunos microorganismos (Macfaddin, 2004). Los resultados obtenidos permiten suponer la incapacidad para producir este tipo de exoenzimas (gelatinasas) por parte de los aislamientos estudiados, sin embargo, esta característica puede servir para discriminar entre *Fusarium* spp. y otros microorganismos patógenos capaces de generar este tipo de proteólisis.

La ureasa es una importante enzima microbiana relacionada con la descomposición de los compuestos orgánicos, cuyo único sustrato es la urea. El medio AUCh se utiliza para detectar la actividad de ureasa ya que contiene 2 % de urea como única fuente de nitrógeno (N_2). La urea se escinde en dos moléculas de NH_3 y una CO_2 por la acción de la enzima ureasa. La liberación de amonio eleva el pH del medio, lo que, a su vez, favorece el viraje del indicador rojo de fenol hacia un intenso color rojo rosado (Macfaddin, 2004). Todos los 50 aislamientos inoculados en AUCh presentaron buen crecimiento en dicho medio, provocando el viraje del indicador aproximadamente a las 48 horas de inoculados, indicando de esta manera su capacidad de obtener el N_2 necesario para el crecimiento a partir de la urea disponible en el medio, evidenciando así la presencia y actividad de la enzima ureasa en todos los casos, no solo por el viraje del indicador si no por el buen crecimiento observado en cada uno de los aislamientos. Dada la relación existente entre la actividad ureasa y la capacidad de esta para descomponer materia orgánica, es de esperar que estos aislamientos sean capaces de degradar fácilmente compuestos de origen orgánico como los que conforman los diferentes tejidos humanos. Estos resultados positivos, así como el periodo de tiempo en el que se dio el viraje del indicador pueden ser datos de utilidad a la hora de hacer diagnóstico diferencial entre *Fusarium* spp. y otras especies de hongos ureasa positivos (Ghosh et al., 2002). Pero no podría ser utilizados para la clasificación entre las especies de *Fusarium* a las cuales se hace referencia en este estudio dada la positividad presentada por todos los aislamientos.

No se pudo determinar la actividad o presencia de enzimas queratinolíticas (queratinasas) en ninguno de los 50 aislamientos ya que estos no fueron capaces de crecer en el medio con queratina de Wawrzkievicz (1991). De la misma forma los hongos

utilizados como controles positivos *T. rubrum* y *M. gypseum* fueron incapaces de crecer en dicho medio. Este resultado no corresponde a lo esperado para estas dos especies de dermatofitos, ampliamente reportados como hongos queratofílicos y queratinolíticos. Este hecho hace suponer que existe algún dato erróneo en cuanto a la concentración de uno o más de los ingredientes utilizados para la preparación del medio ya que, a pesar de realizar el ensayo utilizando queratina a partir de plumas de gallina doméstica al 0,06%, 0,6% y 6,0% no se logró crecer ninguno de los hongos inoculados. En este sentido y ante la imposibilidad de determinar la presencia de queratinasas a partir de estos aislamientos, es recomendable realizar estudios posteriores a fin de continuar ensayando diferentes concentraciones para cada uno de los reactivos necesarios en la preparación de dicho medio. O bien, utilizar nuevas metodologías, como la propuesta por Filipello, Fusconi y Querio, en la cual se utilizan aceites ricos en queratina provenientes de cabello y uñas humanos (Filipello et al., 2000). El uso de microscopía electrónica podría ser también de utilidad si se destina a la búsqueda de imágenes que evidencien la presencia de *Fusarium* spp. como organismo único colonizando sustratos ricos en queratina, tales como uñas o cabello humano. Lo cual apoyaría la existencia de este tipo de enzimas capaces de metabolizar y degradar dicha proteína de origen animal.

En conclusión, la temperatura a la cual un microorganismo es capaz de crecer, es un aspecto importante en los procesos de infección. La variabilidad mostrada por los 50 aislamientos de *Fusarium* spp. deja claro que dicha capacidad varía probablemente dependiendo de la especie involucrada. Así mismo, esta capacidad de crecimiento temperatura dependiente según aislamiento, puede servir como un elemento para la diferenciación entre especies y además representar un importante factor de virulencia.

Otras características importantes de los aislamientos estudiados son la capacidad de producir hemólisis en AS, de crecer y generar halos de diferentes diámetros en AC y la de degradar urea en el AUCh. Aquellos aislamientos con resultados positivos podrían tener mayor potencial para generar daño celular que aquellos negativos para una o más de estas pruebas.

Estos resultados no sólo pueden ser de ayuda a la hora de diferenciar entre las múltiples especies de *Fusarium* spp o entre estas y otros hongos de patógenesis conocida, si no que, posiblemente, se correspondan con la existencia de factores de virulencia hasta

ahora ignorados para este género, pero ampliamente descritos para otras especies de hongos reconocidos como patógenos. Tal es el caso de algunas especies pertenecientes al género *Candida*, en las cuales la producción de fosfolipasas y proteinasas, así como la capacidad de crecer a 37°C son considerados como factores de virulencia capaces de conferir cierto potencial de patogenicidad a aquellos organismos que las producen (Ibrahim et al., 1995, Naglik et al., 2003). También se ha reportado la producción de lipasas, lecitinasas, hialuronidasas, colagenasas, proteinasas, gelatinasa, ureasa y fosfolipasas en *Basidiobolus ranarum*. En este caso estas actividades enzimáticas han sido igualmente consideradas como factores de virulencia (Okafor y Gugnani, 1990, Okafor, 1994).

Estos resultados pueden ser de utilidad a hora de diseñar metodologías económicas y de fácil interpretación que permitan la identificación, caracterización y diferenciación de las diferentes especies que conforman este género. A la vez, dejan abierta la posibilidad de que exista un gran número de actividades enzimáticas de las cuales, probablemente, haga uso este hongo durante sus procesos de infección y patogénesis, lo cual, podría implicar que dicho microorganismo es capaz de generar infección de forma primaria y no de manera oportunista como hasta ahora han defendido varios autores. Este hecho puede ser de importancia tanto en los terrenos de la investigación científica, como en materia clínica ya que facilitaría diagnósticos y tratamientos más oportunos, lo cual en muchos casos, significaría la salvaguarda de vidas humanas.

Referencias

- Albert, S., y Weis, Z. (2004). Management of onychomycosis with topical. Clin. Podiatr. Med. Surg 21, 605-615.
- Albert, S.F., y Weis, Z.H. (2004). Management of onychomycosis with topical. Clin. Podiatr. Med. Surg 21, 605-615.
- Alvarez, M., Gonzáles, L., y Castro, L. (2004). Onychomycosis in Cali, Colombia. Mycopathologia 158, 181-186.
- Anaissie, E.J., Kuchar, R.T., Rex, J.H. (2001). Fusariosis and pathogenic *Fusarium* species in a hospital water system: a new paradigm for the epidemiology of opportunistic mould infections. Clin. Infect. Dis 33, 1871-8.
- Arrese, J., Piérard-Franchimont, C., y Piérard, G. (1996). Fatal hyalohyphomycosis following onychomycosis in an immunocompromised patient. (Extraordinary case report). Am. J. Dermatopathol 18, 196-198.
- Bacon, C., Porter, J., Norred, W., y Leslie, J. (1996). Production of fusaric acid by *Fusarium* species. Appl. Environ. Microbiol. 62, 4039-43.
- Baran, R., Tosti, A., y Piraccini, B. (1997). Uncommon clinical patterns of *Fusarium* nail infection: report of three cases. Br. J. Dermatol 136, 424-427.
- Blackwell Publishing Ltd. (2007). Mycoses. Journal Compilation. 50, 321-327
- Bokhari, M., Hussain, I., Jahangir, M., Haroon, T.S., y Aman, S. (1999). Onychomycosis in Lahore, Pakistan. Inter. J. Dermatol 38, 591-595.
- Bourguignon, R., Walsh, A., Flynn, J., Baro, C., y Spinos, E. (1997). *Fusarium* species osteomyelitis. J. Bone. Joint. Surg 58, 722-723.

Boutati, E., y Anaissie, E. (1997). *Fusarium*, a significant emerging pathogen in patients with hematologic malignancy: ten years experience at a Cancer Center and implication for management. *Blood* 90, 99-1008.

Bunya, V., Hammersmith, Y., Capuano, C., Ayres, B., y Cohen, E. (2007). Topical and oral voriconazole in the treatment of fungal keratitis. *Am. J. Ophthalmol.* 143, 151–153.

Campbell, A.W., Anyanwu, E.C., y Moran, M. (2004). Evaluation of the drug treatment and persistence of onychomycosis. *Scientific World J* 31, 760-777.

Chang, D., Grant, B., O'Donnell, K., Wannemuehler, A., Noble-Wang, J. (2006). Multistate outbreak of *Fusarium* keratitis associated with use of a contact lens solution. *JAMA* 296, 953–963.

Clear, R., Patrick, K., y Gaba, D. (2000). Prevalence of fungi and fusariotoxins on barley seed from western Canada, 1995 to 1997. *Can. J. Plant. Pathol* 22, 44– 50.

Cribier, B., Baskshi, R. (2004). Terbinafine in the treatment of onychomycosis: a review of its efficacy in high-risk populations and in patients with nondermatophyte infections. *Br. J. Dermat* 150,414-420.

Del Palacio-Herranz, A., y García-Bravo, M. (1993). Onicomycosis. En Torres Rodríguez, J.M., del Palacio-Hernanz, A., Guarro Artigas, J., Negroni-Briz, R., Pereiro-Miguens, M. (Eds) .*Micología Médica*. Barcelona, Masson. pp 65-73.

Demeke, T., Randy, M., Patrick, S., y Gaba, D. (2005). Species-specific PCR-based assays for the detection of *Fusarium* species and a comparison with the whole seedagar plate method and trichothecene analysis. *International Journal of Food Microbiology* 103, 271–284.

Dignani, M.C., y Anaissie, E. (2004). Human fusariosis. *Clin. Microbiol. Infect.* 10 (Supple1), 67-75.

Dornbusch, H., Buzina, W., Richard, C. (2005). *Fusarium verticillioides* Abscess of the Nasal Septum in an Immunosuppressed Child: Case Report and Identification of the Morphologically Atypical Fungal Strain. *J. Clin. Microbiol* 43 (4), pp 1998–2001.

Drake, L., Sher, R., Smith, E. (1998). Effect of onychomycosis on quality of life. *J. Am. Acad. Derm* 38, 702-4.

Dursun, D., Fernandez, V., Millar, D., y Alfonso, E. (2003). Advanced *Fusarium* keratitis progressing to endophthalmitis. *Cornea* 22, 300–303.

Elewski, B. (1997). Onychomycosis: pathogenesis, diagnosis and management. *Clin. Microbiol. Rev* 11, 415-429.

English, M.P. (1968). Invasion of the skin by filamentous non-dermatophyte fungi. *British. J. Derm* 80, 282.

English, M.P. (1973). Comment: nails and fungi. *Br. J. Dermatol* 94, 697-701.

Escobar, M., y Carmona-Fonseca, J. (2003). Onicomycosis por hongos ambientales no dermatofíticos. *Rev. Iberoam. Micol* 20, 6-10.

Ferrer, C., Alio, J., Rodríguez, A., Andreu, M., y Colom, F. (2005). Endophthalmitis caused by *Fusarium proliferatum*. *J. Clin. Microbiol.* 43, 5372–5375.

Filipello, V., Fusconi, A., y Querio, F. (2000). *Scopulariopsis brevicaulis*: a Keratinophilic or Keratinolytic fungus?. *Mycoses* 43, 281-292.

Garg, A., Venkatesh, V., Singh, K., Pathak, K., Kaushal, G. (2004). Onychomycosis in central India: a clinicoetiologic correlation. *Int. J. Dermatol* 43, 498-502.

Ghosh, A., Maity, P., Hemashettar, B., Sharma, V., y Chakrabarti, A. (2002). Physiological characters of *Sporothrix schenckii* isolaten. *Mycoses* 45, 449-454.

- Gianni, C., Cerri, A., y Crosti, A. (2000). Non-dermatophytic onychomycosis. An underestimated entity? A study of 51 cases. *Mycoses* 43, 29-33.
- Gopinathan, U., Garg, P., Fernandez, M., Sharma, S., Athmanathan, S., y Rao, GN. (2002). The epidemiological features and laboratory results of fungal keratitis: a 10-year review at a referral eye care center in South India. *Cornea*. 21, 555–9.
- Gross, N., Salas, I., y Carrillo, P. (2004). Manual de procedimientos en micología médica. Universidad de Costa Rica. Facultad de Microbiología.
- Guarro, J., Nucci, M., Akiti, T., Gené, J., Barreiro, M., y Gonc, R. (2000). Fungemia due to *Fusarium sacchari* in an immunosuppressed patient. *J. Clin. Microbiol* 38, 419-42.
- Guarro, J., y Gene, J. (1995). Opportunistic fusarial infections in humans. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis* 14, 741–754.
- Guého, E., Smith, M., Hoog, G.S., Billongrand, G., Christen, R., y Batenburg-van der Vegte, W.H. (1992). Contributions to a revision of the genus *Trichosporon*. *Antonie van Leeuwenhoek* 61, 289-316.
- Gupta, A., Gregurek-Novak, T., Konnikov, K., Lynde, C., Hofstader, S., y Summerbell, R. (2001). Itraconazole and terbinafine treatment of some nondermatophyte molds causing onychomycosis of the toes and a review of the literature. *J. Cut. Med. Surg* 5, 206-210.
- Gupta, A.K., Baran, R., & Summerbell, R.C. (2000). *Fusarium* infection of the skin. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 13, 121-128.
- Hiemenz, J.W., Kennedy, B., y Kwon-Chung, K.J. (1990). Invasive fusariosis associated with an injury by a stingray barb. *J. Med. Vet. Mycol* 28, 209–13.
- Hoffman, H., y Rathbun R. (2002). Review of the safety and efficacy of voriconazole. *Expert. Opin. Invest. Drugs* 11, 409–412.

Ibrahim, A.S., Mirbod, F., Filler, S.G., Banno, Y., Cole, G.T., Kitajima, Y. (1995). Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 63, 1993-1998.

Järv, H., Naaber, P., Kaur, S. (2004). Toenail onychomycosis in Estonia. *Mycoses* 47, 57–61.

Jensen, T., Gahrn-Hansen, B., Arendrup, M., y Bruun, B. (2004). *Fusarium* fungaemia in immunocompromised patients. *Clin. Microbiol. Infect* 10, 499–501.

Joish, V.N., y Armstrong, E.P. (2001). Which antifungal agent for onychomycosis? *Pharmacoeconomics* 19, 983-1002.

Kovacicova, G., Spanik, S., Kunova, A. (2001). Prospective study of fungaemia in a single cancer institution over a 10-years period: aetiology, risk factors, consumption of antifungal and outcome in 140 patients. *Scand. J. Infect. Dis* 33, 367–374.

López-Jodra, O., y Torres-Rodríguez, J. (1999). Especies fúngicas poco comunes responsables de onicomycosis. *Rev Iberoam Micol* 16, S11-S15.

López-Jodra, O., y Torres-Rodríguez. (1999). Especies fúngicas poco comunes responsables de onicomycosis. *J. Rev. Iberoam. Micol* 16, 11-15.

Macfaddin, J. (2004), *Pruebas Bioquímicas para la identificación de Bacterias de importancia clínica*. Tercera edición. Edit. Médica Panamericana, pp. 254-270.

Marín, G. (1991). *Diagnóstico de las dermatofitosis*. Ed. Universidad de Costa Rica. San José. C.R.

Mayer, C. (1953). Endemic panmyelotoxicosis in the Russian grain belt. Part one: the clinical aspects of Alimentary Toxic Aleukia (ATA), a comprehensive review. *Mil. Surg* 113, 173–89.

Mazen, B., Khatib, A., Todd, K., Vinutha Kumar. (1988). *Fusarium* Osteomyelitis of the Foot in a Patient with Diabetes mellitus. The emerging role of *Fusarium* infections in patients with cancer. *Medicine* 67, 77–83.

Mejía, M. (1997). Tratamientos de las onicomicosis. En: Carmona-Fonseca, J.(Ed.) Tópicos de Infectología. Medellín, Universidad de Antioquia, pp. 135-143.

Monzón, A., y Rodríguez, J. (2002). Infecciones causadas por el género *Fusarium*. Servicio de Micología. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda. España.

Naglik, J.R., Challacombe, S.J., y Hube, B. (2003). *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 400-428.

Naiker, S., y Odhav, B. (2004). Mycotic keratitis: profile of *Fusarium* species and their mycotoxins. *Mycoses* 47, 50–56.

Nature Publishing Group. (2003). Successful treatment of disseminated fusariosis Bone Marrow Transplantation. 31, 411–412.

Nelson, P., Plattner, R., Shackelford, D., y Desjardins, A. (1991). Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* strains from various substrates and geographic areas. *Appl. Environ. Microbiol* 57, 2410–2412.

Nelson, P.E., Dignani, M.C., y Anaissie, E.J. (1994). Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clin. Microbiol. Rev* 7, 479–504.

Nomenclatura de las enfermedades fúngicas. (1992). En: Informe y recomendaciones del Subcomité de la Sociedad Internacional de Micología Humana y Animal (SIMHAISHAM) 1991. *Rev. Iberoam. Micol* 9, 4-34.

Nucci, M., Anaissie, E., Queiroz-Telles, F., Martins, C. (2003). Outcome predictors of 84 patients with hematologic malignancies and *Fusarium* infection. *Cancer* 98, 315-319.

Nucci, M., y Anaissie, E.(2007). *Fusarium* Infections in Immunocompromised Patients *Clinical Microbiology Reviews* 20 (4), 695–704.

Nuovo, M.A., Simmonds, J.E., Chacho, M.S., y McKittrick, J.C. (1988). *Fusarium solani* osteomyelitis with probable nosocomial spread. *Am. J. Clin. Pathol* 90,738-41.

Okafor, J. I., & Gugnani, H. C. (1990). Lipase activity of *Basidiobolus* and *Conidiobolus* species. *Mycoses* 33, 81–85.

Okafor, J.I. (1994). Purification and characterization of protease enzymes of *Basidiobolus* and *Conidiobolus* species. *Mycoses* 37, 265–269.

Olivares, R., Alfaro, M., Díaz, M. y Thompson, L. (2005). Fusariosis diseminada por *Fusarium oxysporum* en un paciente adulto con leucemia mieloide aguda y neutropenia severa febril. *Rev. Chil. Infec* 22(4), 356-360.

Olivas. E., Alarcón, L. (2004). Manual de prácticas de Microbiología Básica y Microbiología de Alimentos. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Instituto de Ciencias Biomédicas. Editorial de la UACJ, pp. 36.

Ooka, J., y Kommedahl, T. (1977). Wind and rain dispersal of *Fusarium moniliforme* in corn fields. *Phytopathology* 67, 1023–6.

Opinion of the Scientific Committee on Food on *Fusarium* Toxins (2001). part 5: T-2 Toxin and HT-2 Toxin. (2001). European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General. SCF/CS/CNTM/MYC/25 Rev 6 Final.

Ortopeda, M., Guarro, J., Madrid, M. (2004). *Fusarium oxysporum* as a Multihost Model for the Genetic Dissection of Fungal Virulence in Plants and Mammals. *Infect. Immunity* 72, 1760-17663.

Padilla-Desgarenes, M., (2000). Diagnóstico diferencial en onicomicosis. Pfizer S.A. de C.V. México.

Page, J., Friedlander, G., y Dockery, G. (1982). Postoperative *Fusarium* osteomyelitis. *J. Foot. Surg* 21, 174-176.

Pauw, B., y Meunier, F. (1999). The challenge of invasive fungal infection. *Chemotherapy* 45(Suppl 1), 1-14.

Pineda de Mora, Y., Rodríguez, V. (1990). Producción de colicinas, hemolisinas y resistencia a los antimicrobianos en cepas de *Escherichia coli* de cerdos con diarrea. *Veterinaria Tropical* 15, 87-98.

Raad, I., Tarrand, J., Hanna, H. (2002). Epidemiology, molecular mycology, and environmental sources of *Fusarium* infection in patients with cancer. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol* 23, 532-537.

Rezai, K., Elliott, D., Plous, O., Vazquez, J., y Abrams, G. (2005). Disseminated *Fusarium* infection presenting as bilateral endogenous endophthalmitis in a patient with acute myeloid leukemia. *Arch. Ophthalmol.* 123, 702-703.

Rippon, J. (1992). *Micología Médica. Hongos y actinomicetes patógenos*. 3º edición. Ed. Interamericana MacGarw-Hill. México.

Roberts, D., Taylor, W., Boyle, J. (2003). Guidelines for treatment of onychomycosis. *Br. J. Dermatol* 148, 402-410.

Rodríguez, E., Gamboa, M., Hernández, F., y García, J. (2004). Manual de laboratorio de bacteriología general. 2da Edición. Universidad de Costa Rica. Facultad de Microbiología.

Salas, I., (2005). Onicomycosis: una visión actual de un viejo problema. Rev. Col. Microbiólogos 1, (5), 5-7.

Salas, I., y Chávez, O. (2004). Agentes de onicomycosis en Costa Rica. Rev. Cost. Cien. Med. 25 (3-4), 43-47.

Santamaría, M., Roselló, J. (2003). Efecto de la actividad de agua y de la temperatura sobre el comportamiento de *Penicillium oxalicum* frente a *Fusarium oxysporum*. Rev. Iberoam. Micol. 20, 154-159.

Seebacher, C., Brasch, J., Abeck, D., Cornely, O. (2007). Onychomycosis. Tietz Guidelines of the German Society of Dermatology (Deutsche Dermatologische Gesellschaft) and German-speaking Mycological Society (Deutschsprachige Mykologische Gesellschaft). Mycoses 50, 21–327.

Shoham, S., y Levitz, S. (2005). The immune response to fungal infections. Br. J. Haematol 129, 569–582.

Sugiera, Y., Barr, J., Barr, D. (1999). Physiological characteristics and mycotoxins of human clinical isolates of *Fusarium* species. Mycological Res. 103, 1462–1468.

Summerbell, R.C. (2001). Respiratory tract infections caused by indoor fungi. In B. Flannigan, R. A., Samson and J. D. Miller (ed.), Microorganisms in home and indoor work environments. Taylor and Francis Press, London, England, pp. 195–215.

Svejgaard, E., y Nilsson, J. (2004). Onychomycosis in Denmark: prevalence of fungal nail infection in general practice. Mycoses 47,131-135.

Virgili, A., Zampino, M., y Mantovani, L. (2002). Fungal skin in organ transplant recipients. *Am. Clin. Dermatol* 3, 19-35.

Walsh, T.J., Hiemenz, J.W., y Anaissie, E. (1996). Recent progress and current problems in treatment of invasive fungal infections in neutropenic patients. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 10, 365–400.

Willis, A. (1969) *Clostridia of Wound Infection*. London: Butterworths.

Anexos

Anexo 1. Agar Papa Glucosa

<i>Ingredientes</i>	<i>g/litro</i>
Papas (blancas) cortadas	200.0
Glucosa	20.0
Agar	15.0
Agua destilada	1000.0 mL

pH= 5.4-5.8

Cocinar las papas en agua por una hora a fuego bajo. Filtrar con gasa y luego mezclar 4.0 mL de la infusión con la glucosa, el agar y el agua destilada. Dejar en reposo por 15 minutos y llevar a ebullición hasta disolver por completo. Vierta en tubos de ensayo y autoclave a 121°C por 15 minutos. Deje enfriar los tubos en posición inclinada.

Anexo 2. Base para Agar Sangre

<i>Ingredientes</i>	<i>g/litro</i>
Infusión de corazón de buey	500.0
Triptosa	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Agar	15.0

Autoclavar el medio, se deja enfriar a 45-50°C, se agrega sangre desfibrinada humana, de conejo u ovina a concentración final de 5-10% y mezclar. Distribuir en los recipientes a utilizar.

Anexo 3. Agar Caseína

<i>Ingredientes</i>	<i>g/litro</i>
Leche descremada en polvo	40.0
Extracto de levadura	5.0
Agar	15.0
Púrpura de Bromocresol	1.0 al 6%
Agua	1000.0 mL

pH= 7.0

Al agar Fundido y enfriado a 50°C agregar la leche previamente autoclavada a 115°C por 15 minutos y posteriormente los demás ingredientes.

Anexo 4. Agar Yema de Huevo

Ingredientes

Agar Sabouraud enriquecido con 1M de Cloruro de Sodio y CaCl₂ 0,005M.

Se autoclava el medio, enfriar a 50°C, finalmente agregar yema de huevo al 2%. Depositar 4,5 mL en placas de petri de 60mm de diámetro.

Anexo 5. Agar Gelatina Nutritiva

<i>Ingredientes</i>	<i>g/litro</i>
Peptona	5.0
Extracto de carne	3.0
Gelatina	120.0
Agua destilada	1000.0 mL

pH= 6.8-7.2

Disolver los componentes en agua destilada. Autoclavar a 115°C por 10 minutos.

Anexo 6. Agar Urea de Christensen

<i>Ingredientes</i>	<i>g/litro</i>
Peptona	1.0
Glucosa	1.0
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato monopotásico	2.0
Urea	20.0
Rojo de fenol	0.012
Agua destilada	100 mL
Agar	15.0
Agua destilada	900 mL

pH= 6,7-6,9

Disolver y esterilizar la base por filtración. Autoclavar el agar, enfriar a 50°C y adicionar asepticamente los 100 mL de base; mezclar y distribuir en tubos estériles.

Anexo 8. Medio queratínico de Wawrzkievicz***Queratina******Ingredientes***

Plumas de gallina

DMSO

Acetona

Amortiguador de Fosfatos

Se colocan las plumas de gallina al 1,2% en DMSO, se calienta a 100°C por 2 horas.

Se precipitan las proteínas con 2 volúmenes de acetona por 1 volumen de proteína.

El precipitado caseoso se resuspende en 0.1M amortiguador de fosfatos hasta un pH final de 8.0

Medio de Wawrzkievicz (0.06%)

<i>Ingredientes</i>	<i>g/litro</i>
Agar	1.5
MgSO ₄ H ₂ O	0.5
FeSO ₄ *7H ₂ O	0.01
ZnSO ₄ *7H ₂ O	0.005
Queratina de plumas al 0.06%	

Medio de Wawrzkievicz (0.6%)

<i>Ingredientes</i>	<i>g/litro</i>
Agar	1.5
MgSO ₄ H ₂ O	0.5
FeSO ₄ *7H ₂ O	0.01
ZnSO ₄ *7H ₂ O	0.005
Queratina de plumas al 0.6%	

Medio de Wawrzkievicz (6.0%)

<i>Ingredientes</i>	<i>g/litro</i>
Agar	1.5
MgSO ₄ H ₂ O	0.5
FeSO ₄ *7H ₂ O	0.01
ZnSO ₄ *7H ₂ O	0.005
Queratina de plumas al 6.0%	

Anexo 9.

Cuadro 2. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de las cepas de *Fusarium* spp.

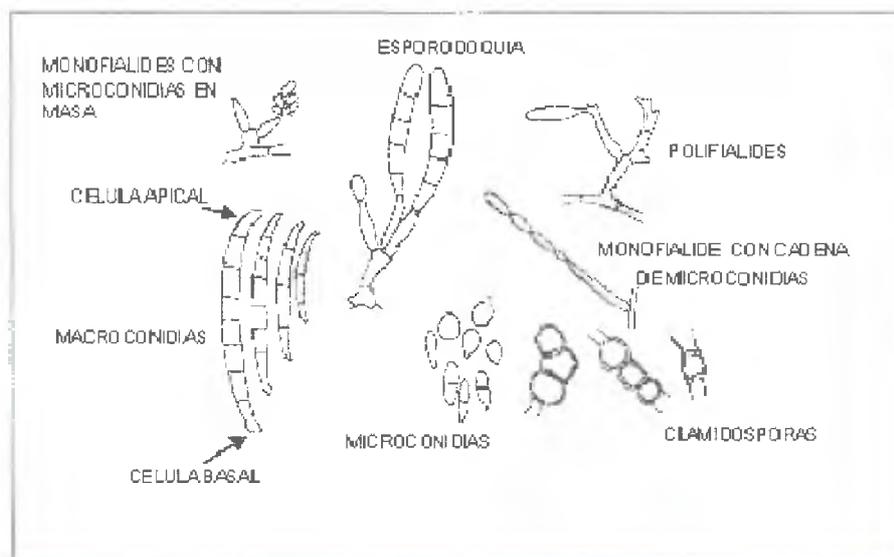
Aislamiento	25°C	30 °C	37°C	40°C	42°C
FU-16	AB	AB	PC	NC	NC
FU-20	AB	AB	PC	NC	NC
FU-21	AB	AB	NC	NC	NC
FU-22	AB	AB	PC	NC	NC
FU-23	AB	AB	PC	NC	NC
FU-34	AB	AB	NC	NC	NC
FU-39	AB	AB	PC	NC	NC
FU-40	AB	AB	PC	NC	NC
FU-41	AB	AB	PC	NC	NC
FU-42	AB	AB	NC	NC	NC
FU-43	AB	AB	NC	NC	NC
FU-44	AB	AB	NC	NC	NC
FU-45	AB	AB	AB	NC	NC
FU-46	AB	AB	AB	NC	NC
FU-47	AB	AB	AB	NC	NC
FU-49	AB	AB	NC	NC	NC
FU-50	AB	AB	AB	NC	NC
FU-52	AB	AB	AB	NC	NC
FU-53	AB	AB	AB	NC	NC
FU-54	AB	AB	AB	NC	NC
FU-55	AB	AB	PC	NC	NC
FU-56	AB	AB	PC	NC	NC
FU-58	AB	AB	NC	NC	NC
FU-59	AB	AB	AB	NC	NC
FU-60	AB	AB	AB	NC	NC
FU-61	AB	AB	NC	NC	NC
FU-62	AB	AB	PC	NC	NC
FU-63	AB	AB	PC	NC	NC
FU-66	AB	AB	PC	NC	NC
FU-67	AB	AB	PC	NC	NC
FU-68	AB	AB	NC	NC	NC
FU-69	AB	AB	NC	NC	NC
FU-70	AB	AB	NC	NC	NC
FU-71	AB	AB	PC	NC	NC
FU-72	AB	AB	AB	NC	NC
FU-73	AB	AB	NC	NC	NC
FU-74	AB	AB	AB	NC	NC
FU-75	AB	AB	NC	NC	NC
FU-76	AB	AB	AB	NC	NC

FU-79	AB	AB	AB	NC	NC
FU-80	AB	AB	NC	NC	NC
FU-83	AB	AB	AB	NC	NC
FU-84	AB	AB	AB	NC	NC
FU-85	AB	AB	PC	NC	NC
FU-86	AB	AB	AB	NC	NC
FU-87	AB	AB	NC	NC	NC
FU-88	AB	AB	AB	NC	NC
FU-89	AB	AB	NC	NC	NC
FU-90	AB	AB	AB	NC	NC
FU-92	AB	AB	PC	NC	NC

AB: Abundante crecimiento
 NC: No crece
 PC: Poco crecimiento

Anexo 10.

Figura 7. Representación esquemática de las características morfológicas microscópicas del género *Fusarium*.



Anexo 11.

Cuadro 3. Resultados obtenidos para cada uno de los aislamientos de *Fusarium* spp. según prueba positiva.

Aislamiento	Crecimiento a 37°C±1°C	Diámetro en cm del halo en Agar Caseína	Presencia de β hemólisis en Agar Sangre
FU-16	PC	-	-
FU-20	PC	-	√
FU-21	NC	-	-
FU-22	PC	-	-
FU-23	PC	-	-
FU-34	NC	2,1	√
FU-39	PC	1,5	√
FU-40	PC	-	-
FU-41	PC	2,1	√
FU-42	NC	-	-
FU-43	NC	3,8	√
FU-44	NC	-	-
FU-45	AB	1,5	√
FU-46	AB	-	-
FU-47	AB	-	-
FU-49	NC	3,8	√
FU-50	AB	-	-
FU-52	AB	-	-
FU-53	AB	-	-
FU-54	AB	-	-
FU-55	PC	-	-
FU-56	PC	-	-
FU-58	NC	-	-
FU-59	AB	3,6	√
FU-60	AB	-	-
FU-61	NC	3,2	√
FU-62	PC	2,2	√
FU-63	PC	-	-
FU-66	PC	-	-
FU-67	PC	-	-
FU-68	NC	-	-
FU-69	NC	2,7	√
FU-70	NC	-	-
FU-71	PC	-	-
FU-72	AB	1,9	√
FU-73	NC	-	-

FU-74	AB	-	-
FU-75	NC	2,9	√
FU-76	AB	-	-
FU-79	AB	3,9	√
FU-80	NC	2,6	√
FU-83	AB	-	-
FU-84	AB	2,7	√
FU-85	PC	-	-
FU-86	AB	-	-
FU-87	NC	3,1	√
FU-88	AB	-	-
FU-89	NC	-	-
FU-90	AB	-	-
FU-92	PC	2,7	√

Nota: Todos los aislamientos son ureasa positiva en Agar Urea de Christensen