



**SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y FILOGENIA MOLECULAR DE  
ESPECIES DEL GÉNERO FUSARIUM DE INTERÉS CLÍNICO**  
**Mónica Azor Heras**

Dipòsit Legal: T-1368-2011

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tesisenred.net](http://www.tesisenred.net)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

DEPARTAMENT DE CIÈNCIES MÈDIQUES BÀSIQUES

SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y  
FILOGENIA MOLECULAR DE ESPECIES  
DEL GÉNERO *FUSARIUM* DE INTERÉS CLÍNICO

Mónica Azor Heras

Tesis doctoral

2009

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y FILOGENIA MOLECULAR DE ESPECIES DEL GÉNERO FUSARIUM DE INTERÉS CLÍNICO

Mónica Azor Heras

DL: T.1368-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y FILOGENIA MOLECULAR DE ESPECIES DEL GÉNERO FUSARIUM DE INTERÉS CLÍNICO

Mónica Azor Heras

DL: T.1368-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y FILOGENIA MOLECULAR DE ESPECIES DEL GÉNERO FUSARIUM DE INTERÉS CLÍNICO

Mónica Azor Heras

DL: T.1368-2011

Mónica Azor Heras

SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y FILOGENIA MOLECULAR DE  
ESPECIES DEL GÉNERO *FUSARIUM* DE INTERÉS CLÍNICO

TESIS DOCTORAL

Dirigida por los Dres. Josep Guarro, Josepa Gené y Josep Cano

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques  
Unitat de Microbiologia



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Reus

2009

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y FILOGENIA MOLECULAR DE ESPECIES DEL GÉNERO FUSARIUM DE INTERÉS CLÍNICO

Mónica Azor Heras

DL: T.1368-2011



UNIVERSITAT  
ROVIRA I VIRGILI

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques  
Facultat de Medicina i Ciències de la Salut  
Universitat Rovira i Virgili

Josep Guarro Artigas, Catedrático de Microbiología de la *Facultat de Medicina i Ciències de la Salut*, José F. Cano Lira, Catedrático de la Escuela Universitaria de la *Facultat d'Enologia* y Josepa Gené Díaz, Profesora Titular de Universidad de la *Facultat de Medicina i Ciències de la Salut*, de la *Universitat Rovira i Virgili*.

CERTIFICAMOS:

Que la presente Tesis Doctoral titulada "SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y FILOGENIA MOLECULAR DE ESPECIES DEL GÉNERO *FUSARIUM* DE INTERÉS CLÍNICO" presentada por Mónica Azor Heras, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el *Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques* de esta Universidad y que cumple los requerimientos para la obtención del título de Doctora.

Y para que se tenga conocimiento y tenga los efectos que corresponda, firmamos este certificado.

Reus, 20 de Enero de 2009

Dr. Josep Guarro

Dr. Josep Cano

Dra. Josepa Gené

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y FILOGENIA MOLECULAR DE ESPECIES DEL GÉNERO FUSARIUM DE INTERÉS CLÍNICO

Mónica Azor Heras

DL: T.1368-2011

La realización del presente trabajo se ha llevado a cabo gracias al soporte económico recibido de las siguientes Instituciones:

Beca predoctoral de la Universitat Rovira i Virgili  
Ministerio de Ciencia y Tecnología (España), con las becas CGL 2005-07394/BOS y  
CGL 2007-65669/BOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y FILOGENIA MOLECULAR DE ESPECIES DEL GÉNERO FUSARIUM DE INTERÉS CLÍNICO

Mónica Azor Heras

DL: T.1368-2011

## AGRADECIMIENTOS

La presente tesis doctoral ha sido realizada gracias a la ayuda y al apoyo de muchas personas, algunas de las cuales quizás no estén incluidas aquí. A todas ellas, gracias.

Al Dr. Josep Guarro, por la dirección de esta tesis doctoral, así como por darme la oportunidad de realizarla dentro de su equipo de investigación, y por confiar en mí y en mi trabajo en los momentos en que yo misma no lo hacía.

Al Dr. Josep Cano, por la codirección de esta tesis doctoral, y por su disponibilidad y atención para resolver cualquier duda, dar unas palabras de ánimo o un toque de atención, según hiciera falta.

A la Dra. Josepa Gené, por la codirección de esta tesis doctoral, por el esfuerzo y la dedicación en las correcciones de la presente memoria, y por su ejemplo de profesionalidad, que durante todo este tiempo me han llevado a esforzarme más y a superarme a mí misma.

Al Dr. Francesc Xavier Pastor, por su ayuda para resolver mis dudas en relación a conceptos médicos pero, sobretodo, por su simpatía y apoyo.

Al Dr. Alberto Stchigel, por ser mi enciclopedia particular para cualquier consulta, incluso más allá del mundo de la micología, y por su cercanía y cordialidad.

A la Dra. M<sup>a</sup> José Figueres y los Dres. Emili Mayayo y Xavier Capilla, por su valiosa ayuda en diferentes momentos de la realización de esta tesis.

Al Dr. Gilgado y a las Dras. Marimon y Serena (el Félix, la Rita y la Carol), por haber compartido conmigo todos estos años juntos, los buenos y malos momentos, ¡os he echado de menos!. A ti, Félix, gracias por tu compañerismo y por tu disponibilidad, siempre, para explicar y ayudar en lo que fuese. A la Rita, gràcies per compartir amb mi tantes xerrades de despatx, les he trobat a faltar. Y a los tres, gracias por vuestra amistad.

A Marçal, Mar y Enrique, gracias por estar ahí, sobretodo estos últimos meses, compartiendo vuestra amistad y esos ratos de charla y risas en el desayuno.

A Hugo, Haybrig y Eduardo, por recordarme la ilusión de los primeros tiempos y por vuestra compañía y apoyo en este tiempo que hemos compartido.

A Carme, Núria y Cati, nuestro equipo técnico, por vuestra ayuda en el trabajo de laboratorio de esta tesis y también por vuestra amistad.

Y gracias a todos los compañeros: Mabel, por estar siempre disponible para resolver cualquier duda y por tu sentido del humor; Dania, Kendra, Anabel, Luis, Mery, Carolina, Ingrid, Valentina, Roxana, Claudia, Jesica, si me olvido de alguien que se incluya en la lista, porque todos vosotros habéis formado parte de esta etapa, gracias a todos.

No quiero dejar de mencionar a los compañeros que me recibieron al principio: Montse, Lara, Arantxa, Belkys, Núria Argany, Antonio, Gisela, Josepa, Clara, Fredi; ni a aquellas personas que, aunque brevemente, han compartido con nosotros un pedacito de su tiempo: Josep, Alejandra, Michaela, la Dra. Mery Mathews, el Dr. Shivaprakash, el Dr. Julio Mena...

Por último, quería dar las gracias al Dr. Albert Bordons, mi profesor de Microbiología durante la carrera de Bioquímica, que me transmitió su entusiasmo por esta materia, siendo el primer paso del camino que ahora concluye.

...he ido dejando los agradecimientos para el final, para el último momento, con la fecha de entrega encima, sin ser capaz de ponerme a ello. Y ahora que ya están escritos he comprendido el porqué: porque también son una despedida y, a pesar de la alegría de ver logrado tu objetivo, al que has dedicado tanto esfuerzo, ilusión y tiempo, te acompaña la tristeza de terminar una bonita etapa. La recordaré con cariño, os echaré de menos...

## ÍNDICE

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y FILOGENIA MOLECULAR DE ESPECIES DEL GÉNERO FUSARIUM DE INTERÉS CLÍNICO

Mónica Azor Heras

DL: T.1368-2011

---

<b>Siglas y símbolos.....</b>	<b>v</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. El género <i>Fusarium</i> y su interés en clínica.....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Taxonomía y revisión histórica del género.....	2
1.1.2. Caracteres fenotípicos.....	9
1.1.2.1. Morfología.....	9
1.1.2.2. Fisiología.....	14
1.1.3. Importancia clínica.....	16
<b>1.2. Antifúngicos y tratamiento de las infecciones por <i>Fusarium</i>.....</b>	<b>22</b>
1.2.1. Tipos de antifúngicos y mecanismos de acción.....	22
1.2.2. Métodos de estudio de la sensibilidad antifúngica <i>in vitro</i> .....	26
1.2.3. Tratamiento de las fusariosis.....	29
<b>1.3. Taxonomía molecular.....</b>	<b>30</b>
1.3.1. Concepto de especie.....	31
1.3.2. Concepto de concordancia filogenética.....	34
1.3.3. Filogenia molecular.....	36
1.3.3.1. Métodos de inferencia filogenética.....	37
1.3.3.2. Métodos para determinar la fiabilidad de las relaciones filogenéticas inferidas.....	41
1.3.3.3. Genes utilizados.....	41
<b>Resumen.....</b>	<b>45</b>
<b>2. INTERÉS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>49</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>55</b>
<b>3.1. Cepas estudiadas.....</b>	<b>55</b>
3.1.1. Origen y conservación.....	55
<b>3.2. Estudio fenotípico.....</b>	<b>63</b>
3.2.1. Estudio macroscópico.....	63
3.2.2. Estudio microscópico.....	65
3.2.3. Estudio fisiológico.....	67
3.2.3.1. Tasa de crecimiento a diferentes temperaturas.....	67

3.2.3.2. Asimilación de azúcares y fuentes de nitrógeno.....	69
3.2.3.2.1. Compuestos estudiados.....	69
3.2.3.2.2. Preparación de las microplacas.....	70
3.2.3.2.3. Preparación del inóculo.....	72
3.2.3.3. Crecimiento a diferentes concentraciones de NaCl, MgCl <sub>2</sub> y cicloheximida.....	73
3.2.3.4. Otras pruebas.....	73
<b>3.3. Estudio molecular.....</b>	<b>75</b>
3.3.1. Selección de genes.....	75
3.3.2. Extracción de ADN.....	76
3.3.3. Procesos de amplificación y secuenciación.....	78
3.3.4. Alineación de secuencias y análisis filogenético.....	82
3.3.5. Depósito de secuencias.....	83
<b>3.4. Estudio de sensibilidad <i>in vitro</i> a los antifúngicos.....</b>	<b>84</b>
3.4.1. Antifúngicos utilizados.....	85
3.4.2. Metodología.....	85
3.4.2.1. Preparación de las microplacas.....	86
3.4.2.2. Preparación del inóculo.....	88
3.4.2.3. Lectura e interpretación de los resultados.....	89
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>93</b>
<b>4.1. Resultados obtenidos para los aislados de <i>Fusarium solani</i>.....</b>	<b>93</b>
4.1.1. Estudio molecular.....	93
4.1.1.1. Selección de genes.....	93
4.1.1.2. Análisis filogenético individual.....	94
4.1.1.3. Análisis filogenético conjunto.....	98
4.1.2. Caracterización fenotípica.....	100
4.1.2.1. Estudio macroscópico.....	100
4.1.2.2. Estudio microscópico.....	102
4.1.2.3. Estudio fisiológico.....	108
4.1.3. Resistencia antifúngica <i>in vitro</i> de diferentes grupos genéticos del complejo de especies <i>Fusarium solani</i> .....	111

---

4.2. Sensibilidad antifúngica <i>in vitro</i> y caracterización molecular de aislados clínicos de <i>Fusarium verticillioides</i> ( <i>F. moniliforme</i> ) y <i>Fusarium thapsinum</i> .....	123
4.3. Elevada diversidad genética y pobre respuesta <i>in vitro</i> a los antifúngicos de cepas clínicas de <i>F. oxysporum</i> .....	135
4.4. Especies menos frecuentes del género <i>Fusarium</i> de interés clínico: correlación entre la identificación morfológica y molecular y sensibilidad antifúngica.....	149
5. DISCUSIÓN.....	171
5.1. Taxonomía y filogenia molecular.....	171
5.2. Estudios de sensibilidad antifúngica <i>in vitro</i> .....	179
6. CONCLUSIONES.....	189
7. BIBLIOGRAFÍA.....	193
ANEXO I	
ANEXO II	

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y FILOGENIA MOLECULAR DE ESPECIES DEL GÉNERO FUSARIUM DE INTERÉS CLÍNICO

Mónica Azor Heras

DL: T.1368-2011

---

<b>ABC</b>	Albaconazol
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNr</b>	Ácido desoxirribonucleico ribosómico
<b>AFG</b>	Anidulafungina
<b>AFLP</b>	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> (Polimorfismos de longitud de fragmentos de amplificación)
<b>AMB</b>	Anfotericina B
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNr</b>	Acido ribonucleico ribosómico
<b>ARS/NRRL</b>	<i>Agricultural Research Service</i>
<b>BLAST</b>	<i>Basic Local Alignment and Search Tool</i>
<b>BT2</b>	Región del gen de la $\beta$ -tubulina
<b>CAL</b>	Gen de la calmodulina
<b>CAS</b>	Casporfungina
<b>CBS</b>	<i>Centraalbureau voor Schimmelcultures</i>
<b>CHS-1</b>	Gen de la quitina sintasa 1
<b>CLSI</b>	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
<b>CMI</b>	Concentración Mínima Inhibitoria
<b>CML</b>	Concentración Mínima Letal
<b>dNTP</b>	Deoxirribonucleótido trifosfato
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>EF-1<math>\alpha</math></b>	Gen del factor de elongación 1 $\alpha$
<b>EMBL</b>	<i>European Molecular Biology Laboratory</i> (base de datos <i>online</i> )
<b>ETS</b>	Regiones espaciadoras externas en el ADNr
<b>5-FC</b>	Flucitosina o 5-fluorocitosina
<b>FLC</b>	Fluconazol
<b>FMR</b>	<i>Facultat de Medicina i Ciències de la salut de Reus</i>
<b>g</b>	Gramo
<b>GCPSR</b>	<i>Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition</i> (Reconocimiento de especies filogenéticas por concordancia genealógica)
<b>IC</b>	Índice de consistencia
<b>IGS</b>	Regiones espaciadoras intergénicas en el ADNr
<b>IH</b>	Índice de homoplasia
<b>ILD</b>	<i>Incongruence Length Difference</i>
<b>IR</b>	Índice de retención
<b>ITC</b>	Itraconazol
<b>ITS</b>	Regiones espaciadoras internas en el ADNr
<b>KTC</b>	Ketoconazol

Siglas y símbolos

---

<b>L</b>	Litro
<b>LSU</b>	Subunidad larga del ADNr
<b>MEGA</b>	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
<b>MFG</b>	Micafungina
<b>MG</b>	Media Geométrica
<b>min</b>	Minuto
<b>mL</b>	Mililitro ( $10^{-3}$ L)
<b>mM</b>	Milimolar ( $10^{-3}$ M)
<b>MPT</b>	<i>Most Parsimonious Trees</i> (Árboles de máxima parsimonia)
<b>mtSSU</b>	Subunidad pequeña mitocondrial
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>NCCLS</b>	<i>National Committee for Clinical Laboratory</i>
<b>ng</b>	Nanogramo ( $10^{-9}$ g)
<b>nm</b>	Nanometro ( $10^{-9}$ m)
<b>OA</b>	Agar de harina de avena
<b>PAUP</b>	<i>Phylogenetic Analysis Using Parsimony</i>
<b>pb</b>	Pares de bases nucleotídicas
<b>PCA</b>	Agar con infusión de patata zanahoria
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en cadena de la polimerasa)
<b>PDA</b>	Agar patata dextrosa
<b>PHT</b>	<i>Partition Homogeneity Test</i>
<b>PSC</b>	Posaconazol
<b>RAPD</b>	<i>Random Amplified Polymorphism DNA</i> (Amplificación al azar de fragmentos polimórficos de ADN)
<b>RVC</b>	Ravuconazol
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SNA</b>	Agar sintético bajo en nutrientes
<b>SIDA</b>	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
<b>TBF</b>	Terbinafina
<b>TBR</b>	<i>Tree Bisection and Reconnection</i>
<b>TUB</b>	Región del gen de la $\beta$ -tubulina
<b>U</b>	Unidad de actividad enzimática
<b>UFC</b>	Unidad formadora de colonia
<b>UPGMA</b>	<i>Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic means</i>
<b>UTHSC</b>	<i>University of Texas Health Science Center</i>
<b>VRC</b>	Voriconazol
<b><math>\mu</math>L</b>	Micro litro ( $10^{-6}$ L)
<b><math>\mu</math>m</b>	Micrometro ( $10^{-6}$ m)

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y FILOGENIA MOLECULAR DE ESPECIES DEL GÉNERO FUSARIUM DE INTERÉS CLÍNICO

Mónica Azor Heras

DL: T.1368-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y FILOGENIA MOLECULAR DE ESPECIES DEL GÉNERO FUSARIUM DE INTERÉS CLÍNICO

Mónica Azor Heras

DL: T.1368-2011

## **INTRODUCCIÓN**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y FILOGENIA MOLECULAR DE ESPECIES DEL GÉNERO FUSARIUM DE INTERÉS CLÍNICO

Mónica Azor Heras

DL: T.1368-2011

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. EL GÉNERO *FUSARIUM* Y SU INTERÉS EN CLÍNICA

*Fusarium* Link ex Fries es un género anamórfico que actualmente está constituido por aproximadamente unas 70 especies (Leslie y Summerell, 2006). Son hongos muy comunes en áreas tropicales y regiones templadas y también se encuentran en desiertos, zonas alpinas y árticas donde son capaces de resistir condiciones extremas, en definitiva se trata de especies altamente cosmopolitas (Nelson *et al.*, 1994). La mayoría de las especies del género son organismos saprófitos que suelen colonizar sustratos vegetales, aunque muchas de ellas también son ampliamente conocidas por actuar como patógenas de plantas. De hecho son importantes agentes fitopatógenos que pueden afectar a numerosos cultivos de consumo humano (plátano, cereales, arroz, soja...), causando graves infecciones con serias repercusiones económicas para el sector agrícola a nivel mundial. Hacia la década de los años 70 se descubrió que también eran capaces de producir micotoxinas, metabolitos secundarios que pueden ocasionar serias intoxicaciones en animales y humanos (Marasas *et al.*, 1984).

En la actualidad, algunas de las especies de *Fusarium* también son conocidas como importantes patógenos oportunistas causando diversos tipos de patologías, tanto en el hombre como en otros animales (Guarro y Gené, 1995; Boutati y Anaissie, 1997; Pontón *et al.*, 2000). Su incidencia como agentes causales de infección en humanos se ha ido incrementando en las últimas décadas (Marr *et al.*, 2002; Husain *et al.*, 2003) y, aunque las especies más frecuentemente aisladas son *Fusarium solani*

(Mart.) Sacc., *Fusarium oxysporum* Schlechtendal y *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, en años recientes se ha observado un aumento del número de casos clínicos producidos por otras especies del género, tales como *Fusarium chlamydosporum* Wollenw. & Reinking, *Fusarium dimerum* Penz., *Fusarium napiforme* Marasas, P.E. Nelson & Rabie, *Fusarium nygamai* L.W. Burgess & Trimboli, *Fusarium proliferatum* (Matsush.) Nirenberg ex Gerlach & Nirenberg, *Fusarium sacchari* (E.J. Butler & Hafiz Khan) W. Gams, *Fusarium incarnatum* Berk. & Ravenel y *Fusarium thapsinum* Klittich, J.F. Leslie, P.E. Nelson & Marasas, entre algunas otras (de Hoog *et al.*, 2000).

#### 1.1.1. Taxonomía y revisión histórica del género

Desde hace tiempo en el género *Fusarium* se clasifican muchas de las formas asexuales pertenecientes a diversos géneros de ascomicetos de la familia Nectriaceae, orden Hypocreales (Rossman *et al.*, 1999). Según la revisión más reciente (Leslie *et al.*, 2006), los géneros teleomórficos que presentan a *Fusarium* como anamorfo son: *Albonectria* Rossman & Samuels, *Gibberella* Saccardo y *Haematonectria* Samuels & Nirenberg, aunque Rossman y colaboradores (1999) también incluye al género *Corallomycetella* Hennings. Sin embargo, O'Donnell (2000), basándose en un estudio molecular de la familia Nectriaceae, demostró que los géneros *Haematonectria* y *Neocosmospora* E. F. Smith no presentaban suficientes diferencias genéticas para considerarlos taxones diferentes, concluyendo por tanto que eran sinónimos. Según las normas del Código Internacional de Nomenclatura Botánica el nombre que prevalecería sería *Neocosmospora* al ser el género descrito en primer lugar.

Siguiendo los cánones de la taxonomía clásica, la clasificación de las especies del género *Fusarium* es una tarea compleja y no siempre se obtienen resultados concluyentes debido a que son hongos que presentan una gran variación en cuanto a sus características morfológicas, culturales y fisiológicas. Esta capacidad de variación explica en cierta medida el hecho de que las especies del género puedan colonizar nichos ecológicos muy diversos. Sin embargo, también es la razón por la que actualmente todavía no disponemos de un sistema de clasificación estable y consensuado (Nelson *et al.*, 1994).

En un principio, llegaron a contabilizarse cientos de especies de *Fusarium* ya que se describían en función del huésped donde se encontraban. Sin embargo, Wollenweber y Reinking (1935) realizaron una importante revisión del género, reduciendo el número de especies a 65, las cuales se agruparon en 16 secciones (Tabla 1) teniendo en cuenta la morfología de la colonia y los conidios. A su vez, estas especies incluían 55 variedades y 22 formas. Esta primera clasificación no resultó muy adecuada ya que las características morfológicas en las que se basaba la separación de las especies eran poco estables y variaban en función de las condiciones ambientales y del medio de cultivo utilizados. Más tarde, en 1940 y 1954, Snyder y Hansen redujeron a 9 el número de especies (Snyder y Hansen 1940, 1941, 1945 y 1954), de forma que, en general, cada una de ellas se correlacionaba con las secciones establecidas en el sistema anterior (Tabla 1). Pero en este caso, el sistema resultó ser excesivamente simple. El máximo exponente de esta simplificación lo tenemos en la especie *F. roseum* Link (1832), la cual pasó a agrupar 4 de las secciones anteriores.

## Introducción

Un claro reflejo de la controvertida taxonomía del género *Fusarium* es la publicación hasta la fecha de 10 propuestas de clasificación diferentes. El trabajo de revisión del género más reciente, publicado por Leslie y Summerell en 2006, incluye 70 especies, sin considerar las secciones indicadas anteriormente. En la Tabla 1 podemos observar la relación entre los sistemas de Wollenweber y Reinking (1935), Snyder y Hansen (1954) y el más reciente de Leslie y Summerell (2006).

**Tabla 1:** Comparación entre los sistemas de clasificación de Wollenweber y Reinking (1935), Snyder y Hansen (1954) y Leslie y Summerell (modificado de Leslie y Summerell, 2006).

Secciones según Wollenweber y Reinking (1935)*	Especies según Snyder y Hansen (1954)	Especies según Leslie y Summerell (2006)
<i>Eupionnotes</i> <i>Macroconia</i>	<i>F. episphaeria</i>	<i>F. dimerum</i> , <i>F. merismoides</i>
<i>Lateritium</i>	<i>F. lateritium</i>	<i>F. lateritium</i>
<i>Liseola</i>	<i>F. moniliforme</i>	<i>F. antophilum</i> , <i>F. circinatum</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>F. subglutinans</i> , <i>F. thapsinum</i> , <i>F. verticillioides</i> y otras especies del complejo <i>Gibberella fujikuroi</i>
<i>Arachnites</i>	<i>F. nivale</i>	Excluida del género <i>Fusarium</i>
<i>Elegans</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. oxysporum</i>
<i>Spicarioides</i>	<i>F. rigidiuscula</i>	<i>F. decemcellulare</i>
<i>Discolor</i> <i>Gibbosum</i> <i>Roseum</i> <i>Arthrosporiella</i>	<i>F. roseum</i>	<i>F. acuminatum</i> , <i>F. armeniacum</i> , <i>F. avenaceum</i> , <i>F. compactum</i> , <i>F. crookwellense</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. heterosporum</i> , <i>F. longipes</i> , <i>F. polyphialidicum</i> , <i>F. pseudograminearum</i> , <i>F. semitectum</i> , <i>F. torulosum</i>
<i>Martiella</i> <i>Ventricosum</i>	<i>F. solani</i>	Especies del complejo <i>Fusarium solani</i>
<i>Sporotrichiella</i>	<i>F. tricinctum</i>	<i>F. chlamydosporum</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. tricinctum</i>

\*Las secciones *Submicrocera* y *Pseudomicrocera* no están incluidas ya que actualmente no forman parte del género *Fusarium*.

Aunque el sistema de clasificación por secciones todavía sigue utilizándose en la literatura, diversos trabajos basados en técnicas moleculares han puesto de manifiesto que se trata de un sistema de clasificación muy artificial. Prueba de ello son los trabajos realizados para las secciones *Martiella*, *Elegans* y *Liseola*, que incluyen a las especies clínicamente más importantes para el hombre: *F. solani*, *F. oxysporum* y *F. verticillioides*.

La sección *Martiella* fue descrita inicialmente por Wollenweber y Reinking (1935) con 5 especies, 10 variedades y 4 formas. Sin embargo, Snyder y Hansen (1941) aceptaron como única especie de la sección a *F. solani*, considerando las otras 4 especies como sinónimas. Por otro lado, Booth (1971) y Gerlach y Nirenberg (1982) aceptaron dentro de la sección 4 y 6 especies, respectivamente. Estudios moleculares recientes han demostrado que en la especie *F. solani* se incluye un elevado número de grupos monofiléticos genéticamente muy distintos entre sí (O'Donnell, 2000; Aoki *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2006), lo que significa que especies probablemente distintas tienen un único denominador común. Por esta razón, en la actualidad se habla de complejo de especies de *F. solani* (O'Donnell, 2000). Más recientemente, se han identificado dentro del complejo hasta 45 especies filogenéticas diferentes (Zhang *et al.*, 2006), 20 de las cuales han sido asociadas con infecciones en humanos y otros animales (O'Donnell *et al.*, 2008).

La sección *Elegans*, que incluye a la especie *F. oxysporum*, la segunda más frecuentemente aislada en clínica del género, fue descrita inicialmente por Wollenweber en 1913 con 9 especies. En la revisión de Wollenweber y Reinking (1935), sin embargo, el número de especies, variedades y formas incluidas aumentó a 40. A su vez, estas fueron sinonimizadas en el trabajo de Snyder y Hansen (1954), de

manera que la sección pasó a incluir a *F. oxysporum* como única especie. Dentro de esta, sin embargo, se describieron 25 formas especiales basándose en su diferente comportamiento y especificidad como agentes fitopatógenos. Actualmente, estudios moleculares han permitido comprobar que algunas de estas formas especiales son polifiléticas y que, por tanto, no resultaría un sistema de clasificación adecuado (O'Donnell *et al.*, 1998). De hecho, *F. oxysporum* también ha pasado a denominarse complejo de especies de *F. oxysporum* (O'Donnell *et al.*, 2004). A nivel molecular este complejo es uno de los menos estudiados hasta el momento y no se ha llegado a determinar el número de especies incluidas.

La sección *Liseola*, en donde se incluye otro importante patógeno para el hombre, *F. verticillioides*, también ha sufrido modificaciones a lo largo del tiempo. Wollenweber y Reinking (1935), Booth (1971), Nirenberg (1976), Gerlach y Nirenberg (1982) y finalmente Nelson y colaboradores (1983) incluyeron un número distinto de especies y variedades (entre 4 y 10) dentro de la misma. Además, debido a que esta sección se caracterizaba por incluir especies que no producían clamidosporas (Wollenweber y Reinking, 1935), Kwasna y colaboradores (1991) propusieron la sección *Dlaminia* para incluir 4 nuevas especies de características morfológicas similares pero que sí producían clamidosporas. Sin embargo, O'Donnell y Cigelnik (1997) demostraron que esta nueva sección no era consistente ya que 3 de las 4 especies incluidas se agrupaban filogenéticamente con especies de la sección *Liseola*. Por tanto, los trabajos de O'Donnell y colaboradores demuestran que la sección *Liseola* es artificial y proponen denominar a este grupo de especies relacionadas como complejo de especies de *Gibberella fujikuroi*, que incluye al menos 45 especies filogenéticamente diferentes (O'Donnell y Cigelnik, 1997; O'Donnell *et al.*, 1998;

O'Donnell *et al.*, 2000). Entre ellas podemos mencionar a: *F. nygamai*, *F. proliferatum*, *F. sacchari*, *F. thapsinum* y *F. verticillioides*, todas ellas descritas como patógenos oportunistas para el hombre.

A continuación se detallan los nombres y los diferentes sinónimos de cada una de las especies que se tratan en la presente memoria, según la base de datos *Index Fungorum* ([www.indexfungorum.org](http://www.indexfungorum.org)):

***Fusarium chlamydosporum*** Wollenw. & Reinking, *Phytopathology* 15: 156 (1925)

*Fusarium sporotrichioides* var. *chlamydosporum* (Wollenw. & Reinking) Joffe, *Mycopath. Mycol. appl.* 53(1-4): 211 (1974)

***Fusarium dimerum*** Penz., *Michelia* 2 (no. 8): 484 (1882)

*Fusarium aquaeductuum* var. *dimerum* (Penz.) Raillo, *Fungi of the Genus Fusarium*: 279 (1950)

*Fusarium dimerum* Penz., *Michelia* 2(no. 8): 484 (1882)

***Fusarium incarnatum*** (Desm.) Sacc. *Syll. fung.* (Abellini) 4: 712 (1886)

*Fusarium semitectum* Berk. & Ravenel, *Grevillea* 3 (no. 27): 98 (1875)

*Fusarium semitectum* Berk. & Ravenel, *Grevillea* 3(no. 27): 98 (1875) var. *semitectum*

*Fusisporium incarnatum* Desm.

*Pseudofusarium semitectum* (Berk. & Ravenel) Matsush., *Icon. microfung. Matsush. lect.* (Kobe): 119 (1975)

***Fusarium napiforme*** Marasas, P.E. Nelson & Rabie, in Marasas, Rabie, Lübben, Nelson, Toussoun & van Wyk, *Mycologia* 79(6): 910 (1988)

***Fusarium nygamai*** L.W. Burgess & Trimboli, *Mycologia* 78(2): 223 (1986)

*Fusarium oxysporum* Schlechtendal, Flora Berolinensis, Pars secunda: Cryptogamia  
106: 1-284 (1824)

*Fusarium proliferatum* (Matsush.) Nirenberg ex Gerlach & Nirenberg, Mitt. biol.  
BundAust. Land.-u. Forstw. 169: 38 (1976)

*Cephalosporium proliferatum* Matsush., Microfungi of the Solomon Islands and  
Papua-New Guinea (Osaka): 11 (1971)

*Fusarium sacchari* (E.J. Butler & Hafiz Khan) W. Gams, Cephalosporium-artige  
Schimmelpilze (Stuttgart): 218 (1971)

*Cephalosporium sacchari* E.J. Butler & Hafiz Khan, Memoirs of the Dept. Agric.  
India, Bot. Ser. 6: 185, tab. 1, fig. 1, tab. 2 (1913)

*Fusarium solani* (Mart.) Sacc., Michelia 2 (no. 7): 296 (1881)

*Fusarium eumartii* C.W. Carp., J. Agric. Res., Washington 5: 204 (1915)

*Fusarium martii* Appel & Wollenw., (1910)

*Fusarium solani* f. *eumartii* (C.W. Carp.) W.C. Snyder & H.N. Hansen, Am. J.  
Bot. 28: 740 (1941)

*Fusarium solani* f. sp. *eumartii* C.W. Carp.

*Fusarium solani* var. *eumartii* (C.W. Carp.) Wollenw., Z. ParasitKde 3: 452  
(1931)

*Fusarium solani* var. *martii* (Appel & Wollenw.) Wollenw., Fusaria autographica  
delineata, Edn 1: no. 1034 (1930)

*Fusarium solani* var. *striatum* (Sherb.) Wollenw., Z. ParasitKde 3: 451 (1931)

*Fusarium striatum* Sherb., Memoirs of the Cornell University Agricultural  
Experimental Station 6: 255 (1915)

*Fusisporium solani* Mart.: 20 (1842)

*Hypomyces cancri* (Rutgers) Wollenw.

*Hypomyces haematococcus* (Berk. & Broome) Wollenw., Angew. Bot. 8: 191  
(1926)

*Hypomyces haematococcus* var. *cancricus* (Rutgers) Wollenw., Fusaria  
autographica delineata, Edn 1: no. 829 (1930)

*Fusarium thapsinum* Klittich, J.F. Leslie, P.E. Nelson & Marasas, Mycologia 89(4): 644 (1997)

*Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, Mitt. biol. BundAust. Land.-u. Forstw. 169: 26 (1976)

*Fusarium moniliforme* J. Sheld., Nebraska Agric. Exp. Stat. Rep. 17: 23 (1904)

*Gibberella fujikuroi* var. *moniliformis* (Wineland) Kuhlman, Mycologia 74(5): 765 (1982)

*Gibberella moniliformis* Wineland, J. Agric. Res., Washington 28: 909 (1924)

*Lisea fujikuroi* Sawada, Special Bulletin Agricultural Experiment Station Formosa 19: 251 (1919)

*Oospora verticillioides* Sacc., Syll. fung. (Abellini) 1: 14 (1882)

## 1.1.2. Caracteres fenotípicos

### 1.1.2.1. Morfología

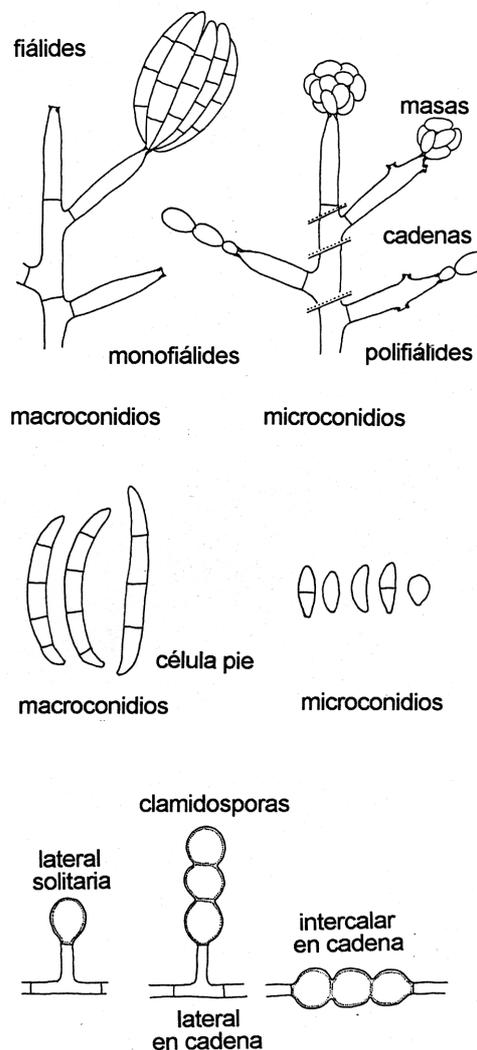
Según los criterios básicos de la taxonomía clásica, en donde la observación y examen de los caracteres morfológicos, macro y microscópicos son esenciales para la identificación de los hongos filamentosos, las especies de *Fusarium* se caracterizan por formar colonias generalmente algodonosas, constituidas por hifas septadas, hialinas, a partir de las que se diferencian los **conidióforos** que pueden ser simples o ramificados, portadores de las **células conidiógenas**. Las células conidiógenas presentan un desarrollo fialídico, por lo que reciben el nombre de **fiálides**; estas se caracterizan por presentar un collarete en cuyo interior se generan los conidios en sucesión basípeta, es decir, el conidio más joven se forma siempre a partir del ápice de dicha célula. En *Fusarium* las fiálides pueden ser monofiálides (Fig. 1), es decir,

con un solo punto formador de conidios (*locus* conidiogénico), o polifiálides (Fig. 1), cuando presentan más de un punto formador de conidios.

Uno de los caracteres más singulares de las especies del género es la posibilidad de formar dos tipos de conidios: **macroconidios** y **microconidios** (Fig. 1). Los macroconidios se generan en estructuras especializadas llamadas **esporodoquios** formadas por una masa de cortas monofiálides que crecen directamente sobre la superficie del sustrato, aunque también pueden formarse a partir de monofiálides del micelio aéreo dependiendo de la especie. Los macroconidios se generan de forma sucesiva formando agregados mucosos que quedan unidos en el ápice de la fiálide. Los microconidios, por contra, se generan sólo en el micelio aéreo a partir de monofiálides y/o polifiálides que suelen ser de mayor longitud que las presentes en los esporodoquios. Los microconidios pueden formar cabezas mucosas o bien cadenas sobre la célula conidiógena. Los macroconidios son de mayor tamaño, tienen una forma característica en hoz (falciformes), son pluricelulares (pueden presentar de 1 a 9 septos), y su célula basal suele ser pedicelada, es decir, que presenta un corto tallo (pedicelo) que sustenta la espora en la célula conidiógena. Los microconidios son más pequeños y de formas más variables (ovales, elipsoidales, subglobosos, etc.), normalmente son unicelulares o con un único septo y suelen presentar la base truncada (Fig. 1). Pascoe (1990) introdujo el término de **mesoconidios**, para referirse a aquellos conidios que se desarrollaban holoblásticamente en el micelio aéreo a partir de células conidiógenas simpodiales. Dichos conidios presentaban características intermedias entre los macro- y microconidios, podían tener entre 0 y 5 septos, ser fusiformes, lanceolados o bien ligeramente falciformes, pero sin presentar la célula basal pedicelada. Sin embargo, este concepto no tuvo mucha aceptación entre los

especialistas del género *Fusarium* prácticamente desde el principio de su propuesta, aunque algunos autores lo siguen utilizando, como es el caso de Leslie y Summerell (2006) para su reciente revisión del género.

Otro tipo de esporas son las **clamidosporas** (Fig. 1). Estas no tienen un papel de dispersión, sino que actúan como estructuras de resistencia, por lo que suelen presentar una pared gruesa y melanizada (Guarro y Gené, 1992). En la figura 1 se muestran las principales características morfológicas del género *Fusarium*.

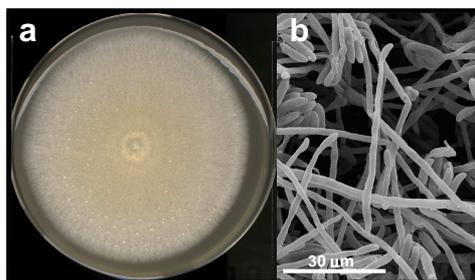


**Fig. 1:** Esquema de las características morfológicas más importantes del género *Fusarium* (modificado de de Hoog *et al.*, 2000).

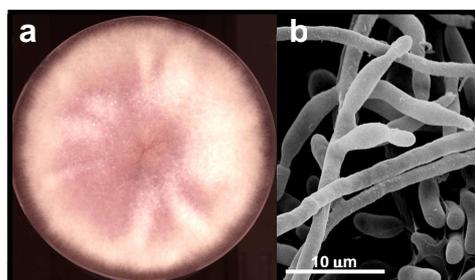
Según Nelson y colaboradores (1994), las características más importantes a tener en cuenta para la identificación de las especies de *Fusarium* son:

- ✓ **morfología de los macroconidios**, es el carácter más útil para la caracterización no sólo de las especies, sino también del género. La forma en hoz de los macroconidios es un carácter altamente estable y consistente cuando las condiciones de crecimiento del hongo no varían. El tamaño, a su vez, es más variable y no constituye un criterio taxonómico tan fiable. Sin embargo, dichos conidios suelen dejar de producirse *in vitro*.
  
- ✓ **presencia, morfología y disposición de los microconidios**, pueden encontrarse solos, formando cabezas mucosas o bien cadenas.
  
- ✓ **morfología de los conidióforos y tipo de célula conidiógena**, se considera si se presentan únicamente como monofiálides o también en polifiálides.
  
- ✓ **presencia de clamidosporas**, estas pueden estar presentes o no; cuando las hay se pueden encontrar solas, en parejas, formando cadenas o grupos. Pueden presentar pared lisa o rugosa.

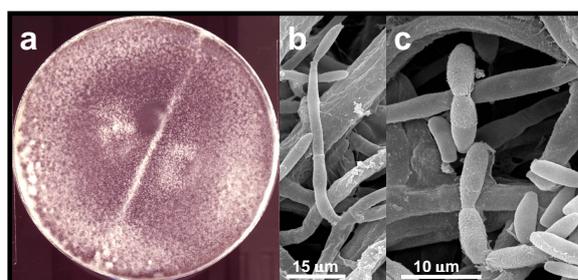
Otras características menos relevantes pueden ser la morfología y pigmentación de la colonia, la presencia o no de esporodoquios y esclerocios o la tasa de crecimiento. En las figuras 2-4 se ilustran las colonias y algunas de las características microscópicas para las tres especies de mayor importancia en clínica.



**Fig. 2:** *Fusarium solani*. a: colonias en medio PDA a los 7 días de cultivo a 25°C; b: monofiálides del micelio aéreo produciendo microconidios.



**Fig. 3:** *Fusarium oxysporum*. a: colonias en medio PDA a los 7 días de cultivo a 25°C; b: monofiálides del micelio aéreo produciendo microconidios.



**Fig.4:** *Fusarium verticillioides*. a: colonias en medio PDA a los 7 días de cultivo a 25°C; b: monofiálide con conidio; c: cadena de conidios desarticulada.

### 1.1.2.2. Fisiología

El uso de pruebas bioquímicas para la identificación de los microorganismos está bien establecido, sobre todo en el caso de las bacterias (Cowan, 1974; Wilson y Miles, 1975; Buchanan y Gibbons, 1974) y levaduras (Barnett *et al.*, 1983, 2000; Kreger-van Rij, 1984). En concreto, los parámetros fisiológicos bioquímicos que suelen utilizarse para clasificar y diferenciar especies de levaduras son principalmente:

- Fermentación de azúcares en condiciones anaerobias
- Asimilación aeróbica de determinados compuestos como única fuente de carbono o nitrógeno
- Crecimiento sin suplemento exógeno de ciertas vitaminas
- Crecimiento en presencia de elevadas concentraciones de D-glucosa (50-60%) o de NaCl
- Crecimiento a 37°C
- Tolerancia a la presencia de cicloheximida
- Producción de polisacáridos
- Hidrólisis de urea
- Formación de ácidos

En cambio, los hongos filamentosos presentan morfologías muy diversas y este hecho ha obviado la necesidad de considerar caracteres bioquímicos y/o fisiológicos para la clasificación de sus especies (Hawksworth, 1974). Sin embargo, éstos también pueden ser de interés en aquellos casos en los que los caracteres morfológicos no son concluyentes (Bridge, 1985). Bridge (1985) aplicó caracteres fisiológicos para la

caracterización de especies del género *Penicillium*. Asimismo, Steadham y colaboradores (1986), llevaron a cabo diferentes estudios sobre la asimilación de carbohidratos por hongos dematiáceos y comprobaron que varios de los azúcares testados (lactosa, inositol, galactitol, etc.) eran de utilidad para la separación de algunas de las especies estudiadas. Otro interesante estudio fue realizado por de Hoog y colaboradores (1994) con las especies *Pseudallescheria boydii* y *Scedosporium prolificans*, las cuales mostraron un patrón de asimilación de sacarosa, ribitol, xilitol y L-arabinitol diferente que permitía diferenciarlas. Por último, en un trabajo realizado en el 2002 (Ghosh *et al.*, 2002), se analizaron varias características fisiológicas de la especie *Sporothrix schenckii*, observando diferencias en la asimilación de la arabinosa, dextrina, rafinosa, rhamnosa y almidón entre aislados de diferente origen geográfico.

Hasta la fecha se han realizado muy pocos estudios sobre la caracterización fisiológica y bioquímica de las especies de *Fusarium*. Entre ellos, podemos citar el trabajo de Thrane (1986), el cual concluyó que la asimilación de taninos y sacarosa permitía la diferenciación de tres de las 11 especies de *Fusarium* que incluyó en su estudio. En otro trabajo realizado por Wasfy (1987), se estudió la capacidad de 22 aislados de *Fusarium* para crecer en diferentes fuentes de carbono, así como su resistencia a diferentes inhibidores y su actividad enzimática con las pruebas API ZYM. Los resultados permitieron establecer que los aislados presentaban diferencias en cuanto a su actividad enzimática y su tolerancia frente a diferentes inhibidores, tales como el sulfato de cobre y el verde malaquita. Sin embargo, dichos estudios no fueron concluyentes para la identificación de especies. Probablemente, la falta de un método estandarizado y la escasez de resultados contrastados sobre pruebas

bioquímicas discriminatorias entre especies, hace que la aplicación de ensayos bioquímicos sea de poca utilidad en la taxonomía de los hongos filamentosos.

### 1.1.3. Importancia clínica

Los hongos pueden ocasionar diversas patologías en el hombre y en los animales, a través de diferentes mecanismos de acción:

- **Micetismo:** intoxicación alimentaria por sustancias químicas constituyentes del hongo ingerido.
- **Micotoxicosis:** intoxicación por ingestión de toxinas elaboradas por el metabolismo del hongo al crecer en algunos alimentos.
- **Alergias:** reacciones de hipersensibilidad debidas a mecanismos inmunológicos.
- **Micosis:** infecciones por invasión de los tejidos superficiales o profundos.

El género *Fusarium* causa un amplio espectro de enfermedades en el ser humano, incluyendo micotoxicosis y micosis que pueden ser superficiales, localizadas o diseminadas (Guarro y Gené, 1995). Las infecciones por *Fusarium* se incluyen dentro de las **hialohifomicosis**, es decir, micosis causadas por hongos oportunistas que presentan hifas hialinas y septadas, aunque también se utiliza el término **fusariosis** para referirse a las infecciones causadas por estos hongos.

## **Micotoxicosis**

Las intoxicaciones debidas a la ingestión de toxinas producidas por *Fusarium* son raras en el hombre, siendo más frecuentes en animales a consecuencia de la ingesta de piensos y forrajes contaminados por estos hongos durante el periodo de almacenaje. Durante la Segunda Guerra Mundial, sin embargo, la escasez de alimentos produjo varios brotes importantes de micotoxicosis en la Unión Soviética, causando la muerte de cientos de personas que se alimentaron con cereales colonizados por *Fusarium* (Nelson *et al.*, 1994). Actualmente, desde el punto de vista clínico son mucho más importantes las micosis.

## **Micosis superficiales**

Entre las infecciones superficiales se han reportado casos de: queratitis, onicomycosis, infecciones cutáneas, colonización de úlceras e infecciones de heridas y quemaduras (Guarro y Gené, 1995). Las queratitis son, probablemente, el tipo más común de infección superficial causado por el género *Fusarium*. El hongo no invade la córnea fácilmente, sino que requiere de un traumatismo como vía de infección, aunque también se ha asociado al uso de lentes de contacto en casos recientes (O' Donnell *et al.*, 2007; Jureen *et al.*, 2008). La problemática asociada a este tipo de infección, a diferencia de otros géneros, es el hecho de que la queratitis por *Fusarium* cursa con peor pronóstico y es de difícil tratamiento.

## **Micosis que afectan a tejidos profundos**

En cuanto a los casos de infecciones localizadas, aunque menos comunes, son diversas e incluyen: endoftalmitis exógena (debida a traumatismos), infecciones

profundas de piel y tejidos subcutáneos, osteomielitis, artritis séptica, peritonitis (relacionada con el uso de catéteres), abscesos cerebrales, endocarditis, infección pulmonar y cistitis (Guarro y Gené, 1995).

### **Micosis diseminadas**

Actualmente, y en consonancia con la aparición de terapias clínicas agresivas, se han incrementado de forma considerable el número de pacientes inmunodeprimidos, lo que ha propiciado que las infecciones diseminadas por *Fusarium* sean cada vez más frecuentes. En general, son infecciones de difícil tratamiento y con un elevado índice de mortalidad asociado (aprox. 70%) (Leslie y Summerell, 2006). Los síntomas clínicos de la fusariosis diseminada incluyen fiebre refractaria y la aparición característica de nódulos cutáneos de color púrpura con un área de necrosis central (Nucci *et al.*, 2003). Por lo general, la biopsia de estos nódulos revela la presencia de hifas hialinas, septadas y con ramificaciones que invaden los vasos sanguíneos. Los cultivos del material de biopsia y los hemocultivos resultan de gran utilidad en el diagnóstico, sobre todo éstos últimos, ya que permiten diferenciar la infección de aquellas causadas por el género *Aspergillus*, que presenta hemocultivos negativos (Nucci y Anaissie, 2007).

### **Especies implicadas en clínica**

De acuerdo con Nucci y Anaissie (2007) las especies del género *Fusarium* que se han descrito como patógenos para el hombre, en orden de importancia, son *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides*, *F. dimerum*, *F. proliferatum*, *F.*

*chlamydosporum*, *F. sacchari*, *F. nygamai*, *F. napiforme* y, más recientemente, *F. incarnatum*, *F. thapsinum*, *F. acutatum* y *F. polyphialidicum*.

*F. solani* se ha descrito en numerosas ocasiones como agente de infecciones superficiales, localizadas y diseminadas en pacientes inmunocomprometidos, especialmente en pacientes neutropénicos. Es la especie del género más aislada en todo el mundo en pacientes que presentan queratitis (Godoy *et al.*, 2004; Naiker y Odhav, 2004; Zhang *et al.*, 2006), incluso relacionada con el uso de lentes de contacto (Donnio *et al.*, 2007; O'Donnell *et al.*, 2007; Jureen *et al.*, 2008), siendo el principal agente causal de ceguera en áreas tropicales. También se han descrito casos de infecciones cutáneas (Uchiyama *et al.*, 1987; Caux *et al.*, 1993; Bodey *et al.*, 2002; Pérez-Pérez *et al.*, 2007), de micetoma (Tomimori-Yamashita *et al.*, 2002; Yera *et al.*, 2003), infecciones diseminadas en pacientes transplantados (Guinvarc'h *et al.*, 1992; Arney *et al.*, 1997), con cáncer (Viscoli *et al.*, 1990; Bushelman *et al.*, 1995; Hennequin *et al.*, 1997) o leucemia (Matsuda y Matsumoto, 1986; Brint *et al.*, 1992; Patoux-Pibouin *et al.*, 1992). Más recientemente se realizó un estudio con 84 pacientes con leucemia y a los que se les diagnosticó posteriormente fusariosis invasiva. Las especies que causaron la infección fueron identificadas en 30 pacientes, siendo *F. solani* la especie más aislada con diferencia (17 pacientes) (Nucci *et al.*, 2003).

En cuanto a *F. oxysporum* está considerada como la segunda especie más frecuente en infecciones humanas y se le han atribuido casos de queratitis (Hemo *et al.*, 1989; Rosa *et al.*, 1994) y onicomiosis (Gianni *et al.*, 1997; Guilhermetti *et al.*, 2007), así como casos de infecciones localizadas (Romano *et al.*, 1998; Bodey *et al.*, 2002; Gorman *et al.*, 2006) y diseminadas (Guarro y Gené, 1995; Sander *et al.*, 1998; Albisetti *et al.*, 2004; Rothe *et al.*, 2004; Olivares *et al.*, 2005). *F. oxysporum* se ha

aislado repetidamente en los sistemas de distribución de agua de un hospital en Houston (Texas), demostrándose a su vez que era el agente responsable de diversas infecciones en pacientes de ese hospital (Anaissie *et al.*, 2001). También se ha descrito como responsable de infecciones por catéter (Raad y Hachem, 1995), infecciones en pacientes con SIDA (Eljaschewitsch *et al.*, 1996) o que han sido trasplantados (Warnock, 1995).

*F. verticillioides*, a diferencia de las especies anteriormente citadas, destaca por su capacidad de producir micotoxinas (moniliformina, fusarinas y fumonisinas), las cuáles se relacionan con diversas enfermedades en animales y humanos al ingerir cereales contaminados por esta especie (Nelson *et al.*, 1994). Además de su importancia como agente causal de micotoxicosis, también se le han atribuido casos de queratitis (Durán *et al.*, 1989; Pagliarusco *et al.*, 1995), infecciones cutáneas, (Pereiro *et al.*, 1999; Bodey *et al.*, 2002), micetoma (Ajello *et al.*, 1985) y artritis séptica (Gradon *et al.*, 1990). Por otro lado, ha sido relacionado con infecciones diseminadas en pacientes con cáncer (Viscoli *et al.*, 1990; Castagnola *et al.*, 1993; Myoken *et al.*, 1995; Hennequin *et al.*, 1997; Yildiran *et al.*, 1998; Okada *et al.*, 2000; Tezcan *et al.*, 2008) y SIDA (Guarro *et al.*, 2000a).

El resto de las especies implicadas en patologías humanas son mucho menos frecuentes. *F. proliferatum* es capaz de producir fumonisina, al igual que *F. verticillioides*, y ha sido descrita como agente causal de onicomicosis (Hattori *et al.*, 2005; Ninet *et al.*, 2005), lesiones cutáneas (Bodey *et al.*, 2002) y endoftalmitis (Ferrer *et al.*, 2005), así como infecciones sistémicas (Summerbell *et al.*, 1988; Barrios *et al.*, 1990; Helm *et al.*, 1990). *F. sacchari* se ha descrito como responsable de queratitis (Polenghi y Lasagni, 1976) y de un caso de fungemia (Guarro *et al.*, 2000b). A *F.*

*dimerum* se le han atribuido casos de queratitis (Zapater *et al.*, 1972; Zapater y Arrechea, 1975; Sallaber *et al.*, 1999; Vismer *et al.*, 2002), de infección cutánea (Bodey *et al.*, 2002), de endocarditis (Camin *et al.*, 1999) y diversos casos de infección diseminada en pacientes inmunocomprometidos (Poirot *et al.*, 1985; Krcmery *et al.*, 1993; Austen *et al.*, 2001; Letscher-Bru *et al.*, 2002; Bigley *et al.*, 2004). *F. incarnatum* se aisló a partir de la piel de un paciente que había sufrido quemaduras (Imwidthaya *et al.*, 1984) y de lesiones cutáneas (Bodey *et al.*, 2002). *F. chlamydosporum* ha sido el agente causal de dos casos de fusariosis profunda, el primero de ellos asociado a una infección por catéter en un paciente con linfoma (Kiehn *et al.*, 1985) y el segundo en un paciente con neutropenia (Segal *et al.*, 1998). A *F. nygamai* se le han atribuido varios casos de micotoxicosis en Malasia (Salleh y Strange, 1988), aunque no se comprobó hasta años más tarde que era capaz de producir moniliformina (Marasas *et al.*, 1991); también se ha publicado un caso como agente responsable de infección sistémica en un paciente con leucemia (Kruider *et al.*, 1996). *F. thapsinum*, una especie descrita recientemente (Klittich *et al.*, 1997), ha sido el agente causal en un caso de fusariosis sistémica en un paciente con leucemia (Yücesoy *et al.*, 2004), así como de varios casos de queratitis (O'Donnell *et al.*, 2007). Y, por último, especies de *Fusarium* de las que sólo se han descrito un único caso como son: *F. napiforme*, agente de una hialohifomicosis diseminada en un paciente con leucemia aguda (Melcher *et al.*, 1993), *F. polyphialidicum* causante de una queratitis (Guarro *et al.*, 2003) y *F. acutatum* que se aisló a partir de una herida en el pie de un paciente diabético (Taj-Aldeen *et al.*, 2006).

## 1.2. ANTIFÚNGICOS Y TRATAMIENTO DE LAS INFECCIONES POR *FUSARIUM*

### 1.2.1. Tipos de antifúngicos y mecanismos de acción

Entre las primeras sustancias utilizadas en el tratamiento de las infecciones fúngicas podemos citar el yoduro potásico, metaloides y derivados azufrados. Posteriormente se introdujeron los primeros antifúngicos o antimicóticos, denominados de **primera generación** por ser derivados de compuestos naturales o productos de la actividad metabólica de determinados microorganismos. Los antifúngicos llamados de **segunda generación** se desarrollaron más tarde obteniéndose principalmente por síntesis química.

Aunque existen una gran cantidad de antibacterianos, no ocurre así con los antifúngicos. Debido a la gran similitud existente entre las células fúngicas y las células animales resulta más complejo encontrar moléculas que puedan afectar únicamente a las células fúngicas sin causar toxicidad en el individuo. Esto implica que los efectos secundarios sobre el huésped constituyen un importante obstáculo para la obtención de fármacos eficaces para el tratamiento de las infecciones fúngicas. De hecho, la mayoría de antifúngicos desarrollados hasta ahora tienen como diana de acción el **ergosterol**, el principal esteroide de la membrana plasmática de los hongos, ya sea sobre alguno de sus precursores en la ruta de biosíntesis en el caso de los azoles, o una vez insertado en la membrana celular en el caso de la anfotericina B. A pesar de que el ergosterol es el compuesto mayoritario de la membrana, existen otros componentes estructurales de la célula fúngica (manano, quitina,  $\beta$ -(1,3)-D-glucano, etc.) utilizados como blanco de acción de diversos antifúngicos. Una de las clasificaciones más utilizadas para los diferentes compuestos antifúngicos se basa en su estructura

química, la cual se relaciona con su mecanismo de acción (Fig. 5). En la tabla 2 se presentan los diferentes fármacos antifúngicos más utilizados actualmente o en fase de desarrollo.

**Tabla 2:** Fármacos antifúngicos sistémicos y tópicos utilizados actualmente o en fase de desarrollo (modificado de Murray *et al.*, 2006).

Antifúngico	Administración	Mecanismo de acción	Comentarios
<b>Alilaminas:</b> Naftifina Terbinafina	Tópica Oral, tópica	Inhibición de escualeno epoxidasa	<b>Terbinafina</b> es de amplio espectro y presenta sinergismo con otros antifúngicos
<b>Antimetabolitos:</b> Flucitosina	Oral	Inhibición de síntesis de ADN y ARN	Se emplea junto con AMB y fluconazol, presenta problemas de toxicidad y de aparición de resistencia secundaria
<b>Imidazoles:</b> Ketoconazol Bifonazol Clotrimazol Econazol Miconazol Oxiconazol Sulconazol Terconazol Tioconazol	Oral, tópica Oral, tópica Oral, tópica Oral, tópica Oral, tópica Oral, tópica Oral, tópica Oral, tópica Oral, tópica	Inhibición de enzimas lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilasa dependientes de P-450	<b>Ketonocazol</b> tiene un espectro bastante amplio pero presenta problemas de toxicidad
<b>Triazoles:</b> Fluconazol Itraconazol Voriconazol Posaconazol Ravuconazol Albaconazol	Oral, intravenosa Oral, intravenosa Oral, intravenosa Oral Oral, intravenosa Oral?	Igual que los imidazoles pero presentan mayor especificidad de unión a la enzima diana	<b>Fluconazol</b> tiene buena actividad <i>in vivo</i> frente a levaduras. <b>Itraconazol</b> y <b>voriconazol</b> presentan un mayor espectro de actividad. <b>Posaconazol</b> y <b>ravuconazol</b> se hallan en fase de investigación clínica

Tabla 2 (cont.)

Antifúngico	Administración	Mecanismo de acción	Comentarios
<b>Equinocandinas:</b> Caspofungina Anidulafungina Micafungina	Intravenosa Intravenosa Intravenosa	Inhibición de síntesis de glucanos de la pared celular	La <b>casprofungina</b> es adecuada para el tratamiento de candidiasis y aspergilosis invasivas <b>Anidulafungina</b> y <b>micafungina</b> se encuentran en fase de desarrollo.
<b>Polienos:</b> Anfotericina B (AMB) Formulaciones lipídicas de AMB Natamicina	Intravenosa, tópica Intravenosa Suspensión oral, tópica	Se unen al ergosterol y producen daño oxidativo en la membrana	<b>AMB</b> es el antifúngico más utilizado, de amplio espectro pero tóxico. Las formulaciones lipídicas, menos tóxicas tienen un precio más elevado

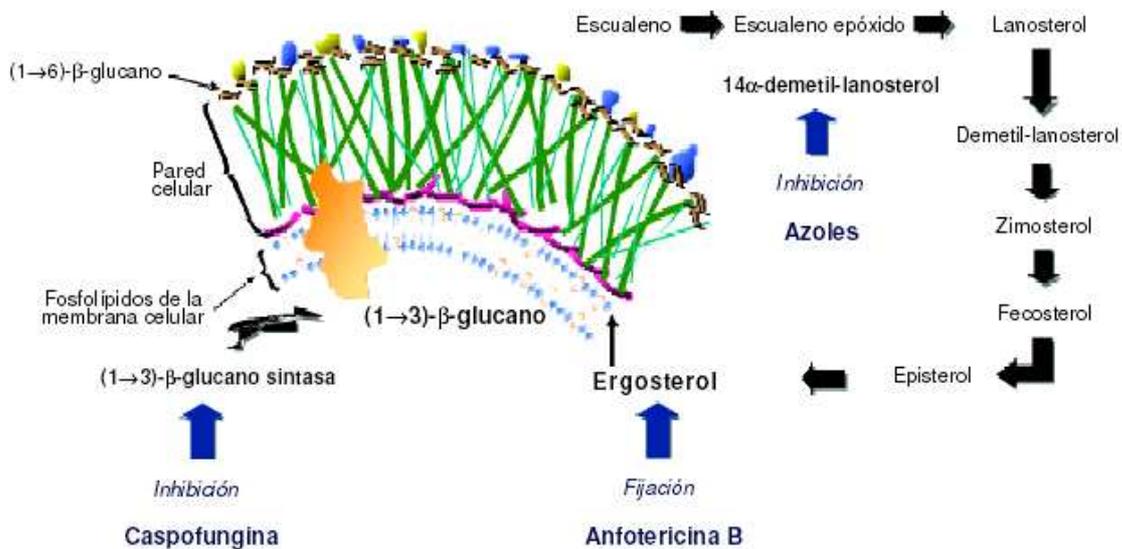


Fig. 5: Mecanismos de acción de los diferentes antifúngicos.

La **anfotericina B** (AMB) y sus formulaciones lipídicas son los fármacos antifúngicos más utilizados en clínica. El principal mecanismo de acción, como hemos comentado anteriormente, se basa en la capacidad para unirse al ergosterol. Sin embargo, la AMB también se une, aunque con menor afinidad, al colesterol de la membrana plasmática de la célula animal, siendo ésta en gran medida la principal causa de la toxicidad asociada a su administración en el ser humano. La ventaja más significativa de las formulaciones lipídicas de AMB radica en una significativa reducción de esta toxicidad, en especial respecto a la nefrotoxicidad, que es uno de los mayores inconvenientes que presenta el uso de este antifúngico. El espectro de actividad de AMB es amplio y está indicado para el tratamiento de múltiples infecciones fúngicas: candidiasis, criptococosis, aspergilosis, blastomycosis, etc. Sin embargo, algunos hongos pueden ser resistentes a este fármaco.

Los **azoles** se dividen en dos grupos según su estructura química (imidazoles y triazoles), pero presentan idéntico mecanismo de acción. Ambos grupos actúan inhibiendo el enzima lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilasa dependiente del citocromo fúngico P-450. Este enzima participa en la conversión de lanosterol en ergosterol y su inhibición altera la síntesis de la membrana celular del hongo. Dependiendo del microorganismo y del azol administrado esta alteración en la síntesis de la membrana puede tener un efecto fungostático (inhibición de la proliferación de las células fúngicas) o fungicida (muerte celular).

Las **equinocandinas** constituyen una nueva clase de antifúngicos que inhiben la síntesis de  $\beta$ -(1,3)-glucanos, componentes importantes de la pared celular del hongo. Dado que las células de mamífero carecen de pared, estos fármacos presentan una toxicidad selectiva frente a las células fúngicas. En la actualidad existen tres

equinocandinas en distintas fases de desarrollo: hasta el momento se ha autorizado la administración de caspofungina (CAS) en pacientes afectados de candidiasis y aspergilosis, mientras que anidulafungina (AFG) y micafungina (MFG) se encuentran todavía en fase de investigación clínica.

La **flucitosina** (5-fluorocitosina, 5-FC) es el único antifúngico comercializado que actúa como antimetabolito. Se trata de un análogo fluorado de la pirimidina que interfiere en la síntesis de ADN, ARN y proteínas en la célula fúngica. No presenta un espectro de acción amplio y puede producir toxicidad si la concentración sérica supera los 100 µg/ml, por lo que es importante monitorizar su concentración. No es conveniente administrarla en monoterapia debido a la aparición de resistencia secundaria. Sin embargo, se ha demostrado que la combinación de flucitosina con AMB o fluconazol es eficaz en el tratamiento de la criptococosis y la candidiasis.

### 1.2.2. Métodos de estudio de la sensibilidad antifúngica *in vitro*

Los métodos de estudio de la sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos son similares a los métodos de estudio de la sensibilidad a los antibacterianos y su diseño técnico sigue las mismas directrices (Espinel-Ingroff y Shadomy, 1989). La técnica más utilizada para hongos filamentosos es la de dilución en medio líquido (micrométodo), aunque para algunos hongos de crecimiento lento como los dermatofitos todavía se utiliza el método de difusión en agar (Shadomy *et al.*, 1991).

Estas técnicas permiten cuantificar la actividad del antifúngico, expresada como la **concentración mínima inhibitoria (CMI)** o la **concentración mínima letal (CML)**. Así se puede evaluar la sensibilidad *in vitro* a uno o más antifúngicos, correlacionar estos resultados con la actividad de los fármacos *in vivo* e intentar predecir el pronóstico

terapéutico, detectar el desarrollo de cepas resistentes y determinar el valor potencial terapéutico de un nuevo agente antifúngico (Espinel-Ingroff, 1994).

Sin embargo, el proceso requerido para la estandarización de las pruebas de estudio de los antifúngicos ha sido lento, debido a las numerosas variables que influyen en los resultados. Hay que tener en cuenta, además, que los métodos para determinar la sensibilidad de los hongos *in vitro* no tuvieron especial relevancia hasta los años 70, cuando empezaron a introducirse los primeros azoles. Esto fue debido a que, hasta ese momento, sólo existía la AMB. De hecho, las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos llevan unos 50 años de retraso con respecto a las pruebas de sensibilidad a los antibióticos (Revankar y Graybill, 2003). Es por esto que los métodos para evaluar la sensibilidad de los hongos filamentosos más frecuentes en clínica a los diferentes antifúngicos no se han estandarizado hasta el año 2002.

En el año 1982, el *National Committee for Clinical Laboratory* (NCCLS), actualmente conocido como *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), creó un subcomité para la estandarización de las pruebas de sensibilidad antifúngica. El objetivo principal fue el de unificar los criterios metodológicos, primero con las levaduras y más tarde con los hongos filamentosos. Galgiani y colaboradores (1987) coordinaron el primer estudio colaborativo para comparar los resultados de la sensibilidad *in vitro* de las levaduras. Participaron cuatro laboratorios independientes que utilizaban técnicas sin estandarizar, propias de cada uno de ellos. Los resultados de este estudio pusieron de manifiesto la escasa reproducibilidad obtenida entre los laboratorios participantes para todos los antifúngicos utilizados. Se hizo obvia la necesidad de estandarizar una metodología de trabajo adecuada que tuviera en cuenta los diferentes parámetros que influían en las técnicas utilizadas. Con este fin se

realizaron varios estudios comparativos donde se determinó la importancia de diferentes factores como: preparación del inóculo (Pfaller *et al.*, 1988), medio de cultivo utilizado, tiempo y temperatura de incubación (Pfaller *et al.*, 1990), valores de corte para la CMI (Fromtling *et al.*, 1993), uso comparativo del método de macrodilución y de microdilución (Espinel-Ingroff *et al.*, 1992). Como resultado de los diferentes estudios realizados de forma colaborativa, en el año 1992 se redactó el documento M27-P, del cual se realizaron revisiones posteriores incluyendo nuevos datos en cada una de ellas hasta obtener la versión actual denominado **documento M27-A2** (NCCLS, 2002) y que es el método de referencia utilizado en la actualidad para las pruebas de sensibilidad antifúngica *in vitro* para **levaduras**.

De igual forma, también se han llevado a cabo diversos estudios con el fin de adaptar el método de referencia M27-2A a los hongos filamentosos. Uno de los más destacados fue un estudio multicéntrico que permitió evaluar el método recomendado por Espinel-Ingroff y Kerkering (1991) para la preparación de suspensiones conidiales y comparar los resultados obtenidos con los métodos de macro y microdilución en la determinación de la actividad *in vitro* de los antifúngicos frente a diferentes hongos filamentosos (Espinel-Ingroff *et al.*, 1995). Seis laboratorios participaron en dicho estudio, se utilizaron 25 cepas pertenecientes a las especies *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Pseudallescheria boydii*, *Rhizopus orizae* y *Sporothrix schenckii*, y ensayaron los siguiente antifúngicos: anfotericina B, fluconazol, itraconazol, miconazol y ketoconazol.

De este modo se llegaron a establecer las condiciones de referencia para realizar el estudio de la sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos de diferentes especies de hongos filamentosos. Estas condiciones de referencia incluían la preparación del

inóculo, así como el intervalo de concentración adecuado, el medio de crecimiento a utilizar, el tiempo y la temperatura de incubación y los criterios para la lectura de los valores de CMI. Con esta información se redactó una propuesta inicial, el documento M-38P, en el año 1998, pero fue cuatro años más tarde cuando se publicó el documento aprobado finalmente, denominado M-38A (NCCLS, 2002). Por último, la última revisión se ha publicado recientemente, en 2008, ampliándose el número de antifúngicos, como las equinocandinas, que no estaban incluidas en el documento anterior, y el de cepas de referencia e incluyendo datos para los hongos dermatofitos, dando como resultado el actual **documento M38-A2** (CLSI, 2008), como método de referencia utilizado en la actualidad para las pruebas de sensibilidad antifúngica *in vitro* para **hongos filamentosos**.

### 1.2.3. Tratamiento de las fusariosis

El tratamiento de las infecciones por *Fusarium* difiere en función del tipo de infección. Las **infecciones superficiales** suelen responder bien al tratamiento tópico, normalmente natamicina aunque también se utiliza AMB, ketoconazol y/o desbridamiento de la zona afectada (Guarro y Gené, 1995; Nucci y Anaissie, 2007). Con respecto a las **infecciones localizadas y diseminadas**, según diferentes casos revisados en la literatura por Nucci y Anaissie (2007), se han utilizado como tratamiento varios agentes antifúngicos: la AMB, así como sus formulaciones lipídicas, el voriconazol y, más recientemente, el posaconazol. El porcentaje de recuperación, sin embargo, en el total de los 187 casos estudiados fue únicamente de un 35%. La respuesta en los pacientes que presentaban infección localizada fue mejor, llegando al 64%, mientras que en los casos de infección diseminada disminuyó al 30%. Esto

puede deberse a que hay otros parámetros que son importantes en la recuperación de los pacientes afectados, sobre todo su estado de inmunodepresión. En un estudio publicado por la *American Cancer Society* (Nucci *et al.*, 2003), realizado con 84 pacientes que presentaban cáncer hematológico y fusariosis sistémica, se observó que la neutropenia persistente así como el uso de corticosteroides estaba relacionado con una menor supervivencia de los pacientes. Por tanto, un tratamiento efectivo debería tener en cuenta la recuperación del sistema inmunitario junto al uso de antifúngicos, así como la retirada del tratamiento con corticosteroides.

Otra cuestión importante a tener en cuenta es el hecho de que las especies dentro del género presentan diferente comportamiento frente al uso de los agentes antifúngicos, siendo *F. solani* la más resistente (Arikan *et al.*, 1999; Nucci y Anaissie, 2007), por lo que resulta importante la identificación de la especie para prescribir el tratamiento adecuado.

### 1.3. TAXONOMÍA MOLECULAR

La taxonomía, hasta hace relativamente poco, se basaba en el estudio de las características morfológicas para delimitar tanto especies como diferentes niveles morfológicos. Sin embargo, este enfoque presentaba cierto tipo de limitaciones tales como la dificultad de diferenciar hongos estrechamente relacionados, la laboriosidad de los métodos utilizados así como la falta de resolución para delimitar algunos taxones (Guarro *et al.*, 1999). La reciente incorporación de las técnicas de biología molecular como un apoyo a la taxonomía clásica ha permitido resolver estas

limitaciones. Para ello, sin embargo, es importante definir el concepto de especie, la unidad básica de la taxonomía.

### **1.3.1. Concepto de especie**

El concepto de especie ha sido ampliamente discutido a lo largo de la historia de la Biología y, aún hoy, no se ha llegado a establecer una definición satisfactoria del término. Según la revisión realizada por Mayden (1997), hay varios conceptos de especie los cuáles se pueden clasificar como teóricos u operacionales. El concepto teórico más destacable es el de especie evolutiva, mientras que como conceptos operacionales podemos citar los de especie biológica, morfológica y filogenética. A continuación los explicaremos brevemente.

#### **Concepto de especie evolutiva**

El término de especie evolutiva se define como un único linaje o secuencia ancestro-descendiente de poblaciones que mantiene su propia identidad frente a otros linajes y que posee sus propias tendencias histórica y evolutiva (Simpson, 1951, 1961; Wiley, 1978). Esta definición se considera más amplia que el resto, pero resulta poco práctica ya que no incluye criterios que se puedan utilizar para el reconocimiento de las especies.

#### **Concepto de especie biológica**

La definición de especie biológica se refiere a aquel grupo o población natural de individuos que pueden cruzarse entre sí y que están aislados reproductivamente de otros grupos afines. Éste es el concepto más ampliamente aceptado y de mayor

consenso, al menos en el campo de la Zoología. Una especie biológica, por tanto, según esta definición, es una población reproductivamente aislada, por lo que constituye un linaje evolutivo separado y que es reforzado por una serie de barreras que pueden ser de carácter geográfico o biológico. La especie biológica sigue libremente su curso en respuesta a los procesos genéticos e influencias ambientales que causan los cambios evolutivos (Dobzhansky, 1935; Mayr, 1940). Sin embargo, la aplicación de este concepto en el caso de los hongos tiene ciertas limitaciones ya que estos organismos pueden presentar diferentes formas de reproducción. De hecho, el 20% de los hongos presentan únicamente reproducción asexual (Reynolds, 1993), mientras que otros se reproducen sexualmente por sí mismos, sin necesidad de cruzarse con otro individuo de su misma especie (hongos homotálicos). Además, otros hongos no son capaces de entrecruzarse en cultivo o incluso, simplemente, no pueden cultivarse en el laboratorio.

### **Concepto de especie morfológica**

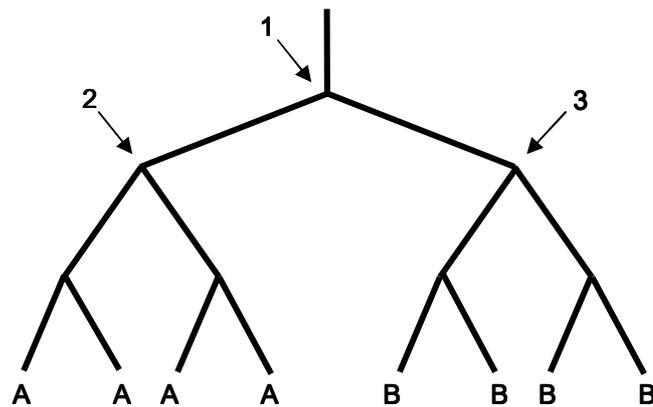
Según este concepto cada especie es distinguible de otra por sus características morfológicas. Junto al concepto de especie biológica, han sido las definiciones principalmente utilizadas para delimitar las especies fúngicas. Con pocas excepciones, los cerca de 70.000 hongos descritos han sido diagnosticados en función de sus características fenotípicas, tanto morfológicas (Hawksworth *et al.*, 1996) como fisiológicas, en especial, el crecimiento a diferentes temperaturas (Pitt, 1979), la producción de metabolitos secundarios (Frisvad y Filtenborg, 1990), o la presencia de pigmentos en el medio de crecimiento (Besl y Bresinsky, 1997). La ventaja que presenta es que permite establecer comparaciones entre las especies previamente

establecidas y las nuevas. El inconveniente, sin embargo, es el hecho de que algunas de las especies diagnosticadas basándose en el concepto de especie morfológica comprenden más de una especie cuando se delimitan utilizando principalmente el criterio de especie filogenética.

### **Concepto de especie filogenética**

El término de especie filogenética se refiere al menor grupo de individuos que comparten un único carácter derivado o apomórfico, es decir, no presente en sus ancestros afines (Cracraft, 1983). La ventaja de esta definición es que permite establecer grupos individuales de forma fácil pero la decisión para situar el límite de especie resulta subjetiva. Por ejemplo, en la figura 6 observamos el árbol filogenético obtenido para un gen que presenta dos secuencias diferentes, A y B.

Según el árbol obtenido tenemos dos grupos monofiléticos diferentes, formados por aquellos organismos que presentan la secuencia A y por aquellos que presentan la secuencia B para el gen estudiado. Ahora bien, ¿podemos considerarlos como especies diferentes? La información que nos aporta el árbol nos permite considerar dos posibilidades: podemos situar el límite de especie en el punto 1, con lo cual las secuencias A y B representarían dos alelos diferentes dentro de la misma especie (variación intraespecífica), o podemos situar el límite de especie en los puntos 2 y 3, de forma que los organismos que presentan las secuencias A y B serían especies diferentes entre sí. Para evitar esta subjetividad a la hora de determinar el límite de especie filogenética se ha establecido el concepto de concordancia filogenética.



**Fig. 6:** Análisis filogenético obtenido a partir del estudio de un único gen que presenta dos secuencias diferentes (A y B). Los puntos 1, 2 y 3 establecen posibles límites de especie (modificado de Taylor *et al.*, 2000).

### 1.3.2. Concepto de concordancia filogenética

El concepto de concordancia filogenética fue propuesto por Avise y Ball (1990) y consiste en utilizar más de un gen para llevar a cabo el estudio filogenético. De esta manera obtenemos diferentes genealogías, las cuales se comparan entre sí para establecer el límite de especie en el punto de coincidencia entre todas ellas (Fig. 7). El método que utiliza este concepto se conoce como *Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition* (GCPSR) (Taylor *et al.*, 2000), aunque también se utilizan más comúnmente los términos de análisis multigénico o *multilocus*, y está basado en el análisis conjunto de las secuencias de diferentes genes estructurales y ribosómicos. Este método ha demostrado su utilidad en diversos estudios realizados tanto con bacterias como con organismos eucariotas. Por ejemplo, ha sido utilizado en plantas para comparar las genealogías obtenidas a partir de genes del ADN nuclear y

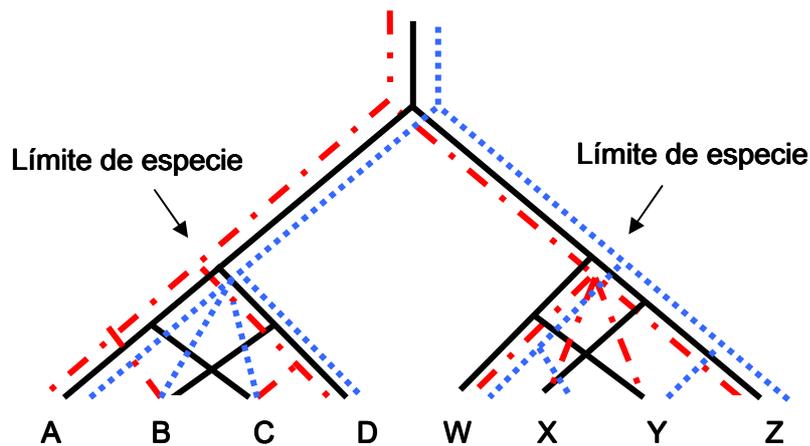


Fig. 7: Análisis filogenético simultáneo de tres genes diferentes, indicando el límite de especie en el punto de coincidencia de las diferentes genealogías obtenidas (modificado de Taylor *et al.*, 2000).

del ADN de los cloroplastos. En animales, se han realizado trabajos similares utilizando genes nucleares y mitocondriales (Avice, 1994). Además, el estudio de múltiples genes nucleares ha permitido diagnosticar diferentes especies filogenéticas en especies como *Drosophila melanogaster* (Caccone *et al.*, 1996).

Por último, en el caso de los hongos, esta metodología ha permitido reconocer que determinadas especies morfológicas de interés clínico, como por ejemplo *Coccidioides immitis* (Koufopanou *et al.*, 1997 y 1998), *Aspergillus flavus* (Geiser *et al.*, 1998) e *Histoplasma capsulatum* (Kasuga *et al.*, 1999), entre otras, agrupan a varias especies filogenéticas. Estos estudios demuestran que este método puede ser aplicado tanto a hongos meiospóricos como mitospóricos, y que permite detectar eficazmente especies no identificables siguiendo los criterios que se aplican para los conceptos de especie biológico y morfológico.

### 1.3.3. Filogenia molecular

Como hemos comentado antes, la mayoría de los hongos descritos hasta el momento han sido clasificados en función de criterios morfológicos (Hawksworth *et al.*, 1996) y era a través de estos criterios que se intentaba establecer relaciones filogenéticas e incluso interpretar la evolución de estos organismos. Sin embargo, el mero hecho de estudiar sólo la estructura de los hongos presenta diversas limitaciones, entre ellas la imposibilidad de distinguir individuos prácticamente idénticos desde el punto de vista morfológico, pero que genéticamente pueden llegar a ser muy diferentes.

Las actuales técnicas de secuenciación del ADN y el avance de la informática han permitido crear nuevos métodos de clasificación basados en el análisis de secuencias genéticas. Concretamente, la filogenia molecular es aquella área de estudio que establece las relaciones evolutivas entre distintos organismos basándose en la comparación de caracteres moleculares, fundamentalmente entre las secuencias de ADN (Alexopoulos *et al.*, 1996).

La idea inicial de la filogenia molecular fue la **hipótesis del reloj molecular**, la cual establecía que los cambios de nucleótidos para cualquier especie se acumulaban de forma constante en el tiempo. En consecuencia, las diferencias entre nucleótidos que aparecían al comparar secuencias homólogas de diferentes organismos aportaban información sobre el tiempo transcurrido desde que estos evolucionaron a partir de un ancestro común (Zuckermandl y Pauling, 1965). Sin embargo, conforme fue acumulándose evidencia molecular, la hipótesis de la constancia de la tasa de cambio nucleotídico demostró no ser totalmente correcta, aunque sigue aplicándose con éxito cuando las tasas de evolución de las especies son similares.

### 1.3.3.1. Métodos de inferencia filogenética

Para la reconstrucción filogenética a partir de datos moleculares se utilizan los métodos de inferencia filogenética. Estos métodos pretenden reconstruir las relaciones evolutivas entre los diferentes organismos en base a la comparación de sus secuencias genéticas. Las relaciones inferidas se representan gráficamente mediante **árboles filogenéticos** que actúan como modelos de la historia evolutiva para ese grupo determinado de organismos.

Podemos diferenciar dos grupos de métodos en función de la hipótesis inicial que consideran: **métodos basados en distancias genéticas** y **métodos basados en caracteres conservados**.

#### **Métodos basados en distancias genéticas**

Los métodos basados en distancias genéticas calculan para cada par de secuencias comparadas un índice de diferencia entre las mismas, denominado **distancia genética**. Este valor es una estimación de la divergencia evolutiva entre ambos taxones a partir de su evolución desde un ancestro común. Con todos los valores calculados se elabora una matriz de distancias en base al modelo evolutivo seleccionado, con la que se construye el árbol filogenético que mejor se ajusta a dichos valores, utilizando diferentes algoritmos. Estos métodos presentan el inconveniente de que reducen toda la información de la secuencia a un único valor (la distancia genética), asumiendo que este parámetro refleja la divergencia evolutiva existente, por ello, se consideran reduccionistas (Bowman y Kastenbaum, 1992). Asimismo, su éxito depende del uso de modelos evolutivos apropiados. Dos de los

métodos de este tipo son el método *Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic means* (UPGMA) y el método *Neighbour-joining* o vecino más próximo.

El **UPGMA** (Sokal y Michener, 1958) es el método de reconstrucción filogenética más sencillo de todos, inventado inicialmente para construir fenogramas taxonómicos, es decir, árboles que reflejaran las similitudes fenotípicas. Sin embargo puede ser utilizado para construir árboles filogenéticos si las tasas de evolución entre las secuencias son aproximadamente constantes, es decir, si se cumple la hipótesis del reloj molecular, de tal forma que exista una relación aproximada entre la distancia evolutiva y el tiempo de divergencia.

El método *Neighbour-joining* (Saitou y Nei, 1987) es el método basado en distancias genéticas más ampliamente utilizado. Los árboles que se obtienen con este método reconstruyen grupos con las secuencias que poseen menor distancia genética entre ellas, siguiendo el principio de mínima evolución propuesto por Saitou e Imanishi (1989). Así, el árbol obtenido a través de *Neighbour-joining* es aquel en que la suma total de las longitudes de sus ramas es la menor. Entre sus ventajas podemos destacar su rapidez de cómputo y que suele dar buenos resultados como aproximación preliminar, sin embargo, presenta algunas limitaciones, ya que únicamente muestra un árbol filogenético, la topología del cual puede variar según el orden de los taxones en el alineamiento. Uno de los programas que utilizan esta aproximación de cálculo para inferir las relaciones filogenéticas es el llamado MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) en sus diferentes versiones.

## Métodos basados en caracteres conservados

Los métodos basados en caracteres conservados operan con una matriz de caracteres discretos. Para las diferentes secuencias comparadas, cada posición nucleotídica actúa como un carácter independiente, por tanto, cuanto más largas son las secuencias que comparamos, habrá un mayor número de caracteres y se obtendrá mayor información. Esta es una de las ventajas respecto a los métodos anteriores donde la información se reduce a un único valor. Los métodos basados en caracteres conservados más utilizados son el método de **máxima parsimonia**, el método de *maximum likelihood* (máxima verosimilitud) y el método de **inferencia bayesiana**.

La idea básica del método de **máxima parsimonia** (Swofford, 2001) es simple: se trata de buscar el árbol o conjunto de árboles que minimizan la cantidad de cambios evolutivos requeridos para explicar los datos observados (Farris, 1983). Se calcula cada uno de los árboles posibles para cada matriz de datos, así como el número de cambios evolutivos asociados a cada uno de los árboles obtenidos, denominado **longitud del árbol**. A partir de las diferentes longitudes obtenidas se aplica un criterio de optimización, seleccionando aquellos árboles filogenéticos que han requerido para su obtención un menor número de pasos evolutivos. La topología que implica el menor número de pasos es, por tanto, la que se selecciona como óptima. Aunque este método es ampliamente utilizado, cabe comentar que presenta resultados erróneos cuando las tasas de evolución de los diferentes organismos estudiados son marcadamente diferentes. Esto se observa al obtener ramas del árbol más largas para aquellos organismos que presentan una tasa de sustitución más elevada, lo que se conoce como *long-branch attraction* (Felsenstein, 1978).

El método de *maximum likelihood* es un método probabilístico que utiliza un modelo de evolución para el cálculo del árbol filogenético más verosímil. Se consideran todos los árboles posibles que han podido dar lugar a las secuencias obtenidas y se calculan sus probabilidades para establecer aquel que hace más probable los datos observados (Felsenstein, 1981). Además de determinar el árbol más verosímil para el modelo evolutivo estudiado, también permite conocer cuál es el modelo evolutivo que mejor explica los datos, si se realiza la inferencia utilizando varios de ellos. Las ventajas de este método es que es estadísticamente fiable, permite utilizar modelos evolutivos complejos y es el menos afectado por la presencia de organismos con una tasa de sustitución más elevada (*long-branch attraction*), a diferencia del método de máxima parsimonia. Los inconvenientes radican en que es necesario el uso de un modelo evolutivo, por lo que la validez de los resultados dependerá de la correcta elección del modelo (Yang, 1993). Asimismo, es un método complejo computacionalmente por lo que requiere de ordenadores de gran potencia.

El método de **inferencia bayesiana** (Huelsenbeck *et al.*, 2001) determina para cada árbol la probabilidad de que se trate de la hipótesis correcta en función de las secuencias, utilizando un algoritmo de inferencia probabilística. La ventaja de este método es que permite conocer la probabilidad de todos los árboles posibles, no únicamente del mejor de ellos como en el método de *maximum likelihood*, por lo que podemos conocer si hay otra hipótesis alternativas plausibles. Se trata también de un método rápido y, aunque relativamente nuevo, está siendo cada vez más utilizado. Sin embargo, también se basa en el uso de un modelo evolutivo, por lo que, en este aspecto, presenta las mismas limitaciones que el método anterior.

### 1.3.3.2. Métodos para determinar la fiabilidad de las relaciones filogenéticas inferidas

Una vez que se han obtenido los árboles filogenéticos por uno u otro método, es necesario determinar su grado de fiabilidad. Existen diferentes métodos que permiten obtener un valor estadístico que estima los niveles de confianza de los agrupamientos obtenidos, uno de los más utilizados es el **análisis de *bootstrap*** (Felsenstein, 1985; Hillis y Bull, 1993). Este método se basa en generar un número elevado de pseudo-réplicas mediante una reordenación al azar de la matriz original de datos. El resultado final, el **índice de *bootstrap***, representa la frecuencia de conservación de cada rama en el total de árboles réplicas y se expresa en tanto por ciento. Se considera que un valor superior al 75% indica un buen soporte estadístico para la rama.

### 1.3.3.3. Genes utilizados

Las secuencias utilizadas comúnmente para el estudio filogenético de los hongos son los genes que codifican para los ARN ribosómicos (ARNr) y sus regiones espaciadoras internas (ITS). Su ventaja radica en que es una región que se encuentra repetida en tándem unas 200 veces en el genoma y esto permite que al menos una de sus copias pueda ser recuperada. Además, esta unidad génica se encuentra en todos los organismos eucariotas y su tasa de evolución varía para las diferentes regiones que lo conforman, por lo que lo convierten en una buena herramienta para realizar comparaciones filogenéticas a diversos niveles taxonómicos.

Dentro de la región repetitiva del ADN ribosómico (ADNr) se localizan dos unidades de transcripción adyacentes pero que se transcriben por separado. La mayor de ellas está formada por los tres genes ribosómicos 18S, 5.8S y 28S, dos regiones

## Introducción

---

espaciadoras internas (ITS1 e ITS2) y dos externas (ETS), mientras que la otra unidad de transcripción incluye el gen 5S. Ambas unidades codificantes están separadas, a su vez, por las regiones espaciadoras intergénicas IGS (Fig. 8).



**Fig. 8:** Esquema representativo de los diferentes exones e intrones del ADN ribosómico nuclear en eucariotas.

Los ADN<sub>r</sub> codificados por estos genes dan lugar a fragmentos estructurales de los ribosomas, por tanto, son esenciales para la síntesis de proteínas y están altamente conservados. Este es el principal motivo por el que se han utilizado ampliamente para definir relaciones a diferentes niveles, desde reino hasta especie. Las regiones ITS, a su vez, exhiben una mayor variabilidad, por lo que han sido utilizados más comúnmente para comparar y delimitar géneros o especies muy cercanos (Bruns *et al.*, 1992; Guarro *et al.*, 1999).

Sin embargo, en los últimos años se tiende a secuenciar más de un gen con el fin de realizar análisis multigénicos para incrementar la fiabilidad de los resultados obtenidos. Esta metodología es la GCPSR comentada anteriormente. La técnica en sí consiste en secuenciar fragmentos (aprox. 500 pb) de diferentes genes y realizar un análisis filogenético individual y conjunto de forma que los árboles filogenéticos obtenidos puedan compararse entre sí y obtengamos una información más fiable de las relaciones filogenéticas. Los genes utilizados, además de los anteriores, suelen ser

genes estructurales que codifican proteínas como el factor de elongación 1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ), la  $\beta$ -tubulina (BT2, TUB), etc. (Taylor y Fisher, 2003). El factor de elongación 1 $\alpha$  es una proteína situada en el citoplasma, que pertenece a la familia de las proteínas G, las cuales presentan capacidad para activarse cuando están unidas al factor GTP. Su función es la de intervenir durante el proceso de la traducción, promoviendo la unión entre el ribosoma y el nuevo aminoácido que formará parte de la cadena proteica. La proteína  $\beta$ -tubulina es una proteína globular que, junto a la  $\alpha$ -tubulina, forma el heterodímero tubulina, que constituye la subunidad básica para la formación de los microtúbulos que forman parte del citoesqueleto celular. Por su importante función estructural la tubulina es una proteína altamente conservada. En el caso del género *Fusarium*, tanto la región ITS del ADNr, el gen EF-1 $\alpha$  y el gen de la proteína  $\beta$ -tubulina, genes estudiados en la presente tesis, han sido ampliamente utilizados en diferentes estudios de filogenia molecular (O'Donnell y Cigelnik, 1997; O'Donnell *et al.*, 1998; O'Donnell, 2000; O'Donnell *et al.*, 2000; Hirata *et al.*, 2001; Skovgaard *et al.*, 2003; O'Donnell *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006; O'Donnell *et al.*, 2007).



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y FILOGENIA MOLECULAR DE ESPECIES DEL GÉNERO FUSARIUM DE INTERÉS CLÍNICO

Mónica Azor Heras

DL: T.1368-2011

## RESUMEN

- ⇒ **Fusarium Link ex Fries** es un género anamórfico, altamente cosmopolita, que actualmente está constituido por cerca de **70 especies**, las cuales pueden actuar como saprófitos, agentes fitopatógenos, e incluso patógenos oportunistas para el hombre y otros animales.
- ⇒ Las características morfológicas más importantes para la identificación de las especies de *Fusarium* son: la morfología de los **macroconidios**; la presencia, morfología y disposición de los **microconidios**; la morfología de los **conidióforos** y tipo de **célula conidiógena** y la presencia de **clamidoporas**.
- ⇒ El género causa un amplio espectro de enfermedades en el ser humano, incluyendo **micotoxicosis** y **micosis** que pueden ser superficiales, localizadas o diseminadas. Las queratitis son, probablemente, el tipo más común de infección superficial causado por el género *Fusarium* mientras que las infecciones diseminadas son de difícil tratamiento y tienen un elevado índice de mortalidad asociado.
- ⇒ **F. solani**, **F. oxysporum** y **F. verticillioides** son las especies más frecuentes en clínica aunque también han sido descritos como patógenos para el ser humano *F. dimerum*, *F. proliferatum*, *F. chlamydosporum*, *F. sacchari*, *F. nygamai*, *F. napiforme* y, más recientemente, *F. incarnatum*, *F. thapsinum*, *F. acutatum* y *F. polyphialidicum*.
- ⇒ El **tratamiento** de las infecciones por *Fusarium* difiere en función del tipo de infección. Las infecciones superficiales suelen responder bien al tratamiento tópico, mientras que podemos afirmar que no existe todavía un tratamiento realmente eficaz frente a las infecciones diseminadas.
- ⇒ La **filogenia molecular** establece las relaciones evolutivas entre distintos organismos basándose en la comparación de caracteres moleculares como las secuencias de ADN. Estas relaciones pueden representarse gráficamente mediante **árboles filogenéticos** que actúan como modelos de la historia evolutiva para un grupo determinado de organismos.
- ⇒ Actualmente, se tiende a realizar **análisis multigénicos** para incrementar la fiabilidad de los resultados obtenidos. Esta metodología se denomina GCPSR y consiste en secuenciar fragmentos de diferentes genes y realizar un análisis filogenético individual y conjunto para comparar los diferentes árboles filogenéticos obtenidos para cada gen.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y FILOGENIA MOLECULAR DE ESPECIES DEL GÉNERO FUSARIUM DE INTERÉS CLÍNICO

Mónica Azor Heras

DL: T.1368-2011

## **INTERÉS Y OBJETIVOS**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y FILOGENIA MOLECULAR DE ESPECIES DEL GÉNERO FUSARIUM DE INTERÉS CLÍNICO

Mónica Azor Heras

DL: T.1368-2011

## 2. INTERÉS Y OBJETIVOS

En las últimas décadas se ha observado un aumento de las infecciones causadas por hongos patógenos oportunistas. Este tipo de hongos produce infecciones especialmente en pacientes inmunocomprometidos a consecuencia de las enfermedades de base que sufren o por la agresividad de las técnicas de tratamiento.

El incremento en el número de infecciones por hongos oportunistas, ha venido acompañado por un cambio significativo de las especies involucradas. Además de los que podemos considerar patógenos oportunistas clásicos - *Candida*, *Cryptococcus* y *Aspergillus* -, actualmente nos enfrentamos a los llamados **patógenos oportunistas emergentes**, es decir, especies que están aumentando su prevalencia en años recientes; tal es el caso de diversas especies de los géneros *Fusarium*, *Scedosporium* o *Paecilomyces*, entre otros. Por tanto, se plantea el problema de actuar contra un número más variado de especies, para muchas de las cuales todavía se desconoce su sensibilidad a los actuales fármacos antifúngicos disponibles.

Concretamente, se ha comprobado que la sensibilidad a los antifúngicos del género *Fusarium* varía en función de la especie (Pujol *et al.*, 1997), siendo *F. solani* una de las especies más resistentes a todos los antifúngicos comúnmente usados en clínica (Arikan *et al.*, 1999; Nucci y Anaissie, 2007). Es por ello que resulta de especial interés la identificación de las especies de *Fusarium* implicadas en infecciones humanas. Sin embargo, en la mayoría de casos de fusariosis publicados el agente causal sigue siendo una incógnita, probablemente debido a que la identificación morfológica de las especies resulta una tarea ardua y compleja de realizar. Además, actualmente, teniendo en cuenta las recientes publicaciones sobre filogenia molecular

de especies de *Fusarium*, tales como *F. solani* o *F. oxysporum* (O'donnell *et al.*, 1998; O'Donnell, 2000; O'Donnell *et al.*, 2004 y Zhang *et al.*, 2006), en las cuales se pone de manifiesto la existencia de complejos de especies, se plantea el interrogante de si las especies filogenéticas obtenidas pueden llegar a tener un comportamiento diferente en cuanto a su sensibilidad antifúngica. Este hecho resultaría de gran trascendencia en clínica, ya que permitiría la aplicación de tratamientos más adecuados.

Por todo lo expuesto, los objetivos de la presente tesis son los siguientes:

1. Seleccionar los **marcadores genéticos** más adecuados para la identificación molecular de especies de *Fusarium*.
2. Confirmar la identificación morfológica y determinar el **grado de correlación entre la identificación morfológica y molecular** de las cepas de *Fusarium*, principalmente de origen clínico, incluidas en la presente tesis.
3. Determinar la existencia de **grupos filogenéticos** diferenciados entre los aislados de cada una de las especies identificadas e intentar caracterizar fenotípicamente al menos aquellos de los que dispongamos un mayor número de cepas.
4. Evaluar la **actividad *in vitro*** de diferentes antifúngicos, tanto de uso tradicional como de reciente aparición, frente a aislados de las diferentes especies de *Fusarium* de interés clínico y, en los casos en que se hallen grupos de aislados filogenéticamente distintos, averiguar si existen diferencias en cuanto a su sensibilidad antifúngica.

Las especies del género que pretendemos estudiar para la obtención de los objetivos indicados son: *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides*, como especies de mayor incidencia en clínica y, *F. chlamydosporum*, *F. dimerum*, *F. incarnatum*, *F. napiforme*, *F. nygamai*, *F. proliferatum* y *F. sacchari*, con menor incidencia, pero descritas en más de una ocasión como agentes etiológicos de fusariosis en el hombre.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y FILOGENIA MOLECULAR DE ESPECIES DEL GÉNERO FUSARIUM DE INTERÉS CLÍNICO

Mónica Azor Heras

DL: T.1368-2011

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y FILOGENIA MOLECULAR DE ESPECIES DEL GÉNERO FUSARIUM DE INTERÉS CLÍNICO

Mónica Azor Heras

DL: T.1368-2011

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. CEPAS ESTUDIADAS

##### 3.1.1. Origen y conservación

Se estudiaron un total de 152 aislados de *Fusarium* (Tabla 3), de origen principalmente clínico, enviados a la unidad de Microbiología de la *Facultat de Medicina i Ciències de la Salut* de Reus desde diferentes hospitales, nacionales e internacionales. Algunos se recibieron como aislados no identificados, otros como *Fusarium* spp. y otros identificados a nivel de especie, únicamente para su confirmación. A medida que llegaban los aislados se les asignaba un número de colección (número FMR, *Facultat de Medicina* de Reus) y, una vez identificados, se procedía a su conservación en aceite y a través de liofilización.

Para la conservación en aceite, se utilizaban sendos tubos de agar inclinado que contenían medio agar patata dextrosa (PDA; Difco Laboratories, Detroit, Mich., EE.UU.) y medio agar con infusión de patata zanahoria (PCA; 20 g de patata, 20 g de zanahoria, 15 g de agar de Pronedisa ref. 1800, 0.05 g de cloranfenicol de Acoferma y 1 L de agua destilada), respectivamente, y el cultivo se cubría totalmente con aceite de vaselina o parafina líquida estéril. Estos cultivos se almacenaban a temperatura ambiente.

El procedimiento para conservar los diferentes aislados mediante la técnica de liofilización consistía en sembrar las cepas en medio agar harina de avena (OA; 30 g de copos de avena, 1 g de MgSO<sub>4</sub>, 1,5 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 15 g de agar, 1 L de agua destilada) e incubar a 25°C, entre 7 y 15 días para obtener abundante esporulación.

## Materiales y métodos

---

Se recogía el micelio, que contenía gran cantidad de esporas, y se mezclaba con 3 mL de leche desnatada al 10%, previamente esterilizada. La mezcla así obtenida se repartía en diferentes viales estériles de vidrio de 1.5 mL de volumen, específicos para tal fin. Estos viales se introducían en el liofilizador, donde se realizaba el vacío y los viales se sometían al siguiente ciclo de temperaturas:

- 1) -30°C, 240 min
- 2) -10°C, 240 min
- 3) +10°C, 300 min
- 4) +30°C, toda la noche

Una vez finalizado el proceso se sellaban los viales y se retiraban del aparato.

Los dos métodos de conservación permitían el almacenamiento de las cepas a temperatura ambiente y una fácil recuperación posterior, por siembra directa a partir del cultivo en aceite o por recuperación del liofilizado disolviendo en agua estéril y sembrando posteriormente en placas con un medio adecuado.

Todos los aislados recibidos eran estudiados a nivel morfológico siguiendo la literatura de referencia para el género (Nelson *et al.*, 1983; de Hoog *et al.*, 2000; Nirenberg y O'Donnell, 1998; Leslie y Summerell, 2007) y la metodología que se indica en el apartado 3.2 de la presente tesis. Posteriormente eran estudiadas a nivel molecular (apartado 3.3), tanto para confirmar la identificación morfológica como para determinar la variabilidad genética existente en una determinada especie. Dichos estudios requerían la utilización de cepas de referencia, las cuales se incluyen en la Tabla 4.

**Tabla 3:** Relación de aislados recibidos para su identificación.

AISLADO	ORIGEN DE LA MUESTRA	PROCEDENCIA
<i>F. solani</i>		
FMR 4389	Clínico: piel escroto	Texas, EE.UU.
FMR 4391	Clínico: sangre	Texas, EE.UU.
FMR 7140	Ambiental: tierra acuario	Barcelona, España
FMR 7141	Ambiental: tierra acuario	Barcelona, España
FMR 7238	Clínico: úlcera	Zaragoza, España
FMR 7240	Clínico: lesión piel	Zaragoza, España
FMR 7242	Clínico: lesión pie	Zaragoza, España
FMR 7985	Clínico: queratitis	Brasil
FMR 7988	Clínico: queratitis	Brasil
FMR 7989	Clínico: queratitis	Brasil
FMR 7991	Clínico: queratitis	Brasil
FMR 7992	Clínico: queratitis	Brasil
FMR 7993	Clínico: queratitis	Brasil
FMR 7994	Clínico: queratitis	Brasil
FMR 7995	Clínico: queratitis	Brasil
FMR 7996	Clínico: queratitis	Brasil
FMR 7997	Clínico: queratitis	Brasil
FMR 7998	Clínico: queratitis	Brasil
FMR 8000	Clínico: queratitis	Brasil
FMR 8013	Clínico: queratitis	Brasil
FMR 8014	Clínico: queratitis	Brasil
FMR 8016	Clínico: queratitis	Brasil
FMR 8017	Clínico: queratitis	Brasil
FMR 8019	Clínico: queratitis	Brasil
FMR 8021	Clínico: queratitis	Brasil
FMR 8023	Clínico: queratitis	Brasil
FMR 8024	Clínico: queratitis	Brasil
FMR 8027	Clínico: queratitis	Brasil
FMR 8028	Clínico: queratitis	Brasil
FMR 8030	Clínico: queratitis	Brasil
FMR 8031	Clínico: queratitis	Brasil
FMR 8032	Clínico: queratitis	Brasil
FMR 8036	Clínico: queratitis	Brasil
FMR 8037	Clínico: queratitis	Brasil

Tabla 3 (cont.)

AISLADO	ORIGEN DE LA MUESTRA	PROCEDENCIA
FMR 8038	Clínico: queratitis	Brasil
FMR 8039	Clínico: queratitis	Brasil
FMR 8040	Clínico: queratitis	Brasil
FMR 8207	Ambiental: nemátodo	Amposta, España
FMR 8263	Ambiental: nemátodo	Amposta, España
FMR 8281	Ambiental: nemátodo	Amposta, España
FMR 8340	Clínico: fungemia	Doha, Qatar
FMR 8482	Origen clínico	Qatar
FMR 8483	Origen clínico	Qatar
FMR 8484	Ambiental: nemátodo	Amposta, España
FMR 8631	Clínico	España
FMR 8633	Clínico: uña	Venezuela
FMR 8634	Clínico: herida pie diabético	Reus, España
FMR 8666	Ambiental: nemátodo	Amposta, España
FMR 8673	Ambiental: nemátodo	Amposta, España
FMR 8688	Ambiental: nemátodo	Amposta, España
<b><i>F. verticillioides</i></b>		
FMR 4382	Clínico: sangre	EE.UU.
FMR 6488	Clínico: sangre	Río de Janeiro, Brasil
FMR 7236	Clínico: lesión cutánea	Zaragoza, España
FMR 7265	Clínico	Zaragoza, España
FMR 8585	Clínico: esputo	Reus, España
FMR 8694	Clínico: endoftalmitis	Valladolid, España
FMR 8976	-	París, Francia
FMR 9323	Ambiental: maíz	Barcelona, España
FMR 9324	Ambiental: pienso para cerdo	Barcelona, España
FMR 9325	Ambiental: pienso para caballo	Barcelona, España
FMR 9402	Clínico	EE.UU.
FMR 9403	Clínico	EE.UU.
FMR 9404	Clínico	EE.UU.
FMR 9405	Clínico	EE.UU.
FMR 9406	Clínico	EE.UU.
FMR 9407	Clínico	EE.UU.
FMR 9408	Clínico	EE.UU.
FMR 9409	Clínico	EE.UU.

Tabla 3 (cont.)

AISLADO	ORIGEN DE LA MUESTRA	PROCEDENCIA
FMR 9410	Clínico	EE.UU.
FMR 9411	Clínico	EE.UU.
FMR 9413	Clínico	EE.UU.
FMR 9415	Clínico	EE.UU.
FMR 9416	Clínico	EE.UU.
FMR 9417	Clínico	EE.UU.
FMR 9418	Clínico	EE.UU.
FMR 9419	Clínico	EE.UU.
FMR 9420	Clínico	EE.UU.
FMR 9421	Clínico	EE.UU.
FMR 9423	Clínico	EE.UU.
FMR 9425	Clínico	EE.UU.
FMR 9426	Clínico	EE.UU.
FMR 9427	Clínico	EE.UU.
FMR 9428	Clínico	EE.UU.
FMR 9429	Clínico	EE.UU.
FMR 9430	Clínico	EE.UU.
FMR 9431	Clínico	EE.UU.
FMR 9432	Clínico	EE.UU.
FMR 9433	Clínico	EE.UU.
FMR 9434	Clínico	EE.UU.
FMR 9524	Clínico: sangre	Suecia
FMR 9526	Clínico: orina	Alemania
FMR 9527	Clínico: líquido abdominal	Alemania
<b><i>F. oxysporum</i></b>		
FMR 4390	Clínico: injerto aórtico	EE.UU.
FMR 4394	Clínico: uña de pie	Chile
FMR 4396	Clínico: uña de pie	Chile
FMR 4402	Clínico: uña de pie	Chile
FMR 4942	Clínico: lesión cutánea	España
FMR 5203	Clínico: lesión cutánea	Brasil
FMR 5205	Clínico: uña de pie	Brasil
FMR 7374	Clínico: piel	Chile
FMR 7542	Ambiental: suelo	España
FMR 7709	Ambiental: suelo	España

Tabla 3 (cont.)

AISLADO	ORIGEN DE LA MUESTRA	PROCEDENCIA
FMR 7710	Ambiental: suelo	España
FMR 7711	Ambiental: suelo	España
FMR 7799	Ambiental: suelo	España
FMR 8248	Ambiental: nemátodo	Amposta, España
FMR 8916	Clínico: uña de pie	Brasil
FMR 8918	Clínico: esputo	Brasil
FMR 8925	Clínico: uña de pie	Brasil
FMR 8934	Clínico: uña de pie	Brasil
FMR 8937	Clínico: interdigital de pie	Brasil
FMR 8961	Clínico: uña de pie	Francia
FMR 8963	Clínico: uña de pie	Francia
FMR 8964	Clínico: uña de pie	Francia
FMR 8967	Clínico: piel	Francia
<b><i>F. proliferatum</i></b>		
FMR 4382	Clínico	EE.UU.
FMR 4387	Clínico	EE.UU.
FMR 5124	Clínico: uña	Reus, España
FMR 7239	Clínico: lesión cutánea	Zaragoza, España
FMR 7377	Clínico	España
FMR 9036	Clínico	París, Francia
FMR 9435	Clínico	EE.UU.
FMR 9436	Clínico	EE.UU.
<b><i>F. dimerum</i></b>		
FMR 6320	Clínico: queratitis	Brasil
FMR 9042	Clínico: queratitis	Francia
FMR 9105	Clínico: queratitis	India
FMR 9580	Clínico: queratitis	India
FMR 9584	Clínico: queratitis	India
FMR 9590	Clínico: queratitis	India
<b><i>F. incarnatum</i></b>		
FMR 4403*	Clínico	Chile
FMR 4404*	Clínico	Chile
FMR 9096	Clínico: queratitis	Tamilnadu, India
FMR 9097	Clínico: queratitis	Tamilnadu, India
FMR 9098	Clínico: queratitis	Tamilnadu, India

Tabla 3 (cont.)

AISLADO	ORIGEN DE LA MUESTRA	PROCEDENCIA
<b><i>F. nygamai</i></b>		
FMR 9775	Ambiental: <i>Sorghum bicolor</i>	Australia
FMR 9776	Ambiental: <i>Cajanus cajan</i>	India
FMR 9777	Ambiental: <i>Cajanus indicus</i>	India
FMR 9778	Ambiental: <i>Oryza sativa</i>	Marruecos
FMR 9779	Ambiental: <i>Striga hermonthica</i>	Sudan
<b><i>F. sacchari</i></b>		
FMR 9102	Clínico: queratitis	India
FMR 9103	Clínico: queratitis	India
FMR 9106	Clínico: queratitis	India
FMR 9578	Clínico: queratitis	India
<b><i>F. thapsinum</i></b>		
FMR 9412**	Clínico	EE.UU.
FMR 9422**	Clínico	EE.UU.
FMR 9424**	Clínico	EE.UU.
FMR 9531**	Ambiental: <i>Sorghum bicolor</i>	Sudáfrica
<b><i>F. chlamyosporum</i></b>		
FMR 7232	-	Argentina
FMR 9683	Ambiental: aire	Reus, España
FMR 9684	Ambiental: aire	Reus, España
<b><i>F. napiforme</i></b>		
FMR 9781	Ambiental: <i>Pennisetum typhoides</i>	Sudáfrica
FMR 9782	Ambiental: <i>Pennisetum typhoides</i>	Sudáfrica

\*Aislados recibidos como *F. equiseti*. \*\*Aislados identificados morfológicamente como *F. verticillioides*. FMR: *Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Reus*.

**Tabla 4:** Relación de cepas de referencia utilizadas en la presente tesis.

AISLADO	ORIGEN DE LA MUESTRA	PROCEDENCIA
<b><i>F. verticillioides</i></b>		
CBS 576.78 (T)	Clínico: sangre	Rusia
CBS 139.40	Ambiental: <i>Phyllocactus hybridus</i>	Italia, Pisa
<b><i>F. oxysporum</i></b>		
NRRL 25420	Ambiental: <i>Gossypium hirsutum</i>	-
NRRL 25429	-	-
NRRL 32558	-	-
NRRL 32873	-	-
NRRL 32883	-	-
<b><i>F. proliferatum</i></b>		
CBS 620.80	Ambiental: <i>Sitobion avenae</i>	Reino Unido
<b><i>F. incarnatum</i></b>		
CBS 131.73	Ambiental: <i>Musa sapientum</i>	Las Bahamas
<b><i>F. chlamydosporum</i></b>		
NRRL 32521	Clínico	EE.UU.
NRRL 34012	-	EE.UU.
NRRL 34019	-	EE.UU.
NRRL 34022	-	EE.UU.
NRRL 34033	-	EE.UU.
<b><i>F. dimerum</i></b>		
CBS 115623	-	-
<b><i>F. nygamai</i></b>		
CBS 140.95	Clínico	Egipto
CBS 675.94	Ambiental: <i>Striga hermonthica</i>	Sudan
<b><i>F. sacchari</i></b>		
CBS 223.76	Ambiental: <i>Saccharum officinarum</i>	India
<b><i>F. thapsinum</i></b>		
CBS 539.79	Clínico: micetoma	Italia
<b><i>F. napiforme</i></b>		
CBS 673.94	-	-

CBS: *Centraalbureau voor Schimmelcultures*, Utrecht, Holanda; NRRL: *National Center for Agricultural Utilization Research*, Peoria, EE.UU.

## 3.2. ESTUDIO FENOTÍPICO

El estudio fenotípico consistió en la caracterización morfológica de los aislados, a nivel macroscópico y microscópico, así como en la realización de diferentes pruebas fisiológicas. El estudio macroscópico se llevó a cabo en tres medios de cultivo diferentes para cada aislado, con el fin de determinar las características culturales. Posteriormente, se realizaron preparaciones para la observación de las estructuras microscópicas.

### 3.2.1. Estudio macroscópico

Para la caracterización macroscópica de las colonias se inocularon las cepas en placas de Petri de 9 cm de diámetro, que contenían los siguientes medios sólidos:

- agar patata dextrosa (PDA; Difco Laboratories, Detroit, MI., EE.UU.).
- agar harina de avena (OA; 30 g de copos de avena, 1 g de  $MgSO_4$ , 1,5 g de  $KH_2PO_4$ , 15 g de agar, 1 L de agua destilada).
- agar sintético bajo en nutrientes (SNA; 1 g de  $KH_2PO_4$ , 1 g de  $KNO_3$ , 0.5 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.5 g de KCl, 0.2 g de dextrosa, 0.2 g de sacarosa, 0.6 mL de 1N NaOH, 23 g de agar, 1 L de agua destilada). En este medio de cultivo se añadía un cuadrado de 1 cm<sup>2</sup> de papel de filtro estéril para favorecer la esporulación.

Según la bibliografía consultada, los medios PDA y OA son adecuados para el crecimiento general de hongos, y han sido ampliamente utilizados por diferentes

autores en el estudio del género *Fusarium* (Booth, 1971; Gerlach y Nirenberg, 1982; Nelson *et al.*, 1983; Nirenberg, 1990; Nelson *et al.*, 1994 y Aoki *et al.*, 2003). En concreto el medio PDA facilita la observación de caracteres morfológicos macroscópicos y favorece la coloración de la colonia, al aumentar la producción de pigmentos. El medio OA, sin embargo, se utiliza para favorecer la esporulación al tratarse de un medio más pobre en sustratos. El medio SNA (Nirenberg, 1976) también se utiliza para favorecer la esporulación, tanto al tratarse de un medio pobre como por el hecho de incorporar un trozo de papel de filtro estéril en la preparación de las placas. La presencia de la celulosa facilita el crecimiento del hongo, su esporulación y la formación de masas de esporodoquios.

Una vez realizada la siembra en las placas con diferentes medios se incubaron a 25°C y en oscuridad, observando las características macroscópicas de las colonias a los 7-10 días de su inoculación. Se examinaban las siguientes características de las colonias:

- color del anverso y del reverso (Kornerup y Wanscher, 1984)
- textura
- topografía
- borde
- zonas de crecimiento
- presencia de pigmento difusible
- presencia de exudado
- olor
- formación de esporodoquios

### 3.2.2. Estudio microscópico

El estudio microscópico de las cepas se realizó mediante preparaciones microscópicas para la observación de las siguientes estructuras:

- conidióforos
- células conidiógenas
- macroconidios
- microconidios
- clamidosporas

Para todas ellas se estudió su presencia o ausencia, así como el tipo, la forma y el tamaño (longitud y anchura).

Las técnicas utilizadas para la realización de las preparaciones microscópicas fueron:

#### a) Montaje directo

Todos los aislados se examinaron microscópicamente mediante preparación directa a partir de la placa de cultivo, que se preparaba de la siguiente forma: con una aguja hipodérmica se recogía una pequeña porción de la colonia y se depositaba en un portaobjetos al que previamente se le colocaba una gota de ácido láctico al 85%. Se cubría con un cubreobjetos y se sellaba con laca de uñas para evitar la desecación de la muestra. Para cada aislado se realizaron preparaciones de cada uno de los medios de cultivo de las placas incubadas a 25°C.

## b) Montaje mediante cinta adhesiva

Para realizar estas preparaciones se cortaban pequeños trozos de cinta adhesiva transparente que se adherían previamente sobre la superficie de la colonia en estudio, después se colocaban sobre el portaobjetos, el cual contenía una gota de azul de algodón-lactofenol (solución saturada de azul algodón, 10 mL; glicerina, 10 mL; agua destilada, 80 mL), orientando la cara adhesiva hacia arriba. Por último, se añadía otra gota del mismo medio de montaje sobre la cinta adhesiva y se depositaba el cubreobjetos. Este tipo de preparación permite que se adhieran a la cinta adhesiva las hifas y las diferentes estructuras reproductoras del hongo sin que se rompan o desorganicen como puede suceder al coger fragmentos del micelio con una aguja hipodérmica.

Posteriormente las preparaciones directas o realizadas con cinta adhesiva se observaban al microscopio óptico (Leitz dialux 20 EB). La toma de medidas se realizaba con el objetivo de  $\times 100$  mediante una cámara clara Olympus acoplada. Para cada cepa se tomaron medidas de un mínimo de 20 de las estructuras de cada tipo, escogidas al azar en las preparaciones directas realizadas con ácido láctico a partir de los cultivos de OA y PDA, principalmente.

Por último, se analizaron los datos estadísticamente con el test no-paramétrico U de Mann-Whitney ( $P < 0.05$ ) con el fin de determinar si había diferencias significativas entre las medidas de las estructuras examinadas. Se utilizó este test dado que se trataba de variables independientes y, además, los datos comparados no seguían una distribución normal. El análisis se realizó en paralelo al estudio molecular y únicamente para las cepas de *F. solani*, con el fin de determinar si existían diferencias

morfológicas entre los diferentes grupos moleculares obtenidos. Este test forma parte del paquete de programas estadísticos SPSS para Windows en las versiones 9.0 y 10.0 y permite ordenar los datos de dos grupos dados y determinar unos rangos, que luego son comparados entre sí.

Para recopilar todos los datos morfológicos de un mismo aislado y facilitar el estudio comparativo de los mismos se procedió a rellenar, para cada uno de ellos, la ficha que se muestra en la figura 9.

La documentación gráfica se realizó mediante dibujo a mano alzada de las preparaciones observadas a través del microscopio Olympus BH-2 con una cámara de dibujo acoplada y utilizando el objetivo de  $\times 100$ .

### 3.2.3. Estudio fisiológico

El estudio fisiológico incluyó la determinación de la tasa de crecimiento a 25°C para todas las cepas de las distintas especies de *Fusarium* estudiadas en la presente tesis. Para los aislados identificados morfológicamente como *F. solani*, que eran los mayoritarios, el estudio fisiológico fue más exhaustivo y también se realizaron tests de crecimiento a diferentes temperaturas, así como otras pruebas fisiológicas que se detallan a continuación.

#### 3.2.3.1. Tasa de crecimiento a diferentes temperaturas

El ensayo consistió en la siembra por duplicado de los aislados en placas Petri de 9 cm de diámetro con medio PDA, y posterior incubación en oscuridad a 25°C, para todos los aislados, y a 15, 25, 35, 40 y 45°C para los aislados de *F. solani*.

Materiales y métodos

CARACTERES CULTURALES:		Nº DE CEPA:		
MEDIO PDA	MEDIO OA	MEDIO SNA		
Morfología colonia:	Morfología colonia:	Morfología colonia:		
Pigmento:	Pigmento:	Pigmento:		
Reverso:	Reverso:	Reverso:		
CARACTERES MICROSCÓPICOS:				
MACROCONIDIOS				
Medio:				
Morfología:				
Nº de septos	2	3	4	+
Longitud (µm)				
Anchura (µm)				
MICROCONIDIOS				
Medio:				
Morfología:				
Nº de septos	0	1	2	3
Longitud (µm)				
Anchura (µm)				
CLAMIDOSPORAS				
Medio:				
Morfología:				
CÉLULA CONIDIÓGENA: (producción de microconidios)				
CONIDIÓFORO:				

**Fig. 9:** Ficha utilizada para recoger los datos morfológicos de cada uno de los aislados estudiados.

Se medía el diámetro de crecimiento de las colonias después de 4 y 7 días de incubación para las temperaturas de 15, 25 y 35°C y, después de 10 días para las temperaturas de 40 y 45°C. Los datos se analizaban estadísticamente con el test no-paramétrico U de Mann-Whitney, con un valor de significación estadística de  $P < 0.05$ , para determinar si los aislados presentaban diferencias de crecimiento entre sí.

### 3.2.3.2. Asimilación de azúcares y fuentes de nitrógeno

El estudio se realizó utilizando el método de microdilución para un total de 40 compuestos que se detallan a continuación.

#### 3.2.3.2.1. Compuestos estudiados

Se estudió el crecimiento de los aislados en presencia de 34 fuentes de carbono, todas ellas a una concentración de 26 g/L:

- Hexosas: D-fructosa, D-galactosa, D-glucosa, D-manosa y L-sorbosa
- Disacáridos: celobiosa, lactosa, maltosa, melibiosa, sacarosa y trehalosa
- Trisacáridos: D-melecitosa y rafinosa
- Polisacáridos: dextrina
- Pentosas: D-arabinosa, L-arabinosa, L-ramnosa, D-ribosa y D-xilosa
- Alcoholes: L-arabinitol, etanol, glicerol, D-glucitol, inositol, D-manitol, metanol, ribitol y xilitol
- Ácidos orgánicos: ácido cítrico, ácido láctico, ácido málico y ácido tánico
- Glicósidos: salicina
- Otros compuestos: D-glucosamina

También se realizó el estudio de asimilación de 6 compuestos como fuentes de nitrógeno: cadaverina, creatina, creatinina, L-lisina, nitrato y nitrito. Las concentraciones fueron diferentes en cada caso y se detallan en el siguiente apartado.

#### 3.2.3.2.2. Preparación de las microplacas

Todos los tests se realizaron en medio líquido siguiendo los métodos estandarizados por Yarrow (1998), pero utilizando microplacas estériles debido al elevado número de compuestos a estudiar. La metodología utilizada fue la siguiente:

##### a) Estudio de asimilación de azúcares

Se preparaba medio de cultivo líquido, según las siguientes indicaciones: se disolvían 6.7 g del medio *Bacto Yeast Nitrogen Base* (Becton Dickinson Co., Sparks, MD., EE.UU.) en 100 mL de agua destilada estéril y se añadían 2.6 g de cada una de las diferentes fuentes de carbono a estudiar. Se esterilizaba por filtración y se guardaba en refrigeración o bien se dispensaba en las microplacas directamente. En cada pocillo se añadían 150 µl del medio indicado.

##### b) Estudio de asimilación de fuentes de nitrógeno

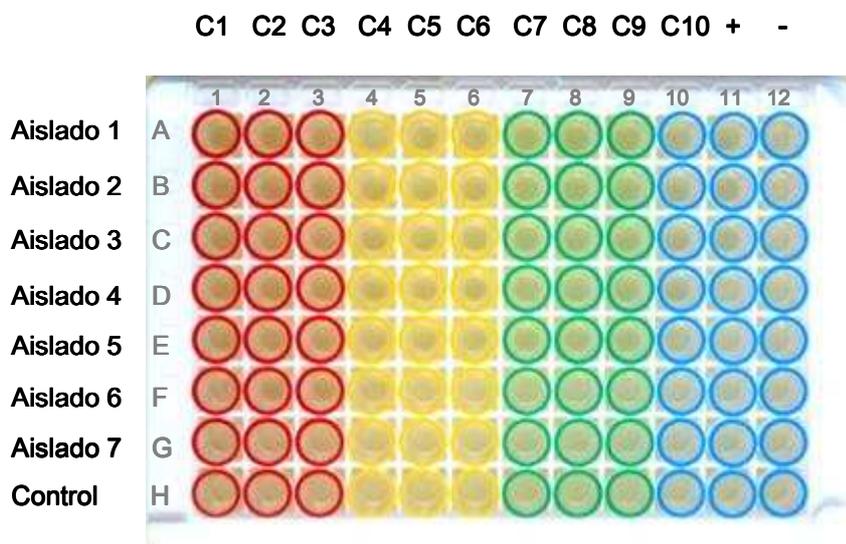
Se preparaba el medio de cultivo líquido de forma similar. En este caso se disolvían 11.75 g *Bacto Yeast Carbon Base* (Becton Dickinson Co., Sparks, MD., EE.UU.) en 100 mL de agua destilada estéril junto con la fuente de nitrógeno a estudiar en cada caso. Las concentraciones utilizadas fueron las siguientes:

- Cadaverina: 9 g/L
- Creatina: 2.6 g/L

- Creatinina: 2.6 g/L
- L-lisina: 7.5 g/L
- Nitrato de potasio: 10.4 g/L
- Nitrito de sodio: 3.4 g/L

Igualmente, se esterilizaba por filtración y se procedía a dispensarlo en las microplacas.

En ambos estudios, se utilizaban las dos columnas finales para el control positivo y negativo. El control positivo contenía 150  $\mu$ l de *Bacto Yeast Nitrogen Base* con glucosa como fuente de carbono, para comprobar el crecimiento del hongo. El control negativo consistía en 150  $\mu$ l de uno de los dos medios sin ninguna fuente de carbono ni nitrógeno añadida para observar que no había crecimiento. En cada microplaca se estudiaban un total de 10 compuestos diferentes (uno por columna) (Fig. 10).



**Fig. 10:** Esquema de la distribución de los compuestos y aislados a estudiar en una microplaca. C1-...-C10: diferentes compuestos a estudiar; +: indica el control positivo; -: indica el control negativo.

### 3.2.3.2.3. Preparación del inóculo

Los aislados a estudiar se sembraron en placas de PDA y se incubaron a 25°C durante 7 días, con la finalidad de obtener abundante esporulación. Con la ayuda de una asa de siembra se procedió a rascar la superficie de la placa, arrastrando parte de la colonia del hongo en crecimiento. La masa así obtenida que contenía hifas, conidios y fragmentos del medio se transfería a un tubo con 10 mL de agua destilada estéril. Después de homogeneizar, la solución se filtraba a través de una gasa estéril, para obtener una suspensión final constituida únicamente por conidios. Las suspensiones así obtenidas se ajustaban a una concentración de  $10^2$  conidios/mL mediante recuento en cámara de Neubauer (Fig. 11). Esta concentración se verificaba a su vez por recuento en placa, sembrando 0.1 mL de las diluciones  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  en placas de PDA.



**Fig. 11:** Recuento de conidios utilizando la cámara de Neubauer.

Se añadían 50  $\mu$ l del inóculo así obtenido para cada aislado en los diferentes pocillos de cada fila, obteniendo un volumen total de 200  $\mu$ l. En cada microplaca era posible estudiar 7 aislados diferentes (uno por fila) más la cepa control *Paecilomyces variotii* ATCC 36257 que añadíamos en la fila nº 8 (Fig. 10). Las pruebas se realizaron por duplicado para cada aislado.

Tras añadir el inóculo, las microplacas se incubaban a 25°C durante 5 días, periodo tras el cual se realizaba una primera comprobación del crecimiento. La lectura final se realizaba a los 10 días.

### 3.2.3.3. Crecimiento a diferentes concentraciones de NaCl, MgCl<sub>2</sub> y cicloheximida

La tolerancia a la presencia de NaCl, MgCl<sub>2</sub> y cicloheximida se estudió utilizando el mismo método de microdilución, explicado en el apartado anterior. Tanto la distribución de la microplaca como la preparación del inóculo se realizaron de igual modo aunque en este caso el medio base utilizado fue *Bacto Yeast Nitrogen Base* suplementado con 5 g/L de glucosa como fuente de carbono (de Hoog *et al.*, 1994). Las concentraciones estudiadas fueron 2%, 5%, 7% y 10% para NaCl y MgCl<sub>2</sub> y 0.05% y 0.1% para la cicloheximida (de Hoog *et al.*, 1994).

### 3.2.3.4. Otras pruebas

Para el resto de pruebas realizadas se siguieron los métodos que se detallan a continuación, basados en el trabajo de Yarrow (1998).

#### **Prueba de la ureasa**

Esta prueba permite determinar la capacidad de los aislados para hidrolizar la urea por acción del enzima ureasa. El proceso implica la obtención final de dos moléculas de amoníaco con un incremento del pH del medio. Se utilizaron tubos con medio agar urea *Christensen* inclinado que se preparó de la siguiente manera: se disolvieron 1 g de peptona, 5 g de NaCl, 2 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 12 µg de rojo fenol en 1 L de agua destilada, ajustando el valor de pH a 6.8. Se añadieron 20 g de agar y se

autoclavó a 121°C durante 15 minutos. Una vez preparado el medio, se dispensaban de 4 a 5 mL en tubos de 10 mL. Por último, se añadía a cada tubo 0.5 mL de solución de urea al 20% previamente esterilizada por filtración.

Los tubos se inocularon y se incubaron a 25°C durante 96 h. Después de este tiempo se procedió a la lectura de la prueba. El indicador rojo fenol permitía detectar el aumento de pH producido al variar el color del medio de amarillo pálido a rosa fucsia. Por tanto, la aparición de coloración rosa fucsia nos indicaba un resultado positivo de la prueba (de Hoog *et al.*, 1994; Ghosh *et al.*, 2002).

### **Producción de ácidos**

El estudio de producción de ácidos a partir de la glucosa se realizó utilizando tubos que contenían medio *chalk agar Cluster* inclinado (Yarrow, 1998). Este medio se preparó con 50 g de glucosa, 5g de carbonato cálcico en polvo, 5 g de extracto de levadura en polvo y 20 g de agar, todo ello disuelto en 1 L de agua destilada. Por último, el medio se autoclavó a 121°C durante 15 min. Posteriormente se enfrió en un baño de agua termostatzado hasta los 45°C de temperatura. Se procedió a agitarlo y a dispensarlo en tubos de 10 mL dejándolos enfriar totalmente sobre una superficie inclinada. Una vez preparados los tubos, se procedió a inocularlos y a incubarlos a 30°C durante 4 semanas. Cada dos días se examinaban para comprobar la aparición de transparencia en torno al punto de inoculación. Esto indicaría un resultado positivo de la prueba ya que el carbonato cálcico se disolvería debido a la producción del ácido por el hongo.

## Formación extracelular de polisacáridos

La formación extracelular de polisacáridos se determinó utilizando placas Petri que contenían medio de agar sólido (Yarrow, 1998). Este medio se preparaba disolviendo 10 g de glucosa, 6.7 g de *Bacto Yeast Nitrogen Base* y 15 g de agar en un litro de agua. A continuación se esterilizaba autoclavando a 121°C durante 15 min. Por último, se dispensaba el medio en las placas Petri. Después de ser inoculadas, las placas se incubaban durante 2-3 semanas a 25°C. Una vez crecido el hongo se añadía solución de Lugol (1 g de yodo y 2 g de yoduro potásico disueltos en 300 mL de agua destilada) y se examinaba la placa para observar la aparición de un color azul verdoso al entrar en contacto la solución yodada con el polisacárido. Esto correspondería a un resultado positivo de la prueba.

## 3.3. ESTUDIO MOLECULAR

### 3.3.1. Selección de genes

Entre los diversos genes que actualmente se utilizan para llevar a cabo estudios moleculares en hongos filamentosos, se escogieron aquellos fragmentos que, según la bibliografía consultada, ya se habían utilizado en estudios filogenéticos para otras especies, mostrando una mayor variabilidad a nivel intraespecífico. Inicialmente, se seleccionaron un total de siete regiones: dos correspondientes al ADNr y cinco a genes estructurales. En concreto, se secuenciaron la región denominada D1-D2 (O'Donnell y Cigelnik, 1997) y las regiones espaciadoras internas (ITS) (White *et al.*, 1990) del ADNr, el gen que codifica para la proteína calmodulina (CAL) (Carbone y Khon, 1999), el gen que codifica para la proteína quitina sintasa 1 (CHS-1) (Carbone y

Khon, 1999), dos regiones diferentes del gen que codifica para la proteína  $\beta$ -tubulina (BT2 y TUB) (Glass y Donaldson, 1995; Cruse *et al.*, 2002 y O'Donnell y Cigelnik, 1997) y el gen que codifica para el factor de elongación  $1\alpha$  (EF- $1\alpha$ ) (Carbone et Khon, 1999). Tras realizar un estudio preliminar donde se secuenciaron las siete regiones para 12 aislados de *F. solani* escogidos al azar, se seleccionaron aquellas tres que presentaban una mayor variabilidad, para realizar los estudios moleculares con las diferentes especies de *Fusarium*. Las zonas escogidas fueron: la región ITS del ADNr, la región TUB del gen para la proteína  $\beta$ -tubulina y el gen del factor de elongación  $1\alpha$  (EF- $1\alpha$ ). El proceso de secuenciación se realizó siguiendo los pasos que se explican seguidamente.

### 3.3.2. Extracción de ADN

Los aislados eran sembrados en placas de medio PDA e incubados a 25°C durante 7 días hasta obtener una esporulación adecuada. El proceso de extracción del ADN fúngico se realizaba utilizando el *Fast DNA kit* (Bio101®, Vista, California, EE.UU.). Este kit contiene tanto los tubos de microcentrífuga adecuados para el proceso como las diferentes soluciones necesarias.

El protocolo a seguir era el siguiente: a un tubo de microcentrífuga de 2 mL se añadían 1000  $\mu$ L de la solución *CLS-Y*, que incluía sustancias estabilizantes del ADN. A su vez, estos tubos contenían una esfera de cerámica y pequeñas bolitas de material plástico para favorecer el proceso de homogeneización. A continuación, se introducía el material fúngico obtenido por raspado de la colonia. Los tubos eran colocados durante 30 segundos en un rotor de alta velocidad diseñado para este kit (*FastPrep® Instrument* FP120), tras lo cual se enfriaban 10 minutos en hielo y se

volvían a introducir en el rotor para asegurar una correcta homogeneización. Posteriormente, se centrifugaban durante 5 min a 14000 rpm para separar los restos celulares y las proteínas. Se transferían 600  $\mu$ L del sobrenadante a otro tubo de microcentrífuga de 2 mL y se agregaban 600  $\mu$ L más de la solución *Binding Matrix* que contiene una matriz de fijación para el ADN; se incubaba durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación se centrifugaba durante 1 min a 14000 rpm y el precipitado (matriz + ADN) resultante era resuspendido en 500  $\mu$ L de una solución de lavado (*SEWS-M*) con ayuda de un agitador. Se centrifugaba de nuevo durante 1 min a 14000 rpm eliminando el sobrenadante cuidadosamente con una micropipeta. Para recuperar el ADN fijado en la matriz, se añadían 100  $\mu$ L de una solución de aclarado (*DES*) que se dejaba actuar 3 min a temperatura ambiente. Se centrifugaba de nuevo durante 1 min a 14000 rpm y se recogía el sobrenadante. Éste se transfería a un tubo de microcentrífuga de 1.5  $\mu$ L y a continuación, para eliminar los restos de partículas procedentes de la matriz, se centrifugaba nuevamente durante 1 min a 14000 rpm. Por último se recogía el sobrenadante así obtenido que contenía el ADN limpio.

La solución final se cuantificaba utilizando el *GeneQuant pro* (Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, Reino Unido) para determinar la cantidad de ADN obtenida y su grado de pureza. Este aparato es un espectrofotómetro que mide la absorción del ADN a 260 nm y la absorción de las proteínas a 280 nm. La pureza se estima por la relación entre ambas absorbancias ( $A_{260}/A_{280}$ ) que nos indica la posible contaminación por proteínas del ADN obtenido. Consideramos que el proceso de extracción ha sido correcto cuando la concentración obtenida se sitúa entre 200-1000 ng/ $\mu$ L.

### 3.3.3. Procesos de amplificación y secuenciación

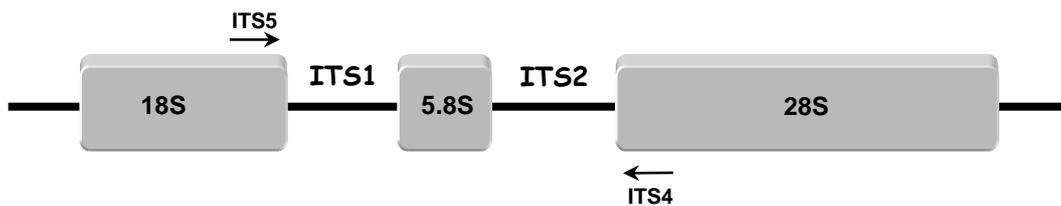
Para amplificar y secuenciar cada una de las regiones que se mencionan en el apartado 3.3.1. se utilizaron los cebadores que se detallan en la Tabla 5. El par de cebadores BT2-F y BT2-R son degenerados y se diseñaron a partir de los cebadores BT2-a y BT2-b, publicados en el trabajo de Glass y Donaldson (1995):

**Tabla 5:** Secuencias de los cebadores utilizados.

REGIÓN	CEBADORES	SECUENCIAS
BT2 (500 pb)	BT2-F	5'-GG[CT]AACCA(AG)AT(ATC)GGTGC(CT)GC(CT)-3'
	BT2-R	5'-ACCCTC(AG)GTGTAGTGACCCTTGGC-3'
CAL (800 pb)	CAL-228F	5'-GAGTTCAAGGAGGCCTTCTCCC-3'
	CAL-737R	5'-CATCTTTCTGGCCATCATGG-3'
CHS-1 (300 pb)	CHS-79F	5'-TGGGGCAAGGATGCTTGGAAGAAG-3'
	CHS-354R	5'-TGGAAGAACCATCTGTGAGAGTTG-3'
D1-D2 (600 pb)	NL1	5' -GCATATCAATAAGCGGAGGAAAA-3'
	NL4	5' -GGTCCGTGTTTCAACGG-3'
EF-1 $\alpha$ (600 pb)	EF-1H	5'-ATGGGTAAGGAAGACAAGAC-3'
	EF-2T	5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3'
ITS (500 pb)	ITS5	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'
	ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
TUB (450 pb)	TUB-F	5'-CTGTCCAACCCCTTTACGGCGACCTGAAC-3'
	T22	5'-TCTGGATGTTGTTGGGAATCC-3'

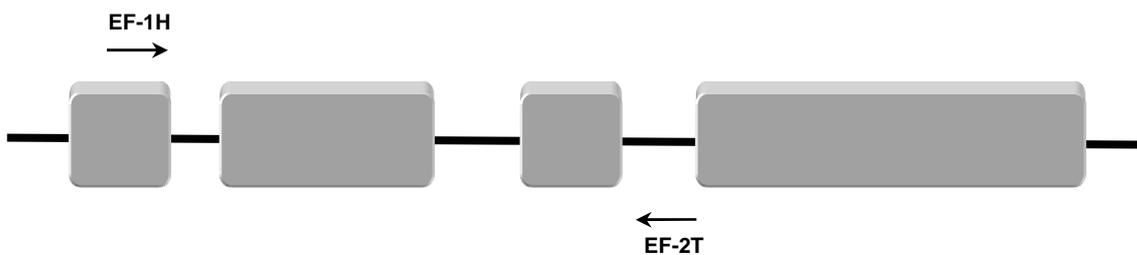
A continuación mostramos el esquema de las regiones seleccionadas y las zonas de unión de los cebadores.

En la figura 12 se muestra la región del ADNr (región ITS) amplificada y los puntos de unión de los cebadores utilizados, ITS5 e ITS4 (tabla 5) que fueron descritos por White y colaboradores (1990):



**Fig. 12:** ADN ribosómico nuclear y puntos de unión de los cebadores ITS5 e ITS4.

En la figura 13 se muestran la región amplificada y los puntos de unión de los cebadores EF-1H y EF-2T (tabla 5) para el gen del factor de elongación, EF-1 $\alpha$ . Dichos cebadores fueron descritos por O'Donnell (2000):

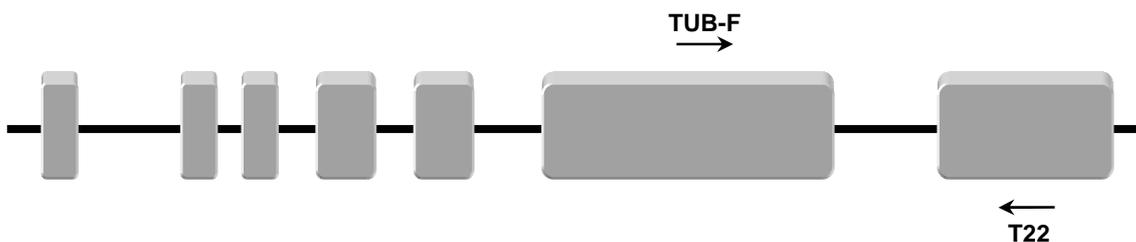


**Fig. 13:** Gen del factor de elongación y puntos de unión de los cebadores EF-1H y EF-2T.

La figura 14 muestra un esquema completo del gen que codifica para la proteína  $\beta$ -tubulina y los puntos de unión de los cebadores utilizados para amplificar la zona seleccionada, TUB-F y T22 (tabla 5). Estos cebadores fueron descritos por Cruse y colaboradores (2002) y por O'Donnell y Cigelnik (1997), respectivamente:

## Materiales y métodos

---



**Fig. 14:** Gen de la  $\beta$ -tubulina y puntos de unión de los cebadores TUB-F y T22.

El proceso de amplificación se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Cada reacción de PCR se desarrolló en un volumen final de 25  $\mu$ L. La mezcla de reacción incluía de 20 a 60 ng de ADN fúngico, 10 mM Tris HCl (pH 8.3), 50 mM KCl y 2.5 mM  $MgCl_2$  (Roche molecular Systems, Branchburg, NJ, EE.UU.), 100  $\mu$ M de cada dNTP (Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.), 1  $\mu$ M de cada cebador y 1.5 U de AmpliTaq ADN polimerasa (Roche). Las reacciones de amplificación se realizaban en un termociclador Perkin-Elmer 2400 (Cetus Co., Emeryville, California, EE.UU.).

El programa de amplificación utilizado para todos los fragmentos fue el siguiente:

1. desnaturalización inicial: 5 min a 94°C
2. 35 ciclos:
  - i. desnaturalización: 30 s a 95°C
  - ii. hibridación: 1 min a 55°C
  - iii. extensión: 1 min a 72°C
3. extensión final: 7 min a 72°C

Una vez terminado el proceso se tomaban 2  $\mu$ L de cada reacción para visualizar el producto resultante por electroforesis en geles de agarosa al 2% (*agarose* MP, Boehringer, Mannheim, Alemania). Para comprobar el tamaño de los amplificadores se añadía el marcador de peso molecular 100 pb *Ladder* (Invitrogen, Groningen, Holanda). Los productos finales obtenidos eran purificados mediante el *kit* de purificación *GFX™ PCR ADN* (Pharmacia Biotech, Cerdanyola, España), siguiendo las indicaciones del fabricante, y almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la secuenciación.

Para realizar el proceso de secuenciación se seguía el protocolo recomendado por la casa comercial, *Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, Gouda, Holanda). Las reacciones se llevaban a cabo en el termociclador antes mencionado y utilizando los mismos cebadores que en la reacción de amplificación, pero en este caso por separado para obtener cada cadena de forma independiente. Seguidamente, las diferentes muestras se inyectaban en el secuenciador capilar *ABI Prism 310 Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*) para realizar el proceso de secuenciación. Este proceso permitía obtener las secuencias para cada cadena de forma independiente las cuáles se unían utilizando el programa *Autoassembler* (*Applied Biosystems*) de forma que se generaba la secuencia consenso. Por último, se comprobaba que la secuencia consenso obtenida correspondía al fragmento esperado por comparación con las secuencias depositadas en la base de datos internacional del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Para esto se utilizaba el programa BLAST (*Basic Local Alignment and Search Tool*) disponible a través de una página web ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)), el cual permite encontrar regiones de similitud entre secuencias biológicas.

### 3.3.4. Alineación de secuencias y análisis filogenético

Las secuencias se alinearon utilizando el programa informático Clustal X (versión 1.8) (Thompson *et al.*, 1997) y se corrigieron visualmente con un procesador de texto (Microsoft Word 2004). Para el estudio preliminar, la obtención de los árboles se realizó mediante el método basado en distancias genéticas *Neighbour-joining* o vecino más próximo (Saitou y Nei, 1987) debido a su mayor rapidez de cálculo, usando para ello el programa MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) version 3.1 (Kumar *et al.*, 2004).

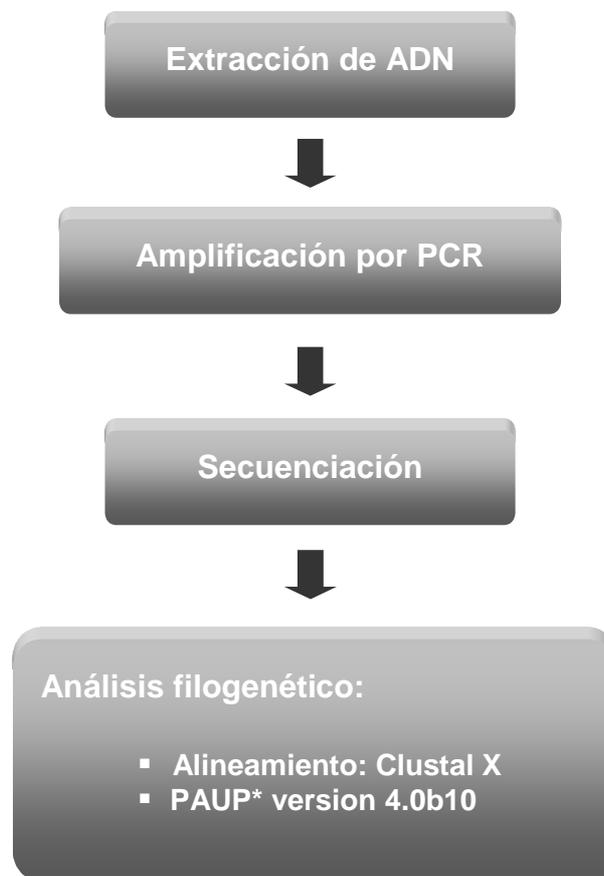
Los árboles de máxima parsimonia se obtuvieron utilizando el programa informático PAUP\* (*Phylogenetic Analysis Using Parsimony*) en su versión 4.0b10 (Swofford, 2001). Se realizó una búsqueda heurística con 100 réplicas utilizando la adición aleatoria de secuencias (*random sequence addition*). Esto es debido a que el orden en que se sitúan las secuencias puede variar los resultados del análisis por lo que la búsqueda se repite varias veces añadiendo las secuencias de forma aleatoria. Para optimizar la probabilidad de obtener la topología óptima, se utilizó la opción de intercambio de ramas (*branch-swapping*) de tipo bisección-reconexión de árboles (*tree bisection and reconnection*, TBR), que consiste en realizar cortes en las ramas internas para reconectarlas en todas las posiciones, dando lugar al mayor número de topologías posibles. No se consideraron los gaps como posiciones informativas y se salvaron todos aquellos árboles que presentaban una menor longitud o menor número de pasos utilizando la opción *Multrees* que aparece por defecto. Además del número de pasos, en los análisis se obtuvieron los valores para el índice de homoplasia (IH), el índice de consistencia (IC) y el índice de retención (IR). El IH es un valor indicativo de la existencia de homoplasia (similitud no debida al parentesco) entre las secuencias

estudiadas y debe ser el mínimo posible para el árbol obtenido. El IC es el cociente entre el número de cambios presentes entre las secuencias y el número de cambios obtenido para el árbol filogenético. Si no hay homoplasia ambos números son iguales y el valor de IC ha de ser 1. El IR es la diferencia que existe entre el valor de IC obtenido y el valor máximo posible.

Una vez obtenidos los diferentes árboles para cada gen, se evaluó la fiabilidad de los grupos moleculares obtenidos mediante el método de *bootstrapping*, generando 500 pseudoréplicas. También se aplicó el *Kishino-Hasegawa test* (Kishino y Hasegawa, 1989) que permite comparar las diferentes topologías de los árboles y establecer cuál es la más correcta. Para verificar el nivel de congruencia entre la información de los diferentes genes y, por tanto, la posibilidad de obtener el árbol conjunto se utilizó el test ILD (*Incongruence Length Difference*) con un valor de significación estadística de  $P < 0.05$ , también denominado en el software del programa como test PHT (*Partition Homogeneity Test*). Estos tests se hallan incorporados en el programa PAUP\*. Un esquema del proceso global puede observarse en la figura 15.

### 3.3.5. Depósito de secuencias

Las secuencias obtenidas a partir de las cepas estudiadas en la presente tesis se depositaron en la base de datos online del *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL) de ámbito internacional.



**Fig. 15:** Esquema global del proceso.

#### 3.4. ESTUDIO DE SENSIBILIDAD *IN VITRO* A LOS ANTIFÚNGICOS

Se estudió la sensibilidad antifúngica de un total de 132 aislados de *Fusarium* pertenecientes a las siguientes especies: *F. solani* (27 aislados), *F. oxysporum* (28 aislados), *F. verticillioides* (24 aislados), *F. proliferatum* (9 aislados), *F. incarnatum* (9 aislados), *F. chlamydosporum* (8 aislados), *F. dimerum* (7 aislados), *F. nygamai* (7 aislados), *F. sacchari* (5 aislados), *F. thapsinum* (5 aislados) y *F. napiforme* (3 aislados).

### 3.4.1. Antifúngicos utilizados

Se ensayaron un total de 11 antifúngicos para cada una de las especies mencionadas, los cuales fueron suministrados directamente por los laboratorios fabricantes como sustancia pura en polvo. Todos ellos se almacenaban a temperatura ambiente, excepto la terbinafina que se guardaba en nevera a 4°C. Los productos utilizados se citan a continuación:

- anfotericina B (AMB; Squibb Industrial Farmacéutica S.A., Barcelona, España)
- albaconazol (ABC; J. Uriach & Cía, Barcelona, España)
- voriconazol (VRC; Pfizer Inc., Madrid, España)
- itraconazol (ITC; Janssen Pharmaceutica, Beerse, Bélgica)
- ravuconazol (RVC; Bristol-Myers Squibb Company, New Jersey, EE.UU.)
- terbinafina (TBF; Novartis, Basel, Suiza)
- ketoconazol (KTC; USP, Rockville, EE.UU.)
- posaconazol (PSC; Schering-Plough Research Institute, New Jersey, EE.UU.)
- micafungina (MFG; Fujisawa Pharmaceutical Co. Ltd., Osaka, Japón)
- fluconazol (FLC; Pfizer Inc., Madrid, España)
- 5-fluorocitosina (5-FC; Sigma-Aldrich corp., St. Louis, EE.UU.)

### 3.4.2. Metodología

El método empleado para el estudio *in vitro* de la sensibilidad antifúngica ha sido descrito básicamente en el documento M38-A (NCCLS, 2002), aunque, tras su aparición, se tuvieron en cuenta las modificaciones incluidas en el documento M38-A2

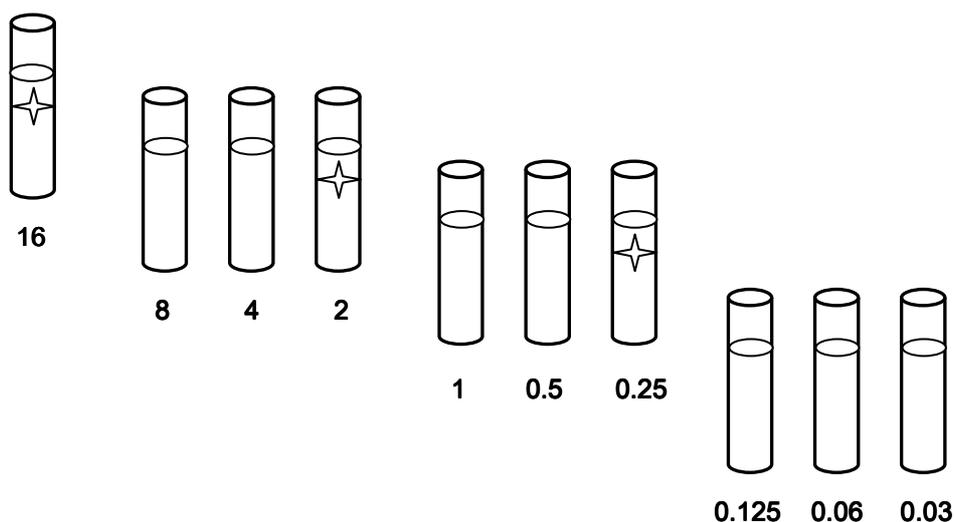
(CLSI, 2008). El método se basa en el uso de la técnica de microdilución y pasamos a detallarlo a continuación.

#### 3.4.2.1. Preparación de las microplacas

Previamente, fue necesario establecer el rango de concentraciones a ensayar para cada antifúngico. En general, para la mayoría de antifúngicos se utilizó el rango recomendado en el documento M38-A (NCCLS, 2002), de 16 a 0.03 mg/L, excepto para la 5-FC en que el rango fue de 64 a 0.125 mg/L, y para FLC y FK en que los rangos estudiados fueron de 128 a 0.25 mg/L, según la bibliografía consultada.

Para obtener las diferentes concentraciones a estudiar de cada antifúngico se siguieron los siguientes pasos: la disolución inicial del antifúngico o solución madre se realizaba siguiendo las indicaciones del fabricante. Para la mayoría de ellos se utilizaba como disolvente el compuesto dimetil sulfóxido (DMSO, Panreac Química S.A., Barcelona, España) al ser insolubles en agua. En el caso de la MFG, el FLC y la 5-FC se utilizaba agua destilada estéril.

A continuación, se preparaba un banco de **diluciones dobles seriadas** utilizando como disolvente DMSO, siguiendo el esquema que se muestra en la figura 16, para obtener el rango de concentraciones deseado. Las diferentes diluciones se obtenían siguiendo un esquema que minimiza los errores de pipeteo: a partir del tubo inicial que contiene la solución madre, de mayor concentración, se preparan los tres tubos siguientes; a partir del último tubo así obtenido se repetía el proceso de forma similar hasta finalizar la serie de diluciones.



**Fig. 16:** Esquema de diluciones dobles seriadas. Los tubos señalados son los que se utilizan para preparar los tres siguientes de la serie. Los números se refieren a las concentraciones expresadas en mg/L.

Posteriormente se diluía el contenido de cada uno de los tubos en medio RPMI en proporción 1:50. El medio RPMI se preparaba disolviendo 10.43 g de RPMI (Invitrogen, Gran Island, New York, EE.UU.), 34.53 g de MOPS (SIGMA-ALDRICH, Inc., St. Louis, Missouri, EE.UU.) en 1 L de agua destilada, ajustando el valor de pH a 7 con NaOH 10 N y esterilizando por filtración. Las diluciones obtenidas tras añadir el medio RPMI se dispensaban en las microplacas (100  $\mu$ L/pocillo) con la ayuda de una micropipeta multicanal. Cada dilución se dispensaba en una columna empezando por la columna 10 en orden creciente de concentración. Las dos columnas 11 y 12 se rellenaban con medio RPMI + 2% DMSO y se utilizaban como control negativo (sin presencia de hongo) y control positivo (sin presencia de antifúngico). Esta distribución de las diferentes soluciones seriadas del antifúngico en la microplaca permitían realizar las pruebas de sensibilidad para 7 aislados, uno en cada fila, reservando la fila

## Materiales y métodos

8 para la cepa control *Paecilomyces variotii* ATCC 36257, tal y como se observa en la figura 17.

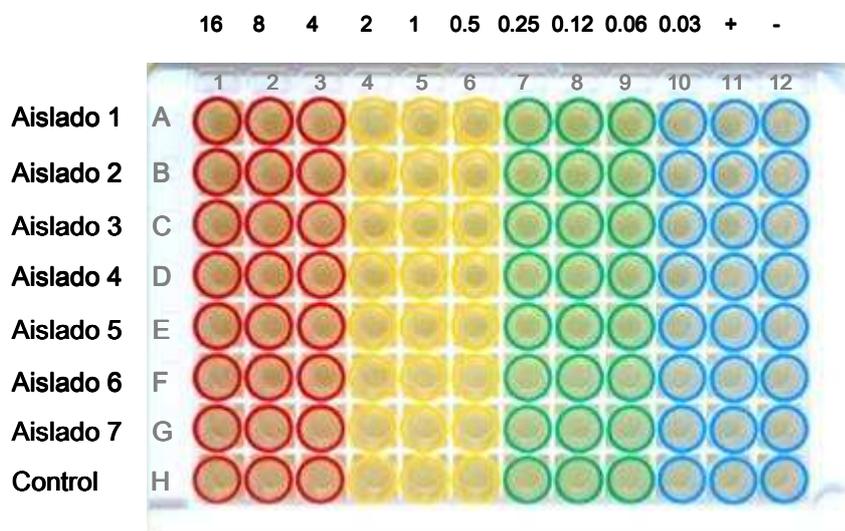


Fig. 17: Esquema de la distribución de las diferentes concentraciones para el rango recomendado (de 16 a 0.03 mg/L) y de los aislados a estudiar en la microplaca.

Las placas se congelaban a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su conservación hasta un máximo de dos meses. En el momento de utilizarlas se descongelaban a temperatura ambiente y se procedía a dispensar  $100\ \mu\text{L}$ /pocillo del inóculo previamente preparado.

### 3.4.2.2. Preparación del inóculo

Para preparar el inóculo se seguía el mismo procedimiento explicado en el apartado 3.2.3.2.3. pero ajustando su concentración mediante la cámara de Neubauer (Fig. 11) a un valor entre  $4 \cdot 10^5$  y  $5 \cdot 10^6$  UFC/mL. Por último, se realizaban diluciones 1/50 en medio RPMI de cada inóculo y se procedía a dispensarlo en cada fila de las microplacas.

### 3.4.2.3. Lectura e interpretación de resultados

Una vez dispensado el inóculo se procedía a incubar las microplacas a una temperatura de 35°C. La lectura de los resultados se realizó a las 48 horas de incubación confirmándose a las 72 horas. Para la lectura se utilizó un espejo invertido (Fig. 18) y se evaluó el crecimiento fúngico en cada uno de los pocillos con una escala de 0 a 4. Se asignó un valor de 4 a aquellos pocillos cuyo crecimiento era igual al del pocillo de control positivo, es decir, correspondiente a un 0% de inhibición del crecimiento, un valor de 3 para un 25% de inhibición, de 2 para el 50% de inhibición, de 1 para escaso crecimiento y de 0 en el caso de no observarse ningún crecimiento del hongo. Para la mayoría de antifúngicos se consideró la **Concentración Mínima Inhibitoria** (CMI) como la menor concentración de antifúngico capaz de inhibir el 100% del crecimiento (valor igual a 0), excepto para FLC, 5-FC, KTC y MFG en que se consideró como la menor concentración de antifúngico capaz de inhibir el 50% del crecimiento (valor igual a 2).



**Fig. 18:** Lectura de crecimiento del hongo en los pocillos de la microplaca, con ayuda de un espejo invertido.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y FILOGENIA MOLECULAR DE ESPECIES DEL GÉNERO FUSARIUM DE INTERÉS CLÍNICO

Mónica Azor Heras

DL: T.1368-2011

## **RESULTADOS**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y FILOGENIA MOLECULAR DE ESPECIES DEL GÉNERO FUSARIUM DE INTERÉS CLÍNICO

Mónica Azor Heras

DL: T.1368-2011

## 4. RESULTADOS

### 4.1. RESULTADOS OBTENIDOS PARA LOS AISLADOS DE *F. solani*

#### 4.1.1. Estudio molecular

El estudio molecular de los aislados de *F. solani* se inició con un ensayo preliminar para determinar aquellos genes que presentaban una mayor variabilidad genética. Posteriormente los genes escogidos fueron secuenciados para el total de los 50 aislados de *F. solani* y a partir de esos datos se realizó un análisis filogenético individual y conjunto para determinar los diferentes grupos moleculares.

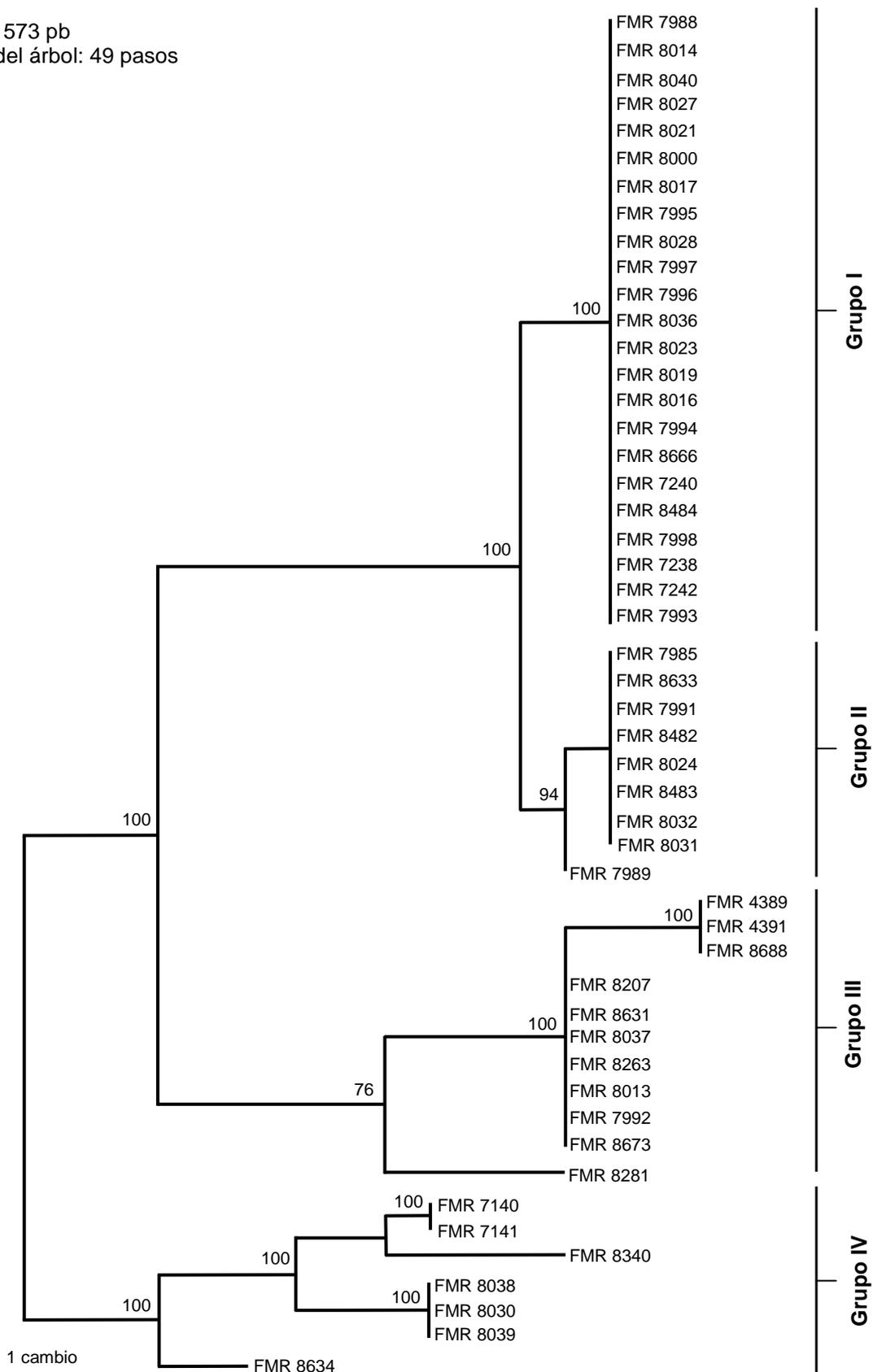
##### 4.1.1.1. Selección de genes

Se secuenciaron siete regiones diferentes, para 12 aislados de *F. solani* escogidos al azar y se generaron los árboles filogenéticos para cada gen utilizando en este caso el programa MEGA version 3.1 (Kumar *et al.*, 2004) por su mayor rapidez de cálculo. Este programa asocia a cada árbol filogenético un valor de distancia genética, el cual se relaciona con la variabilidad del gen. Una vez obtenidos los diferentes árboles filogenéticos para cada región analizada, se compararon los valores de distancia genética asociados. Se observó que los valores más elevados correspondían a los árboles obtenidos a partir de la región ITS y los genes TUB y EF-1 $\alpha$  siendo, por tanto, los fragmentos más variables. Estas regiones fueron escogidas para realizar el estudio filogenético con el resto de los aislados.

#### 4.1.1.2. Análisis filogenético individual

Con los cebadores utilizados se han podido amplificar y secuenciar 573 pb de la región ITS, así como 654 y 461 pb de los genes EF-1 $\alpha$  y TUB, respectivamente. Después de realizar la búsqueda heurística con el programa PAUP\* versión 4.0b10 (Swofford, 2001) para las tres regiones secuenciadas de forma individual, se obtuvieron los siguientes resultados. El análisis de las secuencias de la región ITS (573 pb) generó un total de cinco árboles de máxima parsimonia (*Most Parsimonious Trees*, MPT) (Fig. 19), los cuáles mostraron cuatro grupos filogenéticos altamente soportados, con valores de *bootstrap* superiores al 75%. Asimismo, se diferenciaron un total de 10 haplotipos. El análisis filogenético de los datos para la región secuenciada del gen EF-1 $\alpha$  (654 pb) permitió obtener tres MPT (Fig. 20), los cuales mostraron idénticos grupos a los obtenidos para el árbol filogenético de la región ITS, aunque con una topología ligeramente diferente, ya que en este caso los grupos II y III se intercambiaron entre sí. Sin embargo, observamos que los índices de *bootstrap* para estos agrupamientos eran inferiores al 75%. Esto nos indicaba que esta topología era menos fiable que la obtenida para el árbol filogenético anterior, donde los valores de *bootstrap* eran muy elevados para todos los grupos obtenidos. Asimismo, el gen EF-1 $\alpha$  presentó una mayor variabilidad, ya que se obtuvieron 27 haplotipos. Tras realizar la búsqueda heurística para la región TUB del gen  $\beta$ -tubulina (461 pb) se obtuvieron un total de cinco MPT (Fig. 21), que diferenciaron 9 haplotipos. En este caso se observó la existencia de una politomía, debido a que el análisis no llegó a determinar la relación filogenética existente entre los grupos. Esto es coherente con el resultado obtenido para los otros dos árboles puesto que la relación entre los grupos II y III variaba según el gen estudiado.

GEN ITS, 573 pb  
 Longitud del árbol: 49 pasos  
 IC: 0.837  
 IH: 0.163  
 IR: 0.973

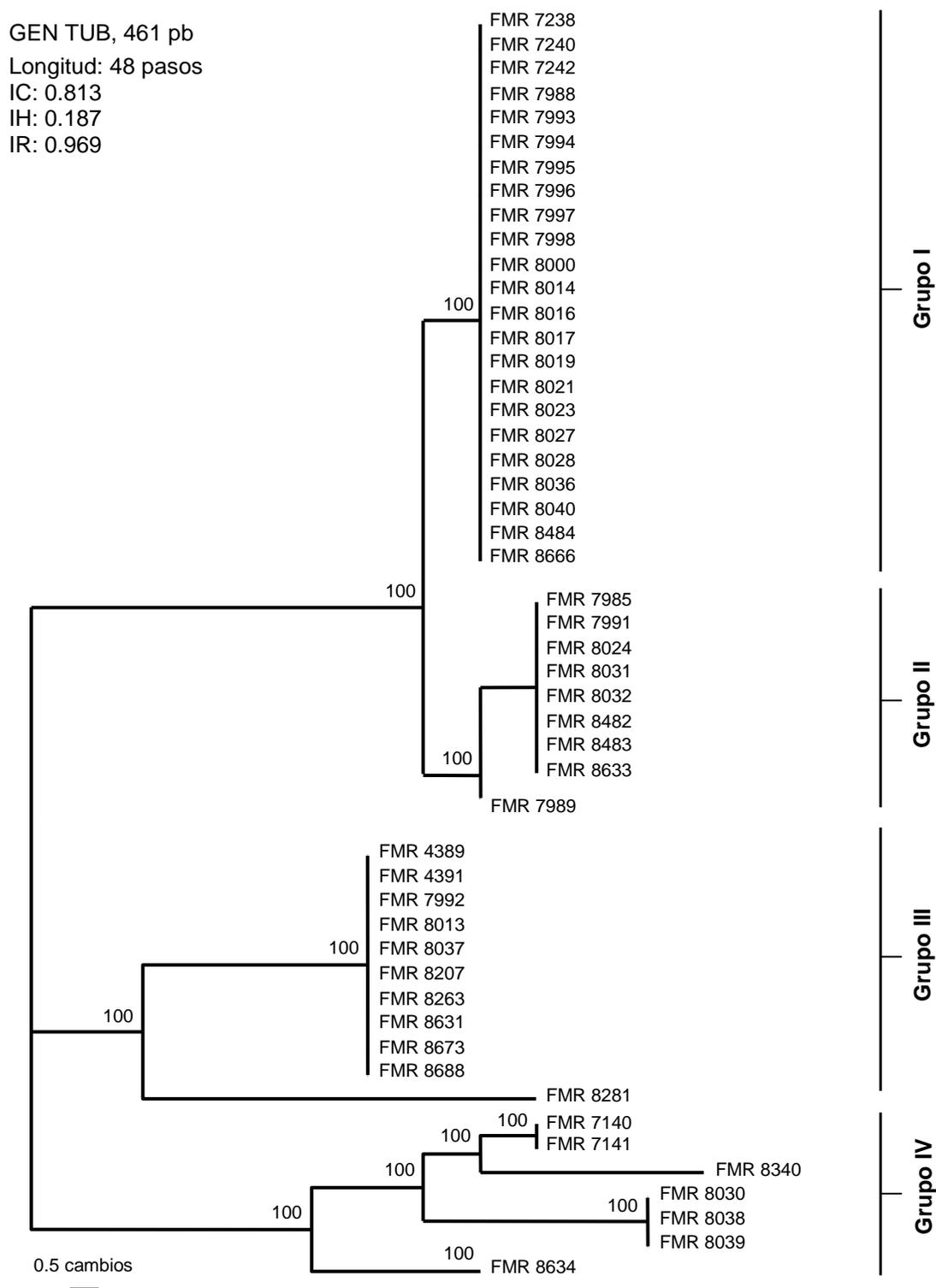


**Fig. 19.** Uno de los 5 MPT obtenidos tras la búsqueda heurística basada en el análisis de las 50 secuencias para el gen ITS. Se indican los valores de soporte de *bootstrap* obtenidos. IC, índice de consistencia; IH, índice de homoplasia; IR, índice de retención.

Resultados



**Fig. 20.** Uno de los 3 MPT obtenidos tras la búsqueda heurística, basada en el análisis de las 50 secuencias para el gen EF-1 $\alpha$ . Se indican los valores de soporte de *bootstrap* obtenidos. IC, índice de consistencia; IH, índice de homoplasia; IR, índice de retención.



**Fig. 21.** Uno de los 5 MPT obtenidos tras la búsqueda heurística, basada en el análisis de las 50 secuencias para la región TUB. Se indican los valores de soporte de *bootstrap* obtenidos. IC, índice de consistencia; IH, índice de homoplasia; IR, índice de retención.

#### 4.1.1.3. Análisis filogenético conjunto

El resultado del test ILD que incorpora el programa PAUP\* versión 4.0b10 (Swofford, 2001), mostró que los tres fragmentos secuenciados podían ser combinados para obtener el árbol filogenético conjunto ( $P=0.2$ , el valor de  $P$  debe ser superior a 0.05). La búsqueda heurística realizada a partir de los 1688 pb totales generó tres MPT (pág. 114) los cuales mostraron una topología similar al árbol obtenido para la región ITS, con dos ramas principales que presentan un elevado valor de soporte de *bootstrap* (100%). Se obtuvieron los cuatro grupos moleculares previamente establecidos (grupos I, II, III y IV), con índices de *bootstrap* superiores al 75% en todos los casos.

El grupo I fue el mayoritario, incluyendo un total de 23 aislados, la mayoría de ellos procedentes del Brasil y de origen clínico, obtenidos a partir de lesiones oculares (18 cepas). Por otro lado, también agrupó cinco aislados procedentes de España, tanto de origen clínico (3 cepas) como ambiental (2 cepas). Se obtuvieron un total de 11 haplotipos diferentes. El grupo II, fue el único formado por aislados de origen exclusivamente clínico, en concreto nueve, aunque de procedencias muy diversas: Brasil (6 cepas), Qatar (2 cepas) y Venezuela (1 cepa). Se obtuvieron 6 haplotipos diferentes. Ambos grupos, I y II, estaban altamente soportados con un 100% y un 97% de soporte de *bootstrap*, respectivamente, y eran los que presentaban una mayor proximidad genética entre sí.

El grupo III se alejaba genéticamente de los dos anteriores y mostraba un soporte de *bootstrap* algo inferior, con un valor del 75%. Este agrupamiento estaba formado por 11 cepas, de procedencia principalmente española (5 cepas) tanto de origen clínico (4 cepas) como ambiental (1 cepa). Asimismo, encontramos cepas de

procedencia tan dispar como Estados Unidos (2 cepas) y Brasil (3 cepas), todas ellas de origen clínico. Dentro de este grupo se obtuvieron 6 haplotipos diferentes.

Por último, el grupo IV sólo incluía 7 cepas, principalmente de origen clínico pero de distintas procedencias, las cuales fueron: Brasil (3 cepas), España (3 cepas) y Qatar (1 cepa). Este último agrupamiento fue el que presentó mayor distancia genética con respecto al resto de grupos filogenéticos obtenidos, formando una rama diferente con un elevado valor de soporte estadístico (100%). Además mostró una mayor variabilidad, ya que agrupaba, a su vez, cuatro subgrupos que incluían 5 haplotipos diferentes.

Según los datos obtenidos, tanto en los árboles individuales como en el conjunto, no se observó ninguna relación entre los diferentes grupos moleculares y la distribución geográfica de los aislados o su origen, ya fuese éste clínico o ambiental.

#### 4.1.2. Caracterización fenotípica

Para cada aislado, el estudio fenotípico consistió en una observación de sus características macro- y microscópicas en diferentes medios de cultivo, así como en la realización de diversas pruebas fisiológicas.

##### 4.1.2.1. Estudio macroscópico

Se examinó el crecimiento de las colonias en los tres medios de cultivo utilizados (PDA, OA y SNA) a los 4, 7 y 10 días de incubación a 25°C.

##### a) Cultivo en medio PDA

Los aislados mostraban una elevada tasa de crecimiento (Tabla 6), y abundante micelio aéreo entre 4 y 7 días después de su siembra. Las colonias obtenidas presentaban una elevada variabilidad morfológica sobre todo en cuanto a su coloración, que podía variar desde color blanco a crema, y de color verde a marrón-azulado debido a la formación de esporodoquios. Algunas de las cepas mostraron la presencia de pigmentos y exudado, normalmente de coloración vinácea como puede observarse en la fotografía de la figura 22. El reverso de la colonia mostraba menos coloración, aunque en algunas cepas también se observaba una pigmentación vinácea.

En general, las características morfológicas de las colonias eran muy variables, incluso entre las cepas que pertenecían a un mismo grupo filogenético, por lo que no pudimos observar un patrón común que permitiese caracterizar a los diferentes grupos identificados en el estudio molecular.



**Fig. 22:** Crecimiento de diferentes aislados de *F. solani* en medio PDA. Podemos observar la gran variabilidad existente en la morfología de la colonia, la coloración y la presencia de pigmentos y exudados.

#### a) Cultivo en medio OA y SNA

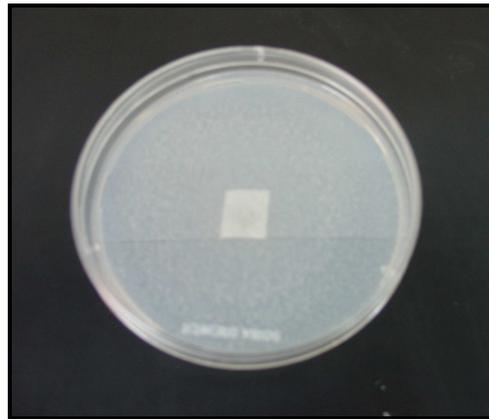
Las colonias creciendo sobre estos medios de cultivo eran muy similares entre sí: presentaban un micelio aéreo escaso de color blanco a crema, sin diferencias apreciables en cuanto sus características macroscópicas. No se observó la presencia de pigmentos difusibles o de exudados, tal y como se puede apreciar en las fotografías de las figuras 23 y 24. Se concluyó, por tanto, que no había diferencias macroscópicas entre los diferentes aislados cuando crecían en estos medios de cultivo.

## Resultados

---



**Fig. 23:** Crecimiento en medio OA.  
Se observa el micelio de color crema.



**Fig. 24:** Crecimiento en medio SNA. Se aprecia el fragmento de papel y el micelio poco abundante y de color blanco crema.

### 4.1.2.2. Estudio microscópico

Se realizaron preparaciones microscópicas de todas las cepas creciendo en los tres medios de cultivo antes indicados tras la incubación a 25°C a los 7, 14 y 21 días.

Se determinaron las siguientes características:

- morfología del conidióforo y de la célula conidiógena
- presencia y morfología de clamidosporas
- presencia, morfología y tamaño de los macroconidios
- presencia, morfología y tamaño de los microconidios

### Morfología del conidióforo y de la célula conidiógena

Todas las cepas presentaban los conidióforos típicos que caracterizan a *F. solani*. Se trata de conidióforos que crecen lateralmente a partir de las hifas aéreas, generalmente simples, de hasta 60 µm de longitud y en cuya parte terminal se encuentra integrada una célula conidiógena monofialídica con un collarete más o

menos evidente. A pesar de que algunos de los aislados presentaban conidióforos más ramificados que otros no se pudieron apreciar diferencias en cuanto a la morfología del conidióforo y de la célula conidiógena entre los diferentes grupos moleculares obtenidos.

### **Presencia y morfología de clamidosporas**

La formación de clamidosporas se observó en la mayoría de los aislados estudiados para los tres medios de cultivo. Las clamidosporas se presentaban principalmente en forma unicelular o bicelular, aunque también podían formar cadenas y pequeñas agrupaciones. Se encontraban intercalares en las hifas, o terminales en cortas ramificaciones laterales del micelio. Solían ser globosas o subglobosas, de 5 a 11  $\mu\text{m}$  de diámetro y con pared de lisa a rugosa, inicialmente hialinas pero volviéndose parduscas con el tiempo.

No se observaron diferencias entre los grupos moleculares en cuanto a la morfología de las clamidosporas, pero sí en cuanto a la producción de las mismas. Las cepas de los grupos filogenéticos I, II y III producían abundantes clamidosporas en todos los medios ensayados, mientras que las cepas del grupo IV las producían en mucha menor cantidad.

### **Presencia, morfología y tamaño de macro- y microconidios**

No todas las cepas desarrollaron macroconidios. Cuando éstos estaban presentes siempre nacían de cortos conidióforos que se agrupaban formando esporodoquios. La mayoría de los macroconidios eran falciformes, y presentaban de 3 a 5 septos. Por otro lado, todas las cepas desarrollaron microconidios, los cuáles

## Resultados

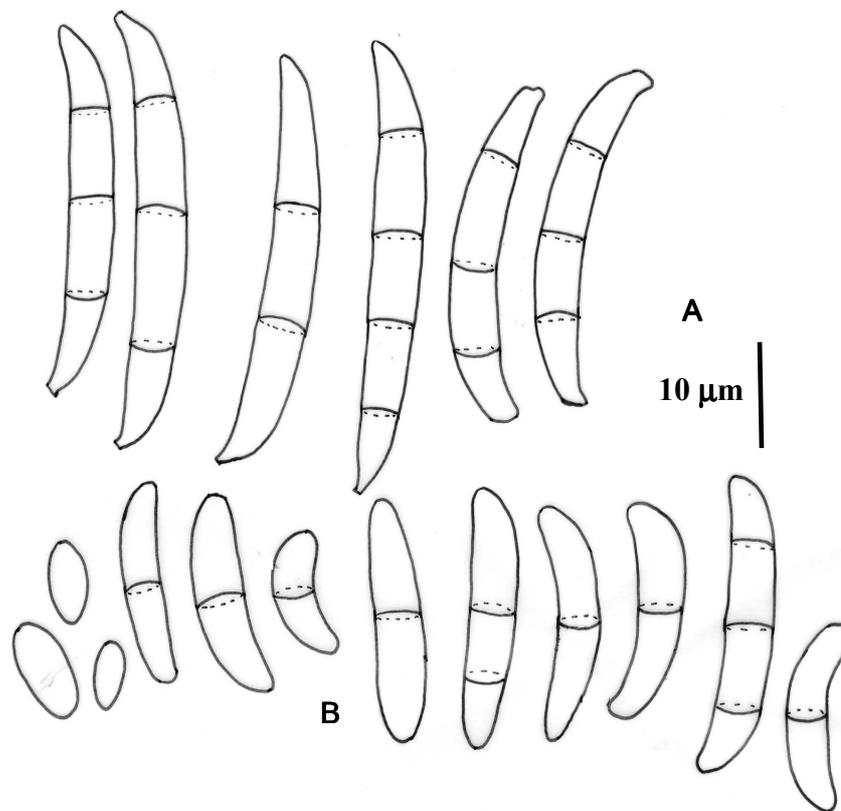
---

usualmente eran abundantes, podían ser unicelulares o con uno o dos septos y siempre se formaban a partir de monofiálides del micelio aéreo.

En este caso, sí se observaron diferencias en cuanto a la presencia, la morfología y el tamaño de macros- y microconidios para los distintos grupos moleculares observados, que se detallan a continuación.

### a) Grupos I y II

Los conidios de los grupos moleculares I y II presentaban características similares, lo que resulta coherente con el resultado molecular obtenido, ya que ambos grupos son los más próximos filogenéticamente. Ambos presentaban gran cantidad de macro- y microconidios. Los macroconidios eran ligeramente curvados, con 1 a 5 septos, y solían tener una célula basal y apical pronunciadas. Su tamaño oscilaba entre 21-40  $\mu\text{m}$  de longitud y entre 4.3-5  $\mu\text{m}$  de ancho (Fig. 25A). Los microconidios tenían morfologías y tamaños variados (Fig. 25B), podían presentar de 1 a 3 septos, con un rango entre 9.4-25.7  $\mu\text{m}$  de longitud y de 4.6-5  $\mu\text{m}$  de ancho. Los microconidios unicelulares eran los de menor tamaño y mostraban morfologías de elipsoidales a ovoides, mientras que los microconidios de 1 a 3 septos presentaban tamaños variables y morfologías elipsoidales o más o menos cilíndricos, incluso ligeramente curvados. Los microconidios de 3 septos podían llegar a confundirse con los macroconidios, sin embargo, se podían diferenciar por la ausencia de célula basal y apical diferenciadas.



**Fig. 25:** Macroconidios (A) y microconidios (B) representativos de los aislados del grupo I y grupo II creciendo en medio PDA.

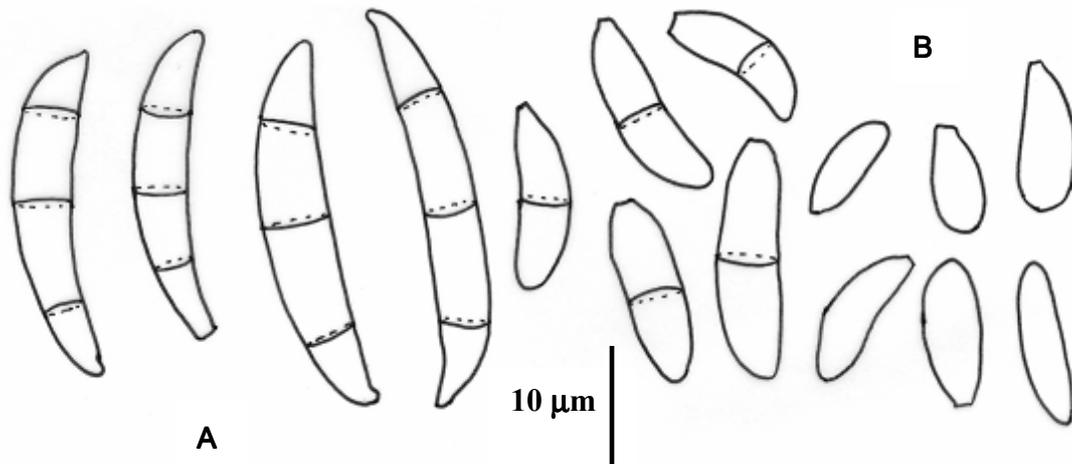
#### b) Grupo III

Los aislados de este grupo desarrollaron predominantemente macroconidios de 3 septos, aunque también se observaron algunos de 4 septos. La morfología era similar a la descrita para los grupos I y II, aunque su tamaño era ligeramente inferior, con valores entre 21.3-33.9  $\mu\text{m}$  de longitud y 4.3-5.2  $\mu\text{m}$  de ancho (Fig. 26A). Los microconidios eran abundantes, unicelulares y de 1 septo, elipsoidales o ovoides y en algunos casos ligeramente curvados. Medían entre 10.7-23.7  $\mu\text{m}$  de longitud y 3.6-4.7  $\mu\text{m}$  de ancho (Fig. 26B). Se observaba una mayor diferencia entre los macro- y microconidios puesto que los microconidios eran más cortos y presentaban como

## Resultados

---

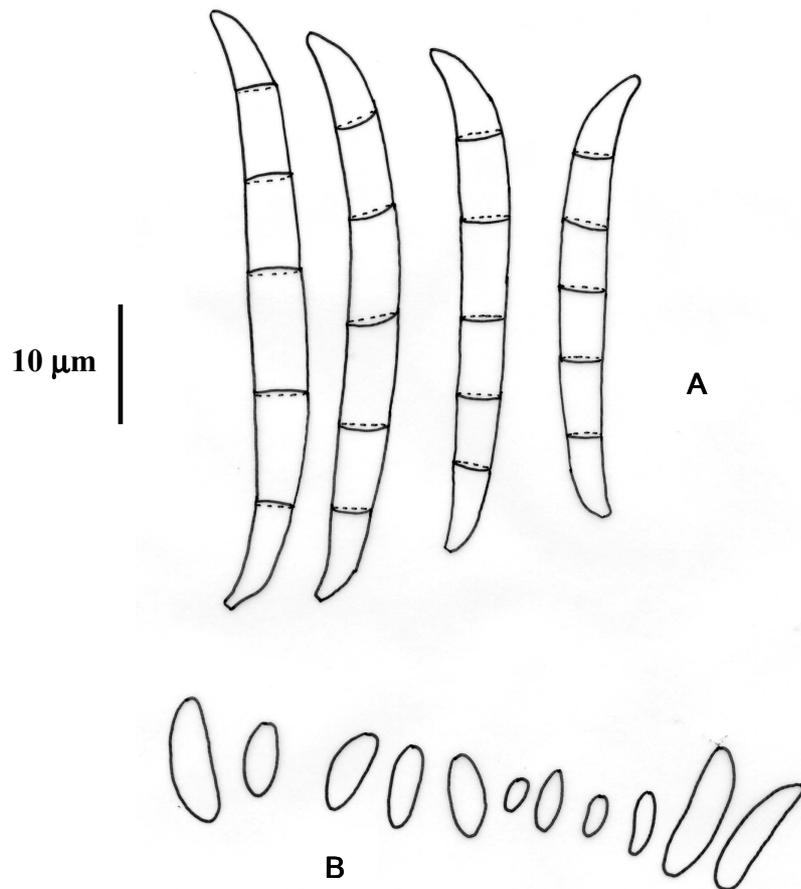
máximo 1 septo, respecto a los microconidios observados en los grupos filogenéticos I y II.



**Fig. 26:** Macroconidios (A) y microconidios (B) representativos de los aislados del grupo III creciendo en medio PDA.

### c) Grupo IV

Este grupo fue el que presentó mayores diferencias con respecto al resto de aislados, hecho que concuerda con los resultados moleculares, al ser el grupo molecular más alejado genéticamente. Fue el único donde se observaron macroconidios de 1 a 6 septos y además con una morfología característica: los macroconidios eran largos y estrechos, con una célula pie y apical muy pronunciadas, su tamaño oscilaba entre 22-52.5  $\mu\text{m}$  de longitud y 4.5-5  $\mu\text{m}$  de ancho (Fig. 27A). Los microconidios eran principalmente unicelulares, aunque también encontramos algunos de 1 septo en algún caso, elipsoidales o ovoides y medían entre 8.2-17.1  $\mu\text{m}$  de longitud y 3.1-3.6  $\mu\text{m}$  de ancho (Fig. 27B).



**Fig. 27:** Macroconidios (A) y microconidios (B) representativos de los aislados del grupo IV creciendo en medio PDA.

Finalmente, se realizó un estudio estadístico para comprobar si había diferencias significativas entre los conidios de los grupos moleculares, tanto para los valores de longitud como para los de anchura. Ambas variables se estudiaron de forma independiente utilizando el test no-paramétrico U de Mann-Whitney, dado que las poblaciones estudiadas no presentaban una distribución normal. Los resultados

## Resultados

---

obtenidos indicaron que había diferencias significativas entre los valores de longitud y anchura de los macro- y microconidios de los diferentes grupos moleculares ( $P < 0.05$ ).

### 4.1.2.3. Estudio fisiológico

El estudio fisiológico consistió en la realización de diferentes pruebas, principalmente, de asimilación de compuestos. Se compararon los grupos moleculares entre sí para determinar si existían diferencias entre ellos en cuanto a los resultados obtenidos.

#### **Tasa de crecimiento a diferentes temperaturas**

En la Tabla 6 se indican los resultados para la tasa de crecimiento a diferentes temperaturas. En este caso, se estudiaron los 50 aislados incluidos en el estudio molecular. Para comparar los datos de los diferentes grupos moleculares entre sí, se calcularon las medias y las desviaciones estándar de los valores obtenidos para los diferentes aislados a las temperaturas estudiadas. Tras realizar el análisis estadístico con el test U de Mann-Whitney, los resultados obtenidos indicaron que no había diferencias significativas para los valores de crecimiento obtenidos a las temperaturas de 15°, 25° y 35°C ( $P > 0.05$ ). En ningún caso se obtuvo crecimiento para las temperaturas de 40° y 45°C. Según estos resultados, se concluyó que no existían diferencias significativas entre los grupos moleculares previamente establecidos en cuanto al crecimiento de las cepas a diferentes temperaturas.

**Tabla 6:** Tasas de crecimiento a diferentes temperaturas

GRUPO	DIÁMETRO (cm) <sup>a</sup>				
	15°C	25°C	35°C	40°C	45°C
I	2.3 ± 0.2	7.4 ± 0.6	3.6 ± 0.5	No	No
II	2.3 ± 0.3	6.1 ± 0.5	2.5 ± 1.3	No	No
III	2.3 ± 0.1	5.9 ± 0.4	3.2 ± 0.3	No	No
IV	2.4 ± 0.1	5.9 ± 0.5	1.5 ± 0.3	No	No

<sup>a</sup>Medias y desviaciones estándares de los valores del diámetro de crecimiento de la colonia a los siete días de incubación en medio PDA.

### Asimilación de azúcares y fuentes de nitrógeno

Se estudiaron un total de 32 aislados representativos de los diferentes grupos moleculares. Los resultados obtenidos mostraron que todos ellos eran capaces de asimilar 31 de los 34 carbohidratos testados (Anexo I). Sin embargo, ninguno de los aislados creció cuando la fuente de carbono era el ácido málico, el ácido láctico o el ácido tánico.

En cuanto a las fuentes de nitrógeno, todos los aislados presentaron la capacidad de asimilar los seis compuestos testados, excepto tres de ellos, (FMR 8013, FMR 8038 y FMR 8633) que pertenecían a grupos moleculares diferentes, los cuales no crecieron cuando la fuente de nitrógeno en el medio era la cadaverina. Por tanto,

## Resultados

---

no se observaron patrones bioquímicos que nos permitieran distinguir los diferentes grupos moleculares previamente establecidos.

### **Crecimiento a diferentes concentraciones de NaCl, MgCl<sub>2</sub> y cicloheximida**

Los resultados de las diferentes pruebas se muestran en el Anexo I. Puede verse que todos los aislados crecieron en presencia de 2%, 5%, 7% y 10% de NaCl y MgCl<sub>2</sub>, excepto los aislados FMR 8263 y FMR 4391, ambos del grupo III, que no presentaron crecimiento cuando la concentración de NaCl en el medio fue del 10%. Asimismo, no se obtuvo crecimiento en presencia de cicloheximida a las concentraciones de 0.05% y 0.1%, excepto para el aislado FMR 8038 (grupo IV) que creció a la concentración menor y los aislados FMR 8037 y FMR 4389, ambos del grupo III, que fueron capaces de crecer en presencia de ambas concentraciones, aunque en todos los casos el crecimiento obtenido fue débil. A pesar de estas excepciones no se observaron diferencias entre los diferentes grupos moleculares.

### **Otras pruebas**

En cuanto al resto de pruebas realizadas, se obtuvo idéntica respuesta para todos los aislados incluidos en el estudio. Todos ellos presentaban actividad ureasa y eran capaces de producir ácidos a partir de glucosa, mientras que ninguno mostró capacidad para formar almidón extracelular. Por tanto, tampoco obtuvimos patrones diferentes entre los grupos filogenéticos.

#### 4.1.3. Resistencia antifúngica *in vitro* de diferentes grupos genéticos del complejo de especies *Fusarium solani*

Este estudio fue publicado en la revista *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **51**: 1500-1503, 2007 (Anexo II) con el formato de nota corta que se muestra a continuación.

##### Resumen:

Se estudió la actividad *in vitro* de once antifúngicos frente a diferentes aislados representativos de cuatro grupos filogenéticos del complejo de especies *Fusarium solani*, obtenidos a partir de un análisis de secuencias *multilocus*. Todos los antifúngicos estudiados mostraron baja actividad, y no se observaron diferencias entre los grupos filogenéticos. La anfotericina B fue el fármaco que presentó mejores resultados.

*Fusarium solani* es un hongo ampliamente distribuido en la naturaleza, capaz de producir diferentes enfermedades en plantas que tienen un importante impacto económico, así como causar infecciones severas, incluso fatales, en el ser humano (7, 9, 15, 23). Estas infecciones se caracterizan por su resistencia a prácticamente todos los antifúngicos disponibles (3, 21, 24). Actualmente se recomienda el tratamiento inicial con voriconazol (VRC) o una formulación lipídica de anfotericina B (AMB) (22). Aunque la respuesta de *Fusarium* spp. a la AMB es pobre en general, depende de la especie involucrada siendo *Fusarium solani* la especie más resistente, al menos *in vitro* (24). Recientemente, Zhang *et al.*, (29), utilizando un análisis de secuencias *multilocus*, demostraron que, bajo el nombre genérico de *F. solani*, al menos existían

## Resultados

---

45 especies filogenéticas diferentes, la mayoría de las cuales no han sido descritas formalmente. No se conoce si estas especies filogenéticas presentan diferentes patrones de sensibilidad antifúngica, de ser así, esta información sería de gran utilidad para establecer un tratamiento adecuado. Debido a las dificultades para estudiar cepas representativas de todas las especies filogenéticas, hemos evaluado aislados pertenecientes a los cuatro grupos filogenéticos obtenidos al realizar un análisis combinado de tres genes, el factor de elongación 1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ), el gen  $\beta$ -tubulina y las regiones espaciadoras internas (ITS) del gen nuclear rRNA, frente a antifúngicos tradicionales y de más reciente aparición.

Cincuenta aislados de origen clínico y ambiental, morfológicamente identificados como *F. solani* (6) han sido incluidos en el estudio (Tabla 1). Los aislados fueron almacenados mediante la técnica de liofilización y también mediante siembra en tubos de agar inclinado recubiertos con aceite vegetal y almacenados a temperatura ambiente. El procedimiento para la extracción del ADN, el proceso de amplificación y secuenciación de las diferentes regiones analizadas han sido descritos en el trabajo de Gilgado y colaboradores (8). La reacción de PCR se realizó con una temperatura de hibridación de 55°C, y los cebadores utilizados fueron EF-1H y EF-2T (16) para el gen EF-1 $\alpha$ , TUB-F (5) y T22 (17) para la región TUB del gen de la  $\beta$ -tubulina e ITS5 y ITS4 (28) para la región ITS. El análisis filogenético se realizó utilizando el programa PAUP\*, versión 4.0b10 (27). Los árboles de máxima parsimonia se obtuvieron realizando 100 búsquedas heurísticas con las opciones de *random sequence addition* y *tree bisection-reconnection branch-swapping algorithms, collapsing zero-length branches* y guardando los árboles de mínima longitud

TABLA 1. Aislados incluidos en el estudio y sus orígenes<sup>a</sup>.

Aislado	Origen	Números de acceso al <i>GenBank</i>		
		EF-1 $\alpha$	TUB	ITS
FMR 4389	Piel de escroto humana, EE.UU.	AM397191	AM419414	AM412634
FMR 4391	Sangre humana, EE.UU.	AM397184	AM419413	AM412635
FMR 7140	Tierra de acuario, España	AM397227	AM419415	AM412636
FMR 7141	Tierra de acuario, España	AM397228	AM419416	AM412637
FMR 7238	Úlcera humana, España	AM397225	AM419417	AM412638
FMR 7240	Lesión piel humana, España	AM397210	AM419418	AM412639
FMR 7242	Lesión piel humana, España	AM397212	AM419419	AM412640
FMR 7985	Queratitis humana, Brasil	AM397218	AM419406	AM412641
FMR 7988	Queratitis humana, Brasil	AM397202	AM419420	AM412642
FMR 7989	Queratitis humana, Brasil	AM397219	AM419421	AM412643
FMR 7991	Queratitis humana, Brasil	AM397220	AM419412	AM412624
FMR 7992	Queratitis humana, Brasil	AM397186	AM419422	AM412625
FMR 7993	Queratitis humana, Brasil	AM397198	AM419423	AM412626
FMR 7994	Queratitis humana, Brasil	AM397194	AM419424	AM412627
FMR 7995	Queratitis humana, Brasil	AM397206	AM419425	AM412628
FMR 7996	Queratitis humana, Brasil	AM397199	AM419376	AM412629
FMR 7997	Queratitis humana, Brasil	AM397209	AM419377	AM412630
FMR 7998	Queratitis humana, Brasil	AM397204	AM419378	AM412631
FMR 8000	Queratitis humana, Brasil	AM397207	AM419379	AM412632
FMR 8013	Queratitis humana, Brasil	AM397189	AM419380	AM412633
FMR 8014	Queratitis humana, Brasil	AM397205	AM419381	AM412604
FMR 8016	Queratitis humana, Brasil	AM397226	AM419382	AM412605
FMR 8017	Queratitis humana, Brasil	AM397208	AM419383	AM412606
FMR 8019	Queratitis humana, Brasil	AM397197	AM419384	AM412607
FMR 8021	Queratitis humana, Brasil	AM397195	AM419385	AM412608
FMR 8023	Queratitis humana, Brasil	AM397201	AM419386	AM412609
FMR 8024	Queratitis humana, Brasil	AM397223	AM419409	AM412610
FMR 8027	Queratitis humana, Brasil	AM397203	AM419387	AM412611
FMR 8028	Queratitis humana, Brasil	AM397196	AM419388	AM412612
FMR 8030	Queratitis humana, Brasil	AM397229	AM419389	AM412613
FMR 8031	Queratitis humana, Brasil	AM397213	AM419407	AM412614
FMR 8032	Queratitis humana, Brasil	AM397222	AM419410	AM412615
FMR 8036	Queratitis humana, Brasil	AM397192	AM419390	AM412616
FMR 8037	Queratitis humana, Brasil	AM397188	AM419391	AM412617
FMR 8038	Queratitis humana, Brasil	AM397230	AM419392	AM412618
FMR 8039	Queratitis humana, Brasil	AM397231	AM419393	AM412619
FMR 8040	Queratitis humana, Brasil	AM397193	AM419394	AM412620
FMR 8207	Nemátodo, España	AM397190	AM419395	AM412621
FMR 8263	Nemátodo, España	AM397187	AM419396	AM412622
FMR 8281	Nemátodo, España	AM397215	AM419397	AM412623
FMR 8340	Fungemia humana, Qatar	AM397232	AM419398	AM412594
FMR 8482	Muestra clínica humana, Qatar	AM397224	AM419411	AM412595
FMR 8483	Muestra clínica humana, Qatar	AM397221	AM419408	AM412596
FMR 8484	Nemátodo, España	AM397200	AM419399	AM412597
FMR 8631	Muestra clínica humana, España	AM397185	AM419400	AM412598
FMR 8633	Uña humana, Venezuela	AM397214	AM419401	AM412599
FMR 8634	Llaga pie de diabético, España	AM397233	AM419402	AM412600
FMR 8666	Nemátodo, España	AM397211	AM419403	AM412601
FMR 8673	Nemátodo, España	AM397216	AM419404	AM412602
FMR 8688	Nemátodo, España	AM397217	AM419405	AM412603

<sup>a</sup>FMR, *Facultat de Medicina i Ciències de la Salut*, Reus, España.

## Resultados

---

(MulTrees). Los resultados del *Partition Homogeneity Test* mostraron que los datos de los tres genes secuenciados eran congruentes ( $P=0.2$ ) y podían ser combinados. Las secuencias de los tres genes se analizaron filogenéticamente por separado y también de forma conjunta y fueron depositadas en la base de datos EMBL *Nucleotide Sequence Database* (Tabla 1).

Se evaluó la actividad *in vitro* para 11 antifúngicos frente a 27 cepas representativas (22 clínicas y 5 de origen ambiental) escogidas al azar a partir de los principales grupos obtenidos en el análisis filogenético. Los aislados se sembraron en placas de agar patata dextrosa (PDA) y se incubaron a 25°C durante 7 días. Se utilizó el método de microdilución de referencia (14), con algunas modificaciones. El inóculo fue ajustado a una concentración final de  $4 \times 10^3$  a  $5 \times 10^4$  conidios/ml utilizando un hemocitómetro y verificado por recuento en placa de PDA. Los antifúngicos evaluados fueron AMB, albaconazol, VRC, itraconazol, ravuconazol, terbinafina, ketoconazol (KTC), posaconazol (PSC), micafungina (MFG), fluconazol (FLC) y flucitosina (5-FC). MFG, FLC y 5-FC se diluyeron en agua destilada estéril y el resto en dimetil sulfóxido. Las concentraciones finales obtenidas fueron de 64 a 0.12 mg/L para FLC y 5-FC, de 128 a 0.25 mg/L para MFG y de 16 a 0.03 mg/L para el resto. El punto final de lectura del valor de CMI para los triazoles y la AMB se definió como la mínima concentración que produce una completa inhibición del crecimiento (CMI 0), mientras que para FLC, KTC, 5-FC y MFG se definió como la mínima concentración que produce un 50% de inhibición del crecimiento (CMI 2). La cepa ATCC 36257 de la especie *Paecilomyces variotii* se incluyó en cada uno de los análisis realizados como cepa control.

Con los cebadores utilizados se amplificaron y secuenciaron 654, 461 y 573 pb de los genes EF-1 $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulina e ITS, respectivamente. Mediante el análisis de

máxima parsimonia de los datos combinados (1688 pb) se obtuvieron tres árboles con una longitud de 176 pasos. Se diferenciaron 4 grupos mayoritarios (I, II, III y IV) con un elevado soporte de *bootstrap*, 28 haplotipos diferentes y diversas posibles especies filogenéticas (Fig. 1). No se encontró relación entre el origen biogeográfico de los aislados y los grupos moleculares obtenidos. Con el objetivo de comparar la topología de nuestros árboles con los obtenidos por Zhang y colaboradores (29), se realizó un nuevo análisis filogenético basado en los genes EF-1 $\alpha$  e ITS. Se incluyeron nuestros aislados y algunas secuencias representativas, recuperadas a partir del *GenBank*, de los principales grupos filogenéticos obtenidos por estos autores (29). En general, nuestros grupos no coincidieron con los obtenidos en su trabajo, lo que confirma la elevada variabilidad genética de este complejo.

Los resultados de los tests de sensibilidad *in vitro* se muestran en la Tabla 2. En general, todos los antifúngicos mostraron valores de CMI elevados, sin diferencias remarcables entre los grupos filogenéticos. AMB resultó ser la droga más activa, aunque en ningún caso el valor de CMI fue inferior a 1 mg/L, seguida por el VRC. Este último antifúngico presentó los resultados más variables, dándose diferencias de más de 8 rangos de concentración entre los valores de CMI obtenidos para cepas de un mismo grupo.

Los bajos valores para la actividad *in vitro* de los diferentes antifúngicos frente a *Fusarium* ya habían sido mostrados por otros autores en varias ocasiones, siendo *F. solani* más resistente que otras especies del género (12, 19, 24, 26). En este estudio, AMB resultó ser el antifúngico más activo, pero sólo un aislado del grupo I y otro del grupo III mostraron un valor para la CMI de 1 mg/L, mientras que el resto mostraban valores más elevados. Aunque este fármaco está recomendado para el tratamiento de



TABLA 2. Distribución de los 27 aislados de los 4 grupos filogenéticos de *F. solani* testados, según su susceptibilidad antifúngica.

Antifúngicos	Grupos*	CMI (mg/L)									
		0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
AMB	I	-	1 <sup>a</sup>	8	2	-	-	-	-	-	-
	II	-	-	4	-	1	-	-	-	-	-
	III	-	1	4	2	-	-	-	-	-	-
	IV	-	-	1	3	-	-	-	-	-	-
VRC	I	-	-	-	3	4	1	2	-	-	-
	II	-	-	-	1	4	1	-	-	-	-
	III	-	-	-	1	1	4	1	-	-	-
	IV	-	-	-	-	3	1	-	-	-	-
ABC	I-IV	-	-	-	-	-	-	27	-	-	-
ITC	I-IV	-	-	-	-	-	-	27	-	-	-
KTC	I-IV	-	-	-	-	-	-	27	-	-	-
PSC	I-IV	-	-	-	-	-	-	27	-	-	-
RVC	I-IV	-	-	-	-	-	-	27	-	-	-
TBF	I-IV	-	-	-	-	-	-	27	-	-	-
FLC	I-IV	-	-	-	-	-	-	-	-	27	-
5-FC	I-IV	-	-	-	-	-	-	-	-	27	-
MFG	I-IV	-	-	-	-	-	-	1	3	10	13

\* grupos según la Fig. 1; <sup>a</sup> número de aislados. AMB, anfotericina B; VRC, voriconazol; ABC, albaconazol; ITC, itraconazol; KTC, ketoconazol; PSC, posaconazol; RVC, ravuconazol; TBF, terbinafina; FLC, fluconazol; 5-FC, 5-fluorocitosina; MFG, micafungina.

la fusariosis, presenta un bajo éxito clínico (7, 11, 15). En aquellos casos de pacientes neutropénicos que reciben corticosteroides, la supervivencia es prácticamente nula, a pesar de utilizar un tratamiento intensivo (15). La baja eficacia de la AMB también ha sido demostrada en estudios animales (10). VRC, el otro antifúngico recomendado, es el único agente indicado para el tratamiento de la fusariosis refractaria (7), sin embargo, en nuestro estudio, los valores de CMI obtenidos para este fármaco fueron siempre mayores de 2 mg/L, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en otros trabajos (12, 26). Aún así, se ha observado que este antifúngico ha sido efectivo en algunos casos clínicos de fusariosis (2, 4), aunque en ninguno de ellos la especie

## Resultados

---

involucrada era *F. solani*. Esto está probablemente ligado al hecho de que, en estudios animales, *F. solani* resultó ser claramente más virulenta y más difícil de tratar que *F. oxysporum* y *F. verticillioides*, las otras dos especies más comunes del género (13, 18). En una reciente prueba clínica, un 45.5% (5/11) de los pacientes respondieron satisfactoriamente al VRC (20) aunque los aislados no fueron identificados al nivel de especie. Arikan y colaboradores (1) demostraron que la combinación de caspofungina y AMB era sinérgica contra el 100% de las cepas de *F. oxysporum* pero sólo contra el 25% de las cepas de *F. solani*. En el caso de PSC, también se obtuvieron valores de CMI elevados, de acuerdo con otros estudios (19, 26). Sin embargo, en un reciente análisis retrospectivo, este antifúngico, utilizado como tratamiento intensivo para la fusariosis invasiva, obtuvo un 48% de recuperación (25), aunque las especies involucradas no fueron descritas. En conclusión, el complejo de especies de *F. solani* constituye un grupo de hongos genéticamente diverso que presenta una baja respuesta, tanto *in vitro* como *in vivo*, a los diferentes antifúngicos.

### Agradecimientos:

Los autores agradecen a Félix Gilgado, Carol Serena, Rita Marimon y Marçal Mariné su contribución a este trabajo.

### Bibliografía:

1. Arikan, S., M. Lozano-Chiu, V. Paetznick y J. H. Rex. 2002. *In vitro* synergy of caspofungin and amphotericin B against *Aspergillus* and *Fusarium* spp. Antimicrob. Agents Chemother. **46**:245-247.

2. **Bigley, V. H., R. F. Duarte, R. D. Gosling, C. C. Kibbler, S. Seaton y M. Potter.** 2004. *Fusarium dimerum* infection in a stem cell transplant recipient treated successfully with voriconazole. *Bone Marrow Transplant.* **34**:815-817.
3. **Capilla, J., M. Ortoneda, F. J. Pastor y J. Guarro.** 2001. *In vitro* antifungal activities of the new triazole UR-9825 against clinically important filamentous fungi. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:2635-2637.
4. **Consigny, S., N. Dhedin, A. Datry, S. Choquet, V. Leblond y O. Chosidow.** 2003. Successful voriconazole treatment of disseminated *Fusarium* infection in an immunocompromised patient. *Clin. Infect. Dis.* **37**:311-313.
5. **Cruse, M., R. Telerant, T. Gallagher, T. Lee y J. W. Taylor.** 2002. Crytic species in *Stachybotrys chartarum*. *Mycologia* **94**:814-822.
6. **de Hoog, G. S., J. Guarro, J. Gené y M. J. Figueras.** 2000. Atlas of clinical fungi, 2<sup>nd</sup> ed. Centraalbureau voor Schimmnelcultures, Utrech, The Netherlands.
7. **Dignani, M. C. y E. J. Anaissie.** 2004. Human fusariosis. *Clin. Microbiol. Infect.* **1**:67-75.
8. **Gilgado, F., J. Cano, J. Gené y J. Guarro.** 2005. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. *J. Clin. Microbiol.* **43**:4930-4942.
9. **Guarro, J. y J. Gené.** 1995. Opportunistic fusarial infections in humans. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **14**:741-754.
10. **Guarro, J., I. Pujol y E. Mayayo.** 1999. *In vitro* and *in vivo* experimental activities of antifungal agents against *Fusarium solani*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:1256-1257.

11. **Hennequin, C., V. Lavarde, J. L. Poirot, M. Rabodonirina, A. Datry, S. Aractingi, J. Dupouy-Camet, D. Caillot, F. Grange, L. Kures, O. Morin, B. Lebeau, S. Bretagne, C. Guigen, D. Basset y R. Grillot.** 1997. Invasive *Fusarium* infections: a retrospective survey of 31 cases. The French 'Groupe d'Etudes des Mycoses Opportunistes' GEMO. *J. Med. Vet. Mycol.* **35**:107-114.
12. **Lewis, R. E., N. P. Wiederhold y M. E. Klepser.** 2005. *In vitro* pharmacodynamics of amphotericin B, itraconazole, and voriconazole against *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Scedosporium* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:945-51.
13. **Mayayo, E., I. Pujol y J. Guarro.** 1999. Experimental pathogenicity of four opportunist *Fusarium* species in a murine model. *J. Med. Microbiol.* **48**:363-366.
14. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
15. **Nucci, M., E. J. Anaissie, F. Queiroz-Telles, C. A. Martins, P. Trabasso, C. Solza, C. Mangini, B. P. Simoes, A. L. Colombo, J. Vaz, C. E. Levy, S. Costa, V. A. Moreira, J. S. Oliveira, N. Paraguay, G. Duboc, J. C. Voltarelli, A. Maiolino, R. Pasquín y C. A. Souza.** 2003. Outcome predictors of 84 patients with hematologic malignancies and *Fusarium* infection. *Cancer* **98**:315-319.
16. **O'Donnell, K.** 2000. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. *Mycologia* **92**:919-938.
17. **O'Donnell, K. y E. Cigelnik.** 1997. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Mol. Phylogenet. Evol.* **7**:103-116.

18. **Ortoneda, M., J. Capilla, F. J. Pastor, I. Pujol y J. Guarro.** 2002. Efficacy of liposomal amphotericin B in treatment of systemic murine fusariosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:2273-2275.
19. **Paphitou, N. I., L. Ostrosky-Zeichner, V. L. Paetznick, J. R. Rodríguez, E. Chen y J. H. Rex.** 2002. *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.* **46**:3298-3300.
20. **Perfect, J. R., K. A. Marr, T. J. Walsh, R. N. Greenberg, B. DuPont, J. de la Torre-Cisneros, G. Just-Nubling, H. T. Schlamm, I. Lutsar, A. Espinel-Ingroff y E. Johnson.** 2003. Voriconazole treatment for less-common, emerging, or refractory fungal infections. *Clin. Infect. Dis.* **36**:1122-1131.
21. **Pfaller, M. A., S. A. Messer, R. J. Hollisthe Sentry Participants Group y R. N. Jones.** 2002. Antifungal activities of posaconazole, ravuconazole, and voriconazole compared to those of itraconazole and amphotericin B against 239 clinical isolates of *Aspergillus* spp. and other filamentous fungi: report from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:1032-1037.
22. **Pfaller, M. A., P. G. Pappas y J. R. Wingard.** 2006. Invasive fungal pathogens: current epidemiological trends. *Clin. Infect. Dis.* **43**: 3-14.
23. **Pontón, J., R. Rüchel, K. V. Clemons, D. C. Coleman, R. Grillot, J. Guarro, D. Aldebert, P. Ambroise-Thomas, J. Cano, A. J. Carrillo-Muñoz, J. Gené, C. Pinel, D. A. Stevens y D. J. Sullivan.** 2000. Emerging pathogens. *Med. Mycol.* **38**:225-236.

24. **Pujol, I., J. Guarro, J. Gené y J. Sala.** 1997. In-vitro antifungal susceptibility of clinical and environmental *Fusarium spp.* strains. *J. Antimicrob. Chemother.* **39**:163-167.
25. **Raad, I. I., R. Y. Hachem, R. Herbrecht, J. R. Graybill, R. Hare, G. Corcoran y D. P. Kontoyiannis.** 2006. Posaconazole as salvage treatment for invasive fusariosis in patients with underlying hematologic malignancy and other conditions. *Clin. Infect. Dis.* **42**:1398-1403.
26. **Sabatelli, F., R. Patel, P. A. Mann, C. A. Mendrick, C. C. Norris, R. Hare, D. Loebenberg, T. A. Black y P. M. McNicholas.** 2006. *In vitro* activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:2009-2015.
27. **Swofford, D. L.** 2001. PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and other Methods). (Version 4.0) Sinauer Associates, Sunderland, MA.
28. **White, T. J., T. Bruns, S. Lee y J. Taylor.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p. 315-322. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (ed.), *PCR protocols: a guide to the methods and applications*. Academic Press, New York, NY.
29. **Zhang, N., K. O'Donnell, D. A. Sutton, F. A. Nalim, R. C. Summerbell, A. A. Padhye y D. M. Geiser.** 2006. Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment. *J. Clin. Microbiol.* **44**:2186-2190.

#### 4.2. Sensibilidad antifúngica *in vitro* y caracterización molecular de aislados clínicos de *Fusarium verticillioides* (*F. moniliforme*) y *Fusarium thapsinum*

Este estudio fue publicado en la revista *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **52**: 2228-2231, 2008 (Anexo II), con el formato de nota corta que se muestra a continuación.

##### Resumen:

Se utilizó el método de microdilución para testar 11 antifúngicos frente a aislados clínicos pertenecientes a la especie *Fusarium thapsinum* y a tres diferentes grupos filogenéticos de *Fusarium verticillioides* que fueron caracterizados mediante la secuenciación de una región del gen de la  $\beta$ -tubulina. La terbinafina resultó ser el fármaco más activo frente a ambas especies, seguida del posaconazol frente a *F. verticillioides*.

*Fusarium verticillioides* (*F. moniliforme*) es una de las especies más comunes involucrada en casos de fusariosis (7). Estas infecciones son frecuentemente refractarias al tratamiento ya que las especies del género *Fusarium* suelen ser resistentes a los antifúngicos disponibles en la actualidad (1, 12). La información disponible sobre las infecciones clínicas causadas por *F. verticillioides* es limitada porque, en muchos casos de fusariosis, el agente causal no llega a identificarse debido a las dificultades en el reconocimiento de las especies. *F. verticillioides* puede ser morfológicamente confundido con otras especies del complejo *Gibberella fujikuroi* (11, 14, 15). Por estos motivos, los objetivos de este estudio han sido (i) verificar

## Resultados

---

molecularmente la identificación morfológica de numerosas cepas clínicas de *F. verticillioides*, (ii) determinar si constituyen un único grupo filogenético o, en el caso de que se encuentren grupos genéticos diferentes, (iii) determinar si muestran diferencias en cuanto a sus patrones de sensibilidad antifúngica *in vitro*.

Para los dos propósitos iniciales se secuenció una región del gen de la  $\beta$ -tubulina, el cual ha demostrado ser altamente informativo a nivel filogenético en diferentes estudios moleculares del complejo de especies de *G. fujikuroi* (13, 14, 15). En el presente estudio, se incluyeron un total de 46 cepas, principalmente de origen clínico, que habían sido morfológicamente identificadas como *F. verticillioides* (3). También se incluyeron 12 secuencias obtenidas a partir del *GenBank*, correspondientes a *F. verticillioides*, *F. thapsinum* y a 10 especies relacionadas (14, 15) (Tabla 1). Los procedimientos para la extracción del ADN, la amplificación y la secuenciación de la región analizada han sido descritos con anterioridad (5). Los cebadores utilizados, TUB-F y T22 (2, 13) nos permitieron amplificar y secuenciar un fragmento de 433 pb. Sorprendentemente, una búsqueda en la base de datos BLAST demostró que cuatro de los aislados no pertenecían a la especie *F. verticillioides*, sino que fueron identificados como *F. thapsinum*. La diferencia morfológica entre *F. thapsinum* y *F. verticillioides* es problemática. Según Klittich y colaboradores (8), la producción de un pigmento difusible de color amarillo en agar patata dextrosa (PDA) es la principal característica fenotípica que permite distinguir a ambas especies, pero no todas las cepas de la especie *F. thapsinum* producen este pigmento.

El análisis de máxima parsimonia de las secuencias nos permitió obtener 120 árboles filogenéticos de 79 pasos de longitud (Fig. 1). *F. verticillioides* y *F. thapsinum*

TABLA 1. Aislados incluidos en el estudio y sus orígenes.

Especie	Nº Aislado	Origen	Nº GenBank
<i>F. verticillioides</i>	CBS 576.78 (T)	Muestra clínica, Rusia	AM933108
<i>F. verticillioides</i>	CBS 102699	Muestra clínica, Alemania	AM933097
<i>F. verticillioides</i>	CBS 108922	Muestra clínica, Alemania	AM933102
<i>F. verticillioides</i>	CBS 115135	Muestra clínica, Suecia	AM933089
<i>F. verticillioides</i>	FMR 7236	Muestra clínica, España	AM933098
<i>F. verticillioides</i>	FMR 8585	Muestra clínica, España	AM933094
<i>F. verticillioides</i>	FMR 8694	Muestra clínica, España	AM933111
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC R-1027	Muestra clínica, EE.UU.	AM933092
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC R-1213	Muestra clínica, EE.UU.	AM933112
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC R-1214	Muestra clínica, EE.UU.	AM933115
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC 90-715	Muestra clínica, EE.UU.	AM933118
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC 93-459	Muestra clínica, EE.UU.	AM933116
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC 94-106	Muestra clínica, EE.UU.	AM933105
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC 95-2483	Muestra clínica, EE.UU.	AM933099
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC 96-7	Muestra clínica, EE.UU.	AM933110
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC 96-449	Muestra clínica, EE.UU.	AM933101
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC 96-2334	Muestra clínica, EE.UU.	AM933113
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC 99-1013	Muestra clínica, EE.UU.	AM932522
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC 99-1936	Muestra clínica, EE.UU.	AM933109
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC 00-1810	Muestra clínica, EE.UU.	AM933119
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC 02-185	Muestra clínica, EE.UU.	AM933122
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC 03-72	Muestra clínica, EE.UU.	AM933114
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC 03-504	Muestra clínica, EE.UU.	AM933100
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC 03-1454	Muestra clínica, EE.UU.	AM933103
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC 03-1455	Muestra clínica, EE.UU.	AM933104
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC 03-2552	Muestra clínica, EE.UU.	AM933106
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC 04-506	Muestra clínica, EE.UU.	AM933130
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC 04-695	Muestra clínica, EE.UU.	AM933132
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC 05-430	Muestra clínica, EE.UU.	AM933131
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC 05-431	Muestra clínica, EE.UU.	AM932521
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC 05-1039	Muestra clínica, EE.UU.	AM933090
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC 05-3141	Muestra clínica, EE.UU.	AM933091
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC 06-134	Muestra clínica, EE.UU.	AM933121
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC 06-1103	Muestra clínica, EE.UU.	AM933128
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC 06-1639	Muestra clínica, EE.UU.	AM933129
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC 06-3023	Muestra clínica, EE.UU.	AM933120
<i>F. verticillioides</i>	CBS 139.40	Phyllocactus hybridus, Italia	AM933107
<i>F. verticillioides</i>	FMR 9323	Maíz, España	AM933117
<i>F. verticillioides</i>	FMR 9324	Pienso para cerdos, España	AM933093
<i>F. verticillioides</i>	FMR 9325	Pienso para caballos, España	AM933096
<i>F. verticillioides</i>	FMR 8976	Desconocido	AM933095
<i>F. verticillioides</i>	-	-	U34413**
<i>F. thapsinum</i> *	CBS 539.79	Muestra clínica, Italia	AM933124
<i>F. thapsinum</i> *	UTHSC 98-1202	Muestra clínica, EE.UU.	AM933126
<i>F. thapsinum</i> *	UTHSC 03-2158	Muestra clínica, EE.UU.	AM933125
<i>F. thapsinum</i> *	UTHSC 03-3093	Muestra clínica, EE.UU.	AM933123
<i>F. thapsinum</i>	CBS 733.97	Sorghum bicolor, Sudáfrica	AM933127
<i>F. thapsinum</i>	-	-	U34418**
<i>F. denticulatum</i>	-	-	U61550**
<i>F. fujikuroi</i>	-	-	U34415**
<i>F. lactis</i>	-	-	U61551**
<i>F. napiforme</i>	-	-	U34428**
<i>F. nyqamai</i>	-	-	U34426**
<i>F. pseudoanthophilum</i>	-	-	U61553**
<i>F. pseudocircinatum</i>	-	-	U34427**
<i>F. ramiqenum</i>	-	-	U61554**
<i>F. sacchari</i>	-	-	U34414**
<i>F. subglutinans</i>	-	-	U34417**

\* Aislados identificados morfológicamente como *F. verticillioides*. \*\* Secuencias obtenidas a partir del GenBank. (T): Cepa tipo. Abreviaturas: CBS, *Centraalbureau voor Schimmelcultures*, Utrecht, Holanda; FMR, *Facultat de Medicina i Ciències de la Salut*, Reus, España; UTHSC, *University of Texas Health Science Center*, San Antonio, Texas, EE.UU.

## Resultados

---

se separaron claramente del resto de las especies; *F. verticillioides* mostró una elevada variabilidad molecular, la cual se refleja en la existencia de tres grupos moleculares diferentes (I, II y III) y nueve haplotipos.

Se evaluó la actividad *in vitro* de 11 antifúngicos frente a 5 aislados de *F. thapsinum* y 24 de *F. verticillioides* que fueron seleccionados al azar dentro de los diferentes grupos moleculares obtenidos. Los aislados se sembraron en placas de medio PDA y se incubaron a 25°C durante 7 días. Se utilizó un método de microdilución de referencia (10) con algunas modificaciones. El inóculo fue ajustado a una concentración final de  $4 \times 10^3$  a  $5 \times 10^4$  conidios/ml utilizando un hemocitómetro y comprobando la concentración obtenida mediante recuento de colonias en placa de PDA. La cepa ATCC 36257 de la especie *Paecilomyces variotii* se incluyó en cada uno de los análisis realizados como cepa control. Los antifúngicos evaluados fueron AMB, albaconazol, VRC, itraconazol, ravuconazol, terbinafina, ketoconazol (KTC), posaconazol (PSC), micafungina (MFG), fluconazol (FLC) y flucitosina (5-FC). MFG, FLC y 5-FC se diluyeron en agua destilada estéril y el resto en dimetil sulfóxido. Las concentraciones finales obtenidas iban de 64 a 0.12 mg/L para FLC y 5-FC, de 128 a 0.25 mg/L para MFG y de 16 a 0.03 mg/L para el resto. El punto final de lectura del valor de CMI para los triazoles y la AMB se definió como la mínima concentración que produce una completa inhibición del crecimiento (CMI 0), mientras que para FLC, KTC, 5-FC y MFG se definió como la mínima concentración que produce un 50% de inhibición del crecimiento (CMI 2). Las pruebas se realizaron por duplicado en días diferentes y, en aquellos casos en que los resultados no fueron coincidentes se repitió

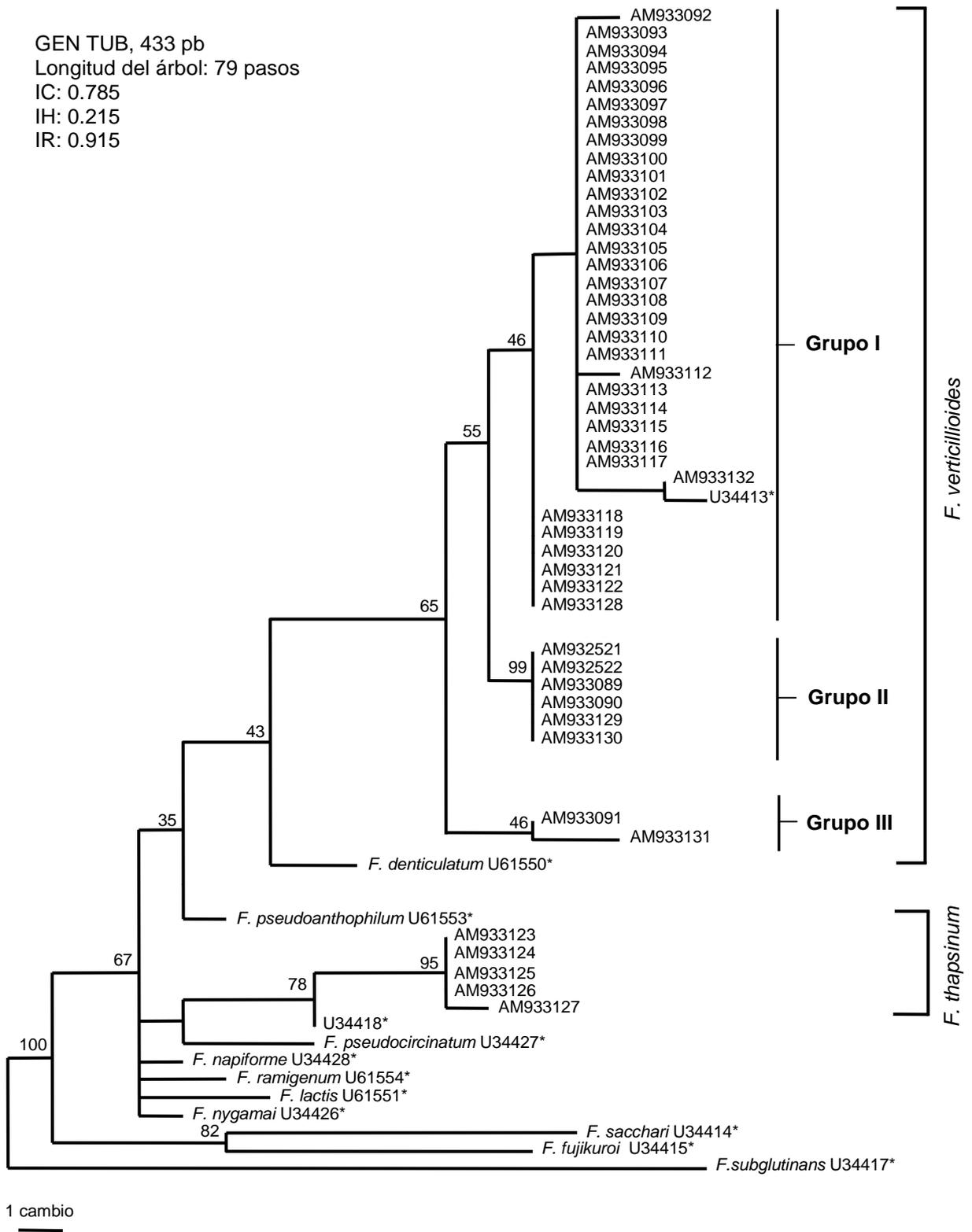


FIG. 1: Uno de los 120 árboles de máxima parsimonia obtenidos a partir de las secuencias del gen  $\beta$ -tubulina. Se indican los valores de *bootstrap* en los nodos. IC, índice de consistencia; IH, índice de homoplasia; IR, índice de retención. Los asteriscos indican las secuencias obtenidas a partir de la base de datos *GenBank*.

Resultados

una tercera vez. Para estos aislados, la CMI se consideró como la moda de los tres valores obtenidos. Los resultados obtenidos para la sensibilidad antifúngica se muestran en la Tabla 2.

TABLA 2. Actividades de los diferentes antifúngicos frente a aislados de *F. verticillioides* y *F. thapsinum*.

Especie y grupo (aislados testados)	CMI (mg/L)	ABC	AMB	ITC	KTC	PSC	RVC	TBF	VRC
<i>F. verticillioides</i> (24)									
Grupo <sup>a</sup> I (16)	Rango	2-4	2-4	2->16	1-4	0.5-1	1-4	0.125-1	2
	MG <sup>b</sup>	3.03	2.41	12.70	2.00	0.79	1.45	0.21	2.00
Grupo II (6)	Rango	2-4	2-4	>16	4->16	0.5-1	1-4	0.125-1	2-4
	MG	3.56	2.24	>16	8	0.89	2.24	0.31	2.83
Grupo III (2)	Rango	4-8	2	>16	4-16	1	4	0.125-0.5	2
	MG	5.66	2	>16	8	1	4	0.25	2
Total	Rango	2-8	2-4	2->16	1->16	0.5-1	1-4	0.125-1	2-4
	MG	3.34	2.33	17.51	3.24	0.83	1.77	0.24	2.19
<i>F. thapsinum</i> (5)	Rango	16->16	2-4	>16	>16	>16	8->16	0.25-0.5	2-4
	MG	18.38	2.64	>16	>16	>16	18.38	0.44	2.64

<sup>a</sup> Ver Fig. 1; <sup>b</sup> MG, media geométrica. ABC, albaconazol; AMB, anfotericina B; ITC, itraconazol; KTC, ketoconazol; PSC, posaconazol; RVC, ravuconazol; TBF, terbinafina; VRC, voriconazol.

En el caso de la especie *F. verticillioides*, la terbinafina fue el antifúngico más activo, seguido por el PSC, ravuconazol, VRC, AMB, KTC, albaconazol e itraconazol en orden decreciente de potencia. Entre estos, el itraconazol prácticamente no presenta actividad. Para *F. thapsinum*, la terbinafina también resultó ser el fármaco más activo. VRC y AMB son los siguientes antifúngicos que presentan más actividad, con valores iguales, mientras que el resto de los antifúngicos testados resultaron ser inactivos. En general, las diferencias entre las CMIs de los grupos moleculares, determinados mediante el test U de Mann-Whitney no fueron estadísticamente significativas, con la excepción del KTC y ravuconazol, los cuales mostraron menos

actividad para los aislados de los grupos moleculares II y III que para los aislados del grupo I ( $P < 0.05$ ). Aunque la AMB y el VRC son los fármacos recomendados para el tratamiento de la fusariosis (4) y se han obtenido razonables niveles de éxito terapéutico (45.5%) con el VRC (18), aquí ambos antifúngicos mostraron una actividad más limitada que la terbinafina para *F. thapsinum* y que la terbinafina y el PSC para *F. verticillioides*. A diferencia de *F. verticillioides*, el PSC no presentó actividad frente a *F. thapsinum*. FLC, 5-FC y MFG no mostraron actividad frente a ninguno de los aislados estudiados, tal y como ya había sido demostrado por otros autores (6, 19, 21). En un estudio *in vitro* previo, la terbinafina combinada con diferentes azoles, tales como albaconazol, ravuconazol y VRC, mostró actividad sinérgica frente a los tres aislados de *F. verticillioides* testados (17). No existen datos del uso de la terbinafina en clínica para tratar infecciones producidas por esta especie. En algunos casos, se observaron recuperaciones en pacientes con fusariosis tratados con PSC, pero las especies involucradas no se identificaron (20).

Estos resultados son esperanzadores ya que, a diferencia de otras especies patógenas del género (1), al menos dos antifúngicos, PSC y terbinafina, parecen ejercer alguna actividad frente a *F. verticillioides*. Este hecho, unido a los resultados obtenidos en estudios con animales, donde *F. verticillioides* resultó ser menos virulenta que *F. solani* (9), sugiere un mejor pronóstico para las infecciones causadas por *F. verticillioides* que para las producidas por *F. solani*.

Este es el primer estudio *in vitro* de sensibilidad antifúngica de *F. thapsinum*. Aunque *F. thapsinum* es un importante patógeno de plantas, también se le han atribuido algunas infecciones en humanos (16, 22). El estudio corrobora la utilidad de los métodos moleculares para la correcta identificación de especies que son difíciles

de distinguir morfológicamente y muestra importantes diferencias en las pautas de sensibilidad antifúngica de *F. verticillioides* y *F. thapsinum*.

#### **Agradecimientos:**

Los autores agradecen a Núria Pilas, Catalina Núñez, Marçal Mariné, M<sup>a</sup> del Mar Rodríguez, Enrique Calvo y Manuela Reyes su contribución a este trabajo. Este trabajo fue financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología español, a través de las concesiones CGL2005-07394/BOS y CGL 2007-65669/BOS.

#### **Bibliografía:**

1. **Azor, M., J. Gené, J. Cano y J. Guarro.** 2006. Universal *in vitro* antifungal resistance of genetic clades of the *Fusarium solani* species complex. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:1500-1503.
2. **Cruse, M., R. Telerant, T. Gallagher, T. Lee y J. W. Taylor.** 2002. Cryptic species in *Stachybotrys chartarum*. *Mycologia* **94**:814-822.
3. **de Hoog, G. S., J. Guarro, J. Gené y M. J. Figueras.** 2000. Atlas of clinical fungi. 2<sup>nd</sup> ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands, University Rovira i Virgili, Reus, Spain.
4. **Dignani, M. C. y E. J. Anaissie.** 2004. Human fusariosis. *Clin. Microbiol. Infect.* **1**:67-75.
5. **Gilgado, F., J. Cano, J. Gené y J. Guarro.** 2005. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. *J. Clin. Microbiol.* **43**:4930-4942.

6. **Groll, A. H., T. Stergiopoulou, E. Roilides y T. J. Walsh.** 2005. Micafungin: pharmacology, experimental therapeutics and clinical applications. *Expert. Opin. Investig. Drugs* **14**: 489-509.
7. **Guarro, J. y J. Gené.** 1995. Opportunistic fusarial infections in humans. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **14**:741-754.
8. **Klittich, C., J. F. Leslie, P. E. Nelson y W. F. Marasas.** 1997. *Fusarium thapsinum* (*Gibberella thapsina*): a new species in section *Liseola* from sorghum. *Mycologia* **89**:643-652.
9. **Mayayo, E., I. Pujol y J. Guarro.** 1999. Experimental pathogenicity of four opportunist *Fusarium* species in a murine model. *J. Med. Microbiol.* **48**:363-366.
10. **NCCLS.** 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.
11. **Nirenberg, I. y K. O'Donnell.** 1998. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* **90**:434-458.
12. **Nucci, M. y E. Anaissie.** 2007. *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**:695-704.
13. **O'Donnell, K. y E. Cigelnik.** 1997. Two divergent intragenomic rADN ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Mol. Phylogenet. Evol.* **7**:103-116.
14. **O'Donnell, K., E. Cigelnik y H. I. Nirenberg.** 1998. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* **90**:465-493.
15. **O'Donnell, K., H. I. Nirenberg, A. Takayuki y E. Cigelnik.** 2000. A multigene

- phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience* **41**: 61-78.
16. **O'Donnell, K., B. A. J. Sarver, M. Brandt, D. C. Chang, J. Noble-Wang, B. J. Park, D. A. Sutton, L. Benjamin, M. Lindsley, A. Padhye, D. M. Geiser y T. J. Ward.** 2007. Phylogenetic diversity and microsphere array-based genotyping of human pathogenic fusaria, including isolates from the multistate contact lens-associated U.S. keratitis outbreaks of 2005 and 2006. *J. Clin. Microbiol.* **45**:2235-2248.
  17. **Ortoneda, M., J. Capilla, F. J. Pastor, I. Pujol y J. Guarro.** 2004. *In vitro* interactions of licensed and novel antifungal drugs against *Fusarium* spp. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **48**:69-71.
  18. **Perfect, J. R., K. A. Marr, T. J. Walsh, R. N. Greenberg, B. DuPont, J. de la Torre-Cisneros, G. Just-Nübling, H. T. Schlamm, I. Lutsar, A. Espinel-Ingroff y E. Johnson.** 2003. Voriconazole treatment for less-common, emerging, or refractory fungal infections. *Clin. Infect. Dis.* **9**:1122-1131.
  19. **Pujol, I., J. Guarro, J. Gené y J. Sala.** 1997. *In vitro* antifungal susceptibility of clinical and environmental *Fusarium* spp. strains. *J. Antimicrob. Chemother.* **39**:163-167.
  20. **Raad, I. I., R. Y. Hachem, R. herbrecht, J. R. Graybill, R. Hare, G. Corcoran y D. P. Kontoyiannis.** 2006. Posaconazole as salvage of invasive fusariosis in patients with underlying hematologic malignancy and other conditions. *Clin. Infect. Dis.* **42**:1398-403.
  21. **Reuben, A., E. Anaissie, P. E. Nelson, R. Hashem, C. Legrand, D. H. Ho y G. P. Bodey.** 1989. Antifungal susceptibility of 44 clinical isolates of *Fusarium* species

determined by using a microdilution method. *Antimicrob Agents Chemother.*

**33**:1647-1649.

22. **Yücesoy, M., M. C. Ergon, H. Oren y Z. Gülay.** 2004. Case report: a *Fusarium* fungemia. *Mikrobiyol Bul.* **38**:265-271.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y FILOGENIA MOLECULAR DE ESPECIES DEL GÉNERO FUSARIUM DE INTERÉS CLÍNICO

Mónica Azor Heras

DL: T.1368-2011

### **4.3. Elevada diversidad genética y pobre respuesta *in vitro* a los antifúngicos de cepas clínicas de *F. oxysporum***

Este estudio ha sido aceptado para su publicación en la revista *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* en el formato de trabajo original que se muestra a continuación.

#### **Resumen:**

**Objetivos:** Determinar la variabilidad genética de aislados clínicos morfológicamente identificados como *Fusarium oxysporum* y verificar si existen diferencias en cuanto a la sensibilidad antifúngica entre los diferentes grupos moleculares obtenidos.

**Métodos:** Se caracterizaron molecularmente 28 aislados mediante el análisis de las secuencias del gen del factor de elongación 1 $\alpha$ . Se utilizó un método de microdilución para testar la sensibilidad antifúngica de estos aislados frente a 11 antifúngicos.

**Resultados y conclusiones:** Se obtuvieron 4 grupos filogenéticos diferentes en el estudio molecular. Aunque todos los antifúngicos mostraron baja actividad frente a los grupos moleculares obtenidos, la terbinafina mostró los mejores resultados.

#### **Introducción**

*Fusarium oxysporum* es un hongo filamentoso cosmopolita que tiene como hábitat el suelo o restos vegetales y es capaz de producir infecciones oportunistas localizadas y diseminadas, las cuales afectan tanto a pacientes inmunocompetentes como severamente neutropénicos<sup>1</sup>, incluso poniendo en riesgo su vida. Muchos casos de fusariosis son debidos a aislados del complejo de especies *Fusarium solani*, seguida en orden de magnitud por aislados del complejo de especies de *F.*

## Resultados

---

*oxysporum*<sup>2</sup>. En estudios recientes de sensibilidad antifúngica *in vitro*, *F. solani* mostró una resistencia universal a los antifúngicos normalmente utilizados<sup>3</sup> mientras que se observó un comportamiento diferente en otras especies comunes del género como *F. verticillioides*<sup>4</sup>. Actualmente, hay poca información disponible acerca de la actividad *in vitro*<sup>5,6</sup> e *in vivo* de los antifúngicos utilizados frente a las especies que forman parte del complejo de especies de *F. oxysporum* y, como resultado, el tratamiento de elección para estas infecciones aún no se ha determinado. Esto es debido, en parte, a las dificultades en la correcta identificación de los aislados del género *Fusarium* a nivel de especie, lo que conlleva que, en numerosos casos clínicos, el agente etiológico quede identificado únicamente como *Fusarium* sp. En años recientes hemos recibido un elevado número de aislados del género de diferentes orígenes clínicos y ambientales para su identificación y un importante número de ellos se han identificado morfológicamente como *F. oxysporum*<sup>7</sup>. Recientemente se demostró que el gen del factor de elongación 1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ) es un excelente marcador filogenético para el género *Fusarium*<sup>1,8,9</sup>. Los objetivos del presente estudio fueron i) verificar el grado de correlación entre la identificación morfológica y molecular ii) determinar la variabilidad genética y si los aislados se incluían en los grupos moleculares del complejo de *F. oxysporum*, previamente descritos y iii) verificar si existen diferencias significativas entre los patrones de sensibilidad antifúngica de los posibles grupos moleculares obtenidos.

## Materiales y métodos

En este estudio se incluyeron un total de 28 aislados de *F. oxysporum* principalmente de origen clínico (Tabla 1), de los que 23 llegaron a nuestro laboratorio

TABLA 1. Aislados incluidos en el estudio y sus orígenes.

Nº Aislado	Grupos de O'Donnell +	Origen	Nº GenBank EF-1a
FMR 4390	Grupo 3	Injerto aórtico, EE.UU.	FM955335
FMR 4394	Grupo 3	Origen clínico, Chile	FM955336
FMR 4396	Grupo 3	Origen clínico, Chile	FM955337
FMR 4402	Grupo 3	Origen clínico, Chile	FM955338
FMR 4942	Grupo 3	Lesión de piel, España	FM955339
FMR 5203	Grupo 3	Origen clínico , Brasil	FM955340
FMR 5205	Grupo 3	Origen clínico , Brasil	FM955341
FMR 7374	Grupo 3	Origen clínico, Chile	FM955342
FMR 7542	Grupo 3	Ambiental, España	FM955343
FMR 7709	Grupo 3	Ambiental, España	FM955344
FMR 7710	Grupo 3	Ambiental, España	FM955345
FMR 7711	Grupo 3	Ambiental, España	FM955346
FMR 7799	Grupo 3	Origen clínico, España	FM955347
FMR 8248	Grupo 3	Ambiental, España	FM955348
FMR 8916	Grupo 3	Origen clínico , Brasil	FM955349
FMR 8918	Grupo 3	Origen clínico , Brasil	FM955350
FMR 8925	Grupo 3	Uña del pie, Brasil	FM955351
FMR 8934	Grupo 3	Uña del pie, Brasil	FM955352
FMR 8937	Grupo 4	Interdigital pie, Brasil	FM955353
FMR 8961	Grupo 3	Origen clínico, Francia	FM955354
FMR 8963	Grupo 3	Origen clínico, Francia	FM955355
FMR 8964	Grupo 3	Origen clínico, Francia	FM955356
FMR 8967	Grupo 3	Origen clínico, Francia	FM955357
NRRL 32873	Grupo 2	Desconocido	AF008512
NRRL 32883	Grupo 2	Desconocido	FM955360
NRRL 25420	Grupo 2	<i>Gossypium hirsutum</i> , unknown	FM955610
NRRL 25429	Grupo 3	Desconocido	FM955358
NRRL 32558	Grupo 1	Desconocido	FM955359
NRRL 22549	Grupo 3	-	AF008505*
NRRL 22550	Grupo 1	-	AF008506*
NRRL 22555	Grupo 3	-	AF008511*
NRRL 25357	Grupo 1	-	AF008481*
NRRL 25378	Grupo 3	-	AY527428*
NRRL 25598	Grupo 2	-	AF008496*
NRRL 25603	Grupo 1	-	AF008487*
NRRL 25728	Grupo 3	-	AY527429*
NRRL 25749	Grupo 3	-	AY527430*
NRRL 26033	Grupo 3	-	AF008507*
NRRL 26034	Grupo 3	-	AF008497*
NRRL 26035	Grupo 1	-	AF008485*
NRRL 26180	Grupo 3	-	AY527431*
NRRL 26200	Grupo 3	-	AF008499*
NRRL 26360	Grupo 4	-	AY527522*
NRRL 26361	Grupo 3	-	AY527432*
NRRL 26367	Grupo 2	-	AY527529*
NRRL 26374	Grupo 3	-	AF008483*
NRRL 26379	Grupo 3	-	AF008508*
NRRL 26574	Grupo 3	-	AF008495*
NRRL 26680	Grupo 3	-	AY527530*
NRRL 28680	Grupo 4	-	AY527524*

\*Grupos referidos a O'Donnell y colaboradores<sup>1,8</sup> \* Secuencias obtenidas a partir del GenBank.  
 Abreviaturas: FMR, *Facultat de Medicina i Ciències de la Salut*, Reus, España; NRRL, *National Center for Agricultural Utilization Research*, Peoria, EE.UU.

## Resultados

---

desde diferentes centros para su identificación. Estos aislados fueron identificados siguiendo los criterios morfológicos convencionales<sup>7</sup> y depositados en la colección de la Facultad de Medicina de Reus (FMR), para su estudio y conservación. Además, se incluyeron 5 cepas de referencia, las cuales representaban diferentes grupos moleculares descritos por O'Donnell y colaboradores<sup>1,8</sup>. Estos aislados se obtuvieron desde el *Agricultural Research Service* (ARS/NRRL).

Para confirmar la identificación morfológica y determinar la variabilidad genética de los 28 aislados se secuenció una región del gen EF-1 $\alpha$ , siguiendo los procedimientos previamente descritos por Gilgado y colaboradores<sup>9</sup> para la extracción del ADN, la amplificación y la secuenciación de la región analizada, con algunas modificaciones. Se utilizaron los cebadores EF-1H y EF-2T<sup>10</sup> con una temperatura de hibridación de 55°C y se utilizó el kit *Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (*General Electric Healthcare*, Buckinghamshire, Reino Unido) para purificar los productos de PRC obtenidos. También se incluyeron 22 secuencias de esta región obtenidas de la base de datos *GenBank*, que pertenecían a los 4 grupos moleculares principales descritos por O'Donnell *et al.*<sup>1,8</sup> (Tabla 1). Todas las secuencias se alinearon mediante el programa Clustal X (version 1.8)<sup>11</sup> y se revisaron visualmente utilizando un procesador de textos. El análisis filogenético se realizó con el programa PAUP\*, versión 4.0b10<sup>12</sup>. Los árboles de máxima parsimonia se obtuvieron realizando 100 búsquedas heurísticas con las opciones de *random sequence addition* y *tree bisection-reconnection branch-swapping algorithms, collapsing zero-length branches* y guardando los árboles de mínima longitud (*MulTrees*). El soporte estadístico de los grupos moleculares obtenidos se evaluó mediante el método de *bootstrapping* generando 500 pseudoréplicas.

Se ensayó la actividad *in vitro* de 11 antifúngicos frente a los 28 aislados utilizando el método de microdilución de referencia<sup>13</sup> con algunas modificaciones. Los aislados se sembraron en placas de agar patata dextrosa (PDA) y se incubaron a 25°C durante 7 días. El inóculo se ajustó a una concentración final de  $4 \times 10^3$  to  $5 \times 10^4$  conidios/mL con un hemocitómetro y se verificó por recuento en placa de PDA. Los antifúngicos evaluados fueron anfotericina B, albaconazol, voriconazol, itraconazol, ravuconazol, terbinafina, ketoconazol, posaconazol, micafungina, fluconazol y flucitosina. Micafungina, fluconazol y 5-flucitosina se diluyeron en agua destilada estéril y el resto en dimetil sulfóxido. Las concentraciones finales obtenidas iban de 64 a 0.12 mg/L para fluconazol y 5-flucitosina, de 128 a 0.25 mg/L para micafungina y de 16 a 0.03 mg/L para el resto. El punto final de lectura para los triazoles y la anfotericina B se definió como la mínima concentración que produce una completa inhibición del crecimiento, mientras que para fluconazol, ketoconazol, 5-flucitosina y micafungina se definió como la mínima concentración que produce un 50% de inhibición del crecimiento. La cepa ATCC 36257 de la especie *Paecilomyces variotii* se incluyó en cada uno de los análisis realizados como cepa control. Las pruebas se realizaron por duplicado en días diferentes y, en aquellos casos en que los resultados no fueron coincidentes, se repitió una tercera vez. Para estos aislados, la CMI se consideró como la moda de los tres valores obtenidos. Para comparar los valores de susceptibilidad antifúngica de los diferente grupos moleculares se usó el test U de Mann-Whitney ( $P < 0.05$ ), incluido en el programa *GraphPad version 4.0* para Windows.

## Resultados y discusión

Con los cebadores utilizados se llegó a amplificar y secuenciar un fragmento de

Resultados

531 pb del gen EF-1 $\alpha$ . Los 23 aislados recibidos para su identificación fueron morfológicamente identificados como *F. oxysporum*. La identificación morfológica fue confirmada por comparación molecular con cepas de referencia, con un 100% de correlación. El análisis parsimónico de los datos dio como resultado la obtención de 36 árboles filogenéticos de 55 pasos de longitud (Fig. 1). Se obtuvieron cuatro grupos moleculares principales (1, 2, 3 y 4) los cuales habían sido previamente descritos por O'Donnell y colaboradores<sup>1,8</sup>. El grupo molecular 3 fue el mayor y más variable, agrupando 4 subgrupos diferentes (3a, 3b, 3c y 3d). El subgrupo 3a incluyó 3 haplotipos, el más común de los cuales agrupaba 12 aislados que coincidieron con el grupo clonal descrito previamente por O'Donnell y colaboradores<sup>1</sup>. No se vió relación

TABLA 2. Actividad de diferentes antifúngicos frente a aislados de los cuatro grupos moleculares de *F. oxysporum*.

Grupo* (nº de aislados testados)	CMI (mg/L)	ABC	AMB	KTC	PSC	RVC	TBF	VRC
Grupo 1 (1)	Rango	16	2	32	32	8	0.25	4
	MG <sup>a</sup>	16	2	32	32	8	0.25	4
Grupo 2 (4)	Rango	16	2	16	2-32	8	0.125-0.5	4-8
	MG	16	2	16	16	8	0.35	5.66
Grupo 3 (22):	Rango	8-32	2-8	2-32	32	4-32	0.25-32	4-32
	MG	16	2.42	10.62	32	11.31	3.88	6.22
Subgrupo 3a (9)	Rango	8-16	2	2-8	32	8	0.25-0.5	4-8
	MG	10.08	2	4.32	32	7.41	0.46	4.67
Subgrupo 3b (7)	Rango	16-32	2-4	16-32	32	8-32	0.5-32	4-8
	MG	19.50	2.69	23.78	32	14.49	9.75	5.38
Subgrupo 3c (2)	Rango	16-32	2	8-32	32	16	32	8
	MG	22.63	2	16	32	16	32	8
Subgrupo 3d (4)	Rango	16-32	2-8	4-32	32	8-32	32	8-32
	MG	26.91	3.36	16	32	16	32	13.45
Grupo 4 (1)	Rango	32	2	32	32	16	32	8
	MG	32	2	32	32	16	32	8
<b>Total (28)</b>	Rango	8-32	2-8	2-32	2-32	8-32	0.125-32	4-32
	MG	16.40	2.32	12.19	28.98	10.77	2.69	6.09

\*Grupos referidos a la Fig. 1; <sup>a</sup> MG, media geométrica; ABC, albaconazol; AMB, anfotericina B; KTC, ketoconazol; PSC, posaconazol; RVC, ravuconazol; TBF, terbinafina; VRC, voriconazol.

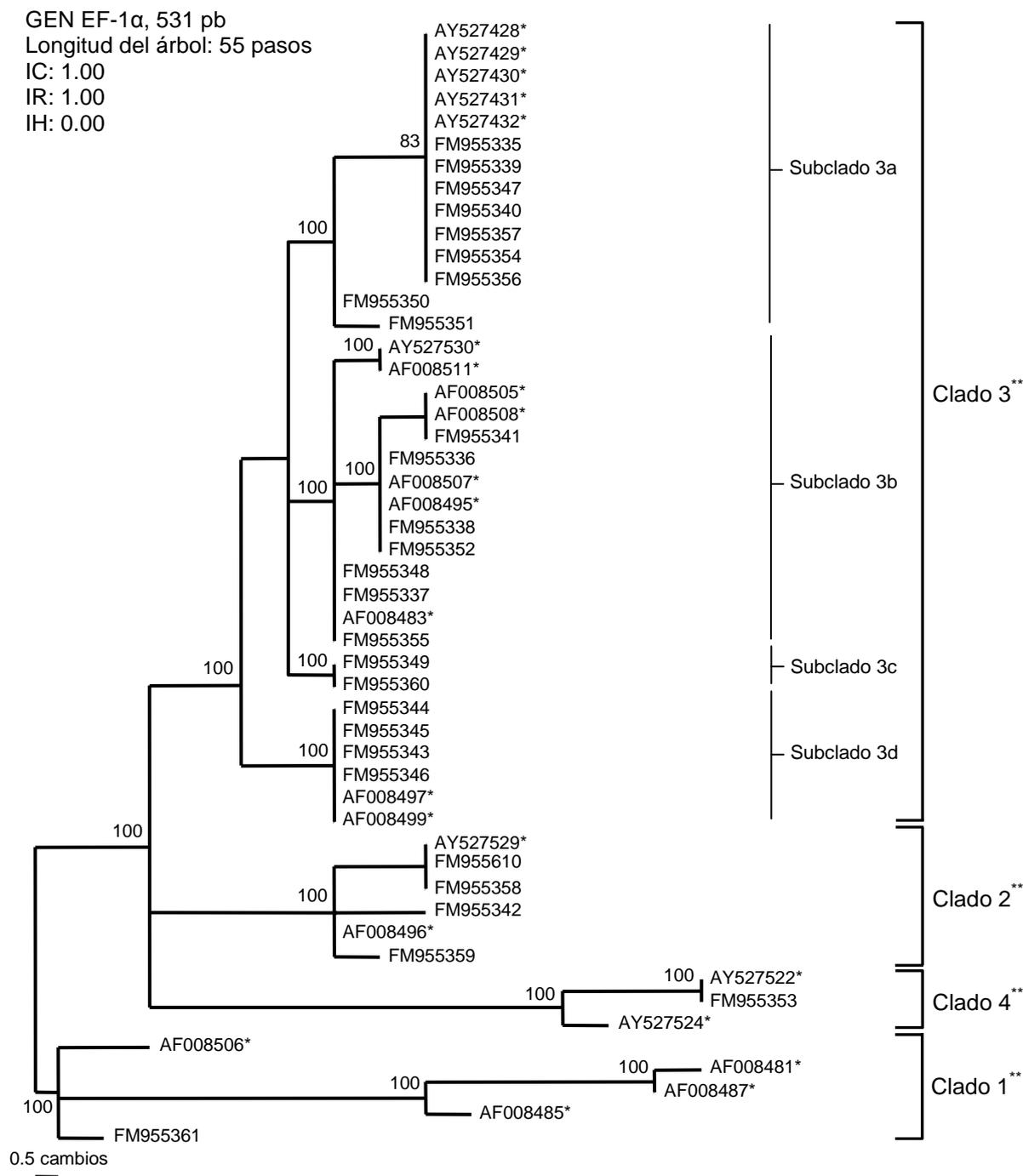


FIG. 1: Uno de los 36 árboles de máxima parsimonia obtenidos a partir de las secuencias del gen EF-1 $\alpha$ . Se indican los valores de *bootstrap* en los nodos. IC, índice de consistencia; IH, índice de homoplasi; IR, índice de retención. \*Secuencias obtenidas a partir del *GenBank*. \*\*Grupos filogenéticos según O'Donnell y colaboradores<sup>1,8</sup>.

## Resultados

---

entre el origen geográfico de los aislados y los grupos moleculares obtenidos. Tampoco se obtuvieron grupos filogenéticos diferentes a los previamente descritos por el estudio de estos autores<sup>1</sup>.

Los resultados de las pruebas de susceptibilidad se muestran en la Tabla 2. En general todos los antifúngicos mostraron baja actividad. La AMB mostró el valor más bajo para la media geométrica (MG) total de los valores de CMI (2.32 mg/L), pero sin diferencias significativas entre los diferentes grupos moleculares según el test U de Mann-Whitney ( $P > 0.05$ ). La actividad *in vitro* de la AMB frente a *F. oxysporum* en la literatura es muy variable con valores de CMI que van de 0.5 a  $>16$  mg/L<sup>6,14-18</sup>. La experiencia clínica confirma la baja actividad de este antifúngico para tratar las infecciones producidas por *F. oxysporum*<sup>19-21</sup>. La terbinafina mostró el segundo valor más bajo de MG CMI (2.69 mg/L), lo cual discrepa con los resultados obtenidos en el estudio de Alastruey-Izquierdo y colaboradores<sup>5</sup>, donde se incluyeron 14 aislados de *F. oxysporum*, obteniéndose un valor de MG CMI de 10.77 mg/L. Sin embargo, nuestros resultados son variables, con un rango total de 0.125-32 mg/L y con diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos moleculares. El aislado perteneciente al grupo 4 presentó resistencia (MG CMI: 32 mg/L), mientras que todos los aislados del grupo 1 (MG CMI: 0.25 mg/L) y del grupo 2 (MG CMI: 0.35 mg/L) mostraron valores considerablemente bajos. En cuanto al grupo 3, los valores de sensibilidad antifúngica dependieron del subgrupo. Todos los aislados del subgrupo 3a fueron sensibles (MG CMI: 0.46 mg/L), mientras que los subgrupos 3c y 3d fueron resistentes (MG CMI: 32 mg/L) y el subgrupo 3b presentó resultados diferentes en función del aislado. A pesar de esta variable actividad *in vitro*, la terbinafina ha sido utilizada con éxito en dos casos de onicomicosis producidos por *F. oxysporum*<sup>22</sup>, así

como su combinación con AMB liposomal también resultó efectiva en el tratamiento de una infección diseminada también causada por esta especie <sup>23</sup>.

El resto de los antifúngicos ensayados fueron prácticamente inactivos, incluyendo el VRC, el cual mostró un valor de MG CMI de 6.09 mg/L, lo cual corrobora resultados obtenidos en estudios *in vitro* anteriores<sup>5,14-18</sup>. A pesar de estos resultados, Gorman y colaboradores<sup>24</sup> publicaron un caso de neumonía producida por *F. oxysporum* en un paciente inmunocompetente, el cual respondió con éxito a la terapia oral con VRC. Los siguientes antifúngicos más activos en orden decreciente de actividad fueron RVC, KTC, ABC y PSC. De acuerdo con resultados obtenidos por otros autores, FLC, ITC, 5-FC y MFG no presentaron actividad frente a ninguno de los aislados<sup>6, 16, 17, 25, 26</sup>.

En conclusión, *F. oxysporum* muestra un comportamiento similar a *F. solani* <sup>3</sup>, con una elevada resistencia a todos los antifúngicos testados excepto, en este caso, la terbinafina. Además, el presente trabajo confirma la variabilidad molecular en el complejo de *F. oxysporum*, demostrada previamente por otros estudios<sup>1,8</sup> y muestra que esta variabilidad se relaciona con un diferente comportamiento de los aislados frente a la terbinafina.

#### **Agradecimientos:**

Los autores agradecen a K. O'Donnell (*National Center for Agricultural Utilization Research*, Peoria, EE.UU.) por suministrar varios de los aislados utilizados en este estudio, así como a Núria Pilas, Catalina Núñez y Eduardo Álvarez por sus contribuciones a este trabajo.

## Financiación

Este trabajo ha sido respaldado por el Instituto Pere Virgili y el Ministerio de Ciencia y Tecnología (España), con las becas CGL 2005-07394/BOS y CGL 2007-65669/BOS.

## Bibliografía:

1. O'Donnell K, Sutton DA, Rinaldi MG *et al.* Genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium oxysporum* complex inferred from multilocus DNA sequence data and amplified fragment length polymorphism analyses: evidence for the recent dispersion of a geographically widespread clonal lineage and nosocomial origin. *J Clin Microbiol* 2004; **42**: 5109-5120.
2. Nucci M, Anaissie E. *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev* 2007; **20**: 695-704.
3. Azor M, Gené J, Cano J *et al.* Universal *in vitro* antifungal resistance of genetic clades of the *Fusarium solani* species complex. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 1500-1503.
4. Azor M, Gené J, Cano J *et al.* *In vitro* antifungal susceptibility and molecular characterization of clinical isolates of *Fusarium verticillioides* (*F. moniliforme*) and *Fusarium thapsinum*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 2228-2231.
5. Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Monzón A *et al.* Antifungal susceptibility profile of clinical *Fusarium* spp. isolates identified by molecular methods. *J Antimicrob Chemother* 2008; **61**: 805-809.
6. Tortorano AM, Prigitano A, Dho G *et al.* Species distribution and *in vitro* antifungal susceptibility patterns of 75 clinical isolates of *Fusarium* spp. from Northern Italy. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 2683-2685.

7. de Hoog GS, Guarro J, Gené J *et al.* *Atlas of clinical fungi*. 2<sup>nd</sup> ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands, University Rovira i Virgili, Reus, Spain. 2000.
8. O'Donnell K, Kistler HC, Cigelnik E *et al.* Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 2044-2049.
9. Gilgado F, Cano J, Gené J *et al.* Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 4930-4942.
10. O'Donnell K. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. *Mycologia* 2000; **92**: 919-938.
11. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F *et al.* The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997; **24**: 4876-4882.
12. Swofford DL. *PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and other methods) (version 4.0)*. Sinauer Associates, Sunderland, Mass., USA, 2001.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi-Second edition: Approved standard M38-A2*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2008.
14. Espinel-Ingroff A. *In vitro* fungicidal activities of voriconazole, itraconazole, and amphotericin B against opportunistic moniliaceous and dematiaceous fungi. *J Clin Microbiol* 2001; **39**: 954-958.

## Resultados

---

15. Espinel-Ingroff A, Boyle K, Sheehen DJ. *In vitro* antifungal activities of voriconazole and reference agents as determined by NCCLS methods: Review of the literature. *Mycopathologia* 2001; **150**: 101-115.
16. Lewis RE, Wiederhold NP, Klepser ME. *In vitro* pharmacodynamics of Amphotericin B, itraconazole, and voriconazole against *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Scedosporium* spp. *J Antimicrob Chemother* 2005; **49**: 945-951.
17. Cuenca-Estrella M, Gómez-López A, Mellado E *et al.* Head-to-head comparison of the activities of currently available antifungal agents against 3378 Spanish clinical isolates of yeasts and filamentous fungi. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 917-921.
18. Sabatelli F, Patel R, Mann PA *et al.* *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; **50**: 2009-2015.
19. Krcmery VJr, Jesenska Z, Spanik S *et al.* Fungaemia due to *Fusarium* spp. in cancer patients. *J Hosp Infect* 1997; **36**: 223-228.
20. Sander A, Beyer U, Amberg R. Systemic *Fusarium oxysporum* infection in an immunocompetent patient with an adult respiratory distress syndrome (ARDS) and extracorporeal membrane oxygenation (ECMO). *Mycoses* 1998; **41**: 109-111.
21. Olivares R, Alfaro J, Díaz MC *et al.* Disseminated fusariosis by *Fusarium oxysporum* in an adult patient with acute myeloid leukemia and severe febrile neutropenia. *Rev Chilena Infectol* 2005; **22**: 356-360.
22. Gianni C, Cerri A, Crosti C. Unusual clinical features of fingernail infection by *Fusarium oxysporum*. *Mycoses* 1997; **40**: 455-459.

23. Rothe A, Seibold M, Hoppe T *et al.* Combination therapy of disseminated *Fusarium oxysporum* infection with terbinafine and amphotericin B. *Ann Hematol* 2004; **83**: 394-397.
24. Gorman SR, Magiorakos AP, Zimmerman SK *et al.* *Fusarium oxysporum* pneumonia in an immunocompetent host. *South Med J* 2006; **99**: 613-616.
25. Pujol I, Guarro J, Gené J *et al.* *In vitro* antifungal susceptibility of clinical and environmental *Fusarium* spp. strains. *J Antimicrob Chemother* 1997; **39**: 163-167.
26. Groll AH, Stergiopoulou T, Roilides E *et al.* Micafungin: pharmacology, experimental therapeutics and clinical applications. *Exp Opin Investig Drugs* 2005; **14**: 489-509.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y FILOGENIA MOLECULAR DE ESPECIES DEL GÉNERO FUSARIUM DE INTERÉS CLÍNICO

Mónica Azor Heras

DL: T.1368-2011

#### 4.4. Especies de *Fusarium* de interés clínico menos frecuentes: correlación entre la identificación morfológica y molecular y sensibilidad antifúngica

Este estudio ha sido aceptado en la revista *Journal of Clinical Microbiology* para su publicación en el formato de trabajo original que se muestra a continuación.

##### Resumen:

Cuarenta y ocho aislados del género *Fusarium*, morfológicamente identificados como pertenecientes a siete especies de interés clínico (*Fusarium chlamydosporum*, *Fusarium dimerum*, *Fusarium incarnatum*, *Fusarium napiforme*, *Fusarium nygamai*, *Fusarium proliferatum* y *Fusarium sacchari*) fueron caracterizados molecularmente analizando las secuencias de la región TUB del gen  $\beta$ -tubulina. Se obtuvo un elevado grado de correlación entre la identificación morfológica y molecular. *F. chlamydosporum* y *F. dimerum* fueron las especies más heterogéneas a nivel genético. Asimismo, se determinó la sensibilidad antifúngica de los aislados frente a once antifúngicos, siendo la terbinafina la más activa para todas las especies, excepto para *F. incarnatum*, que mostró más sensibilidad frente a la anfotericina B.

##### Introducción

Las especies del género *Fusarium* más frecuentemente aisladas a partir de infecciones en humanos son *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* y *Fusarium verticillioides* (1, 14, 45) aunque, en años recientes, se han descrito otras especies como agentes etiológicos de infección en humanos. Estas otras especies incluyen *Fusarium chlamydosporum*, *Fusarium dimerum*, *Fusarium incarnatum*, *Fusarium napiforme*, *Fusarium nygamai*, *Fusarium proliferatum* y *Fusarium sacchari* (10, 29), las

## Resultados

---

cuales han sido asociadas con diferentes enfermedades, en particular, queratomycosis y otras infecciones oculares (23) e infecciones diseminadas en pacientes inmunocomprometidos principalmente en el caso de *F. dimerum* (2, 24, 37), *F. proliferatum* (5, 18, 39, 42) y *F. chlamydosporum* (21, 41).

La incidencia real de estas especies no se conoce ya que la identificación del agente causal en el caso de las fusariosis es difícil, por lo que, en muchos casos, sólo se llega a identificar como *Fusarium* sp. Sin embargo, varios estudios recientes han demostrado la utilidad de los métodos moleculares para la identificación de especies del género difíciles de diferenciar morfológicamente (1, 4, 45). En los últimos años se ha evaluado la sensibilidad antifúngica *in vitro* de las especies de *Fusarium* más importantes (1, 4, 38,45), pero se han estudiado pocos aislados de las especies menos comunes.

Dado que los métodos de secuenciación permiten llevar a cabo una identificación fiable de los aislados clínicos de *Fusarium*, los objetivos del presente estudio han sido i) evaluar la correlación entre la identificación morfológica y molecular de las especies menos frecuentes de *Fusarium* recibidas en nuestro laboratorio para su identificación ii) determinar la sensibilidad antifúngica de aislados representativos de estas especies de *Fusarium* menos frecuentes en clínica, identificadas molecularmente.

## Materiales y métodos

### Aislados e identificación morfológica

Se incluyeron en el estudio 48 aislados (Tabla 1), 29 de los cuales, la mayoría de origen clínico, habían sido enviados a nuestro laboratorio desde diferentes centros

TABLA 1. Aislados incluidos en este estudio y sus orígenes.

Especies	Nº Aislado	Origen	Nº GenBank
<i>F. chlamydosporum</i>	FMR 7232	Origen clínico, Argentina	FM878927
<i>F. chlamydosporum</i>	FMR 9683	Suelo, España	FM878934
<i>F. chlamydosporum</i>	FMR 9684	Suelo, España	FM878940
<i>F. chlamydosporum</i>	NRRL 32521	Origen clínico, desconocido	FM878935
<i>F. chlamydosporum</i>	NRRL 34012	Desconocido	FM878936
<i>F. chlamydosporum</i>	NRRL 34019	Desconocido	FM878937
<i>F. chlamydosporum</i>	NRRL 34022	Desconocido	FM878938
<i>F. chlamydosporum</i>	NRRL 34033	Desconocido	FM878939
<i>F. dimerum</i>	FMR 6320	Origen clínico, Brasil	FM878630
<i>F. dimerum</i>	FMR 9042	Origen clínico, Francia	FM878631
<i>F. dimerum</i>	FMR 9105	Origen clínico, India	FM878632
<i>F. dimerum</i>	FMR 9580	Origen clínico, India	FM878633
<i>F. dimerum</i>	FMR 9584	Origen clínico, India	FM878629
<i>F. dimerum</i>	FMR 9590	Origen clínico, India	FM878634
<i>F. dimerum</i>	CBS 115623	Desconocido	FM878635
<i>F. incarnatum*</i>	FMR 4403	Origen clínico, Chile	FM878941
<i>F. incarnatum*</i>	FMR 4404	Origen clínico, Chile	FM878926
<i>F. incarnatum</i>	FMR 9096	Origen clínico, India	FM878928
<i>F. incarnatum</i>	FMR 9097	Origen clínico, India	FM878929
<i>F. incarnatum</i>	FMR 9098	Origen clínico, India	FM878930
<i>F. incarnatum</i>	FMR 9099	Origen clínico, India	FM878931
<i>F. incarnatum</i>	FMR 9100	Origen clínico, India	FM878932
<i>F. incarnatum</i>	FMR 9101	Origen clínico, India	FM878933
<i>F. incarnatum</i>	CBS 131.73	<i>Musa sapientum</i> var. <i>robusta</i> , Bahamas	FM878942
<i>F. napiforme</i>	CBS 673.94	Desconocido	FM878607
<i>F. napiforme</i>	NRRL 25196	<i>Pennisetum typhoides</i> , Sudáfrica	FM878605
<i>F. napiforme</i>	NRRL 25201	<i>Pennisetum typhoides</i> , Sudáfrica	FM878606
<i>F. napiforme</i>	-	-	U34483**
<i>F. nygamai</i>	CBS 140.95	Origen clínico, Egipto	FM878613
<i>F. nygamai</i>	CBS 675.94	<i>Striga hermonthica</i> , Sudán	FM878614
<i>F. nygamai</i>	NRRL 13448	Sorghum bicolor, Australia	FM878624
<i>F. nygamai</i>	NRRL 22106	<i>Cajanus cajan</i> , India	FM878625
<i>F. nygamai</i>	NRRL 25312	<i>Cajanus indicus</i> , India	FM878626
<i>F. nygamai</i>	NRRL 25449	<i>Oryza sativa</i> , Marruecos	FM878627
<i>F. nygamai</i>	NRRL 25450	<i>Striga hermonthica</i> , Sudán	FM878628
<i>F. nygamai</i>	-	-	U34481**
<i>F. proliferatum</i>	CBS 620.80	<i>Sitobion avenae</i> , Reino Unido	FM878609
<i>F. proliferatum</i>	FMR 4382	Origen clínico, EE.UU.	FM878610
<i>F. proliferatum</i>	FMR 4387	Origen clínico, EE.UU.	FM878611
<i>F. proliferatum</i>	FMR 5124	Origen clínico, España	FM878612
<i>F. proliferatum</i>	FMR 7239	Origen clínico, España	FM878615
<i>F. proliferatum</i>	FMR 7377	Origen clínico, España	FM878616
<i>F. proliferatum</i>	FMR 9036	Origen clínico, Francia	FM878617
<i>F. proliferatum</i>	FMR 9435	Origen clínico, EE.UU.	FM878621
<i>F. proliferatum</i>	FMR 9436	Origen clínico, EE.UU.	FM878622
<i>F. proliferatum</i>	-	-	U34471**
<i>F. sacchari</i>	CBS 223.76	<i>Saccharum officinarum</i> , India	FM878608
<i>F. sacchari</i>	FMR 9102	Origen clínico, India	FM878618
<i>F. sacchari</i>	FMR 9103	Origen clínico, India	FM878619
<i>F. sacchari</i>	FMR 9106	Origen clínico, India	FM878620
<i>F. sacchari</i>	FMR 9578	Origen clínico, India	FM878623
<i>F. sacchari</i>	-	-	U34469**
<i>F. subglutinans</i>	-	-	U34472**

\*Recibidos como *F. equiseti*. \*\*Secuencias obtenidas a partir del *GenBank*. Abreviaturas utilizadas: CBS, *Centraalbureau voor Schimmelcultures*, Utrecht, Holanda; FMR, *Facultat de Medicina i Ciències de la Salut*, Reus, España; NRRL, *National Center for Agricultural Utilization Research*, Peoria, EE.UU.

## Resultados

---

clínicos para su identificación. Estos aislados fueron identificados siguiendo los criterios morfológicos convencionales (23, 26, 28). Para determinar las características de la colonia así como las características microscópicas, los aislados se cultivaron en agar patata dextrosa (PDA; Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EE.UU.) y agar harina de avena (OA; 30 g de copos de avena, 1 g de MgSO<sub>4</sub>, 1,5 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 15 g de agar, 1 L de agua destilada), incubando a 25°C en oscuridad. Las tasas de crecimiento se obtuvieron a partir de las colonias en PDA a 25°, 37° y 40°C después de 4 y 10 d de incubación en oscuridad. Además, se utilizaron 19 cepas de referencia obtenidas a partir del *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (CBS) y del *Agricultural Research Service* (ARS/NRRL), las cuales también fueron examinadas morfológicamente siguiendo el procedimiento mencionado.

### Estudio molecular

Para el análisis filogenético, se secuenció una región del gen de la β-tubulina, el cual ha demostrado ser altamente informativo a nivel filogenético en diferentes estudios moleculares del género (31, 32, 33). El procedimiento para la extracción del ADN, la amplificación y la secuenciación de la región analizada había sido previamente descrita por Gilgado y colaboradores (11) con algunas modificaciones. Se utilizaron los cebadores TUB-F (8) y T22 (31) con una temperatura de hibridación de 55°C y el kit *Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (*General Electric Healthcare*, Buckinghamshire, Reino Unido) para purificar los productos de PRC obtenidos. El proceso de secuenciación permitió obtener un fragmento de 375 pb del gen de la β-tubulina. También se incluyeron 5 secuencias de referencia obtenidas a partir del *GenBank*, correspondientes a *F. nygamai*, *F. napiforme*, *F. sacchari*, *F.*

*subglutinans* y *F. proliferatum*, las únicas secuencias de las especies del presente trabajo disponibles en la base de datos (Tabla 1). Todas las secuencias se alinearon mediante el programa Clustal X (version 1.8) (44) y se revisaron visualmente utilizando un procesador de textos. El análisis filogenético se realizó con el programa PAUP\*, versión 4.0b10 (43). Los árboles de máxima parsimonia se obtuvieron realizando 100 búsquedas heurísticas con las opciones de *random sequence addition* y *tree bisection-reconnection branch-swapping algorithms, collapsing zero-length branches* y guardando los árboles de mínima longitud (*MulTrees*). El soporte estadístico de los grupos moleculares obtenidos se evaluó mediante el método de *bootstrapping* generando 500 pseudoréplicas.

### Estudio de sensibilidad antifúngica

Se evaluó la actividad *in vitro* de los 11 antifúngicos frente a los 48 aislados (Tabla 3), los cuales se sembraron en placas de PDA y se incubaron a 25°C durante 7 días. Se utilizó el método de microdilución de referencia (7) con algunas modificaciones. El inóculo se ajustó a una concentración final de  $4 \times 10^3$  a  $5 \times 10^4$  conidios/mL utilizando un hemocitómetro y se verificó por recuento en placa de PDA. Los antifúngicos evaluados fueron AMB, albaconazol, VRC, itraconazol, ravuconazol, terbinafina, ketoconazol (KTC), posaconazol (PSC), micafungina (MFG), fluconazol (FLC) y flucitosina (5-FC). MFG, FLC y 5-FC se diluyeron en agua destilada estéril y el resto en dimetil sulfóxido. Las concentraciones finales obtenidas iban de 64 a 0.12 mg/L para FLC y 5-FC, de 128 a 0.25 mg/L para MFG y de 16 a 0.03 mg/L para el resto. El punto final de lectura de la CMI se definió para los triazoles y la AMB como la mínima concentración que produce una completa inhibición del crecimiento (CMI 0),

## Resultados

---

mientras que para FLC, KTC, 5-FC y MFG se definió como la mínima concentración que produce un 50% de inhibición del crecimiento (CMI 2). La cepa ATCC 36257 de la especie *Paecilomyces variotii* se incluyó en cada uno de los análisis realizados como cepa control. Las pruebas se realizaron por duplicado en días diferentes y, en aquellos casos en que los resultados no fueron coincidentes, se repitió una tercera vez. Para estos aislados, la CMI se consideró como la moda de los tres valores obtenidos.

## Resultados

### Correlación entre la identificación morfológica y molecular

Los 29 aislados de *Fusarium* recibidos para su identificación fueron morfológicamente determinados como *F. chlamydosporum* (n=3), *F. dimerum* (n=6), *F. proliferatum* (n=8) y *F. incarnatum* (n=8). Cuatro de ellos presentaban características tales que resultaba difícil discriminar si pertenecían a la especie *F. sacchari* o a *F. subglutinans*, sin embargo, basándonos en la presencia de microconidios septados se identificaron tentativamente como *F. sacchari*. La comparación molecular con las cepas de referencia confirmó la identificación de nuestros aislados. La Tabla 2 resume las características morfológicas más relevantes que permiten diferenciar estas especies y que pueden ser de ayuda para aquellos laboratorios que no tienen facilidades para la identificación de los aislados clínicos mediante técnicas moleculares.

### Estudio molecular

Con los cebadores utilizados se amplificó y secuenció un fragmento de 378 pb. El análisis parsimónico de los datos permitió obtener 225 árboles filogenéticos de 157

TABLA 2. Características morfológicas distintivas de 7 especies de *Fusarium* de interés clínico.

<b>Especies</b>	<b>Características distintivas</b>
<i>F. chlamydosporum</i>	<p><b>Colonias*</b>: de blanquecinas con áreas rosadas a rosa fuerte  <b>Tasa de crecimiento*</b>: mayor de 30 mm  <b>Células conidiógenas del micelio aéreo</b>: usualmente polifiálides  <b>Microconidios</b>: abundantes, usualmente 0-2 septos, obovoides o fusiformes, generalmente solitarios en el <i>locus</i> conidiogénico  <b>Macroconidios</b>: escasos, sólo en esporodoquios, 3-5 septos, ligeramente falciformes  <b>Clamidosporas</b>: abundantes, usualmente en cadenas, marrón claro, rugosas</p>
<i>F. dimerum</i>	<p><b>Colonias</b>: de naranja brillante a albaricoque  <b>Tasa de crecimiento</b>: menor de 30 mm  <b>Células conidiógenas del micelio aéreo</b>: normalmente monofiálides  <b>Microconidios</b>: ausentes  <b>Macroconidios</b>: en micelio aéreo, principalmente 0-1 septos, fuertemente curvados, a menudo puntiagudos en ambos extremos  <b>Clamidosporas</b>: escasas, solitarias o en cadenas cortas, lisas</p>
<i>F. incarnatum</i>	<p><b>Colonias</b>: de naranja pálido a salmón  <b>Tasa de crecimiento</b>: mayor de 30 mm  <b>Células conidiógenas del micelio aéreo</b>: mono-, pero también polifiálides  <b>Microconidios</b>: 0 septos escasos, normalmente 3-5 septos, fusiformes a falciforme, solitarios o en parejas en el <i>locus</i> conidiogénico  <b>Macroconidios</b>: raros en esporodoquios  <b>Clamidosporas</b>: escasas, solitarias o en cadenas, lisas</p>
<i>F. napiforme</i>	<p><b>Colonias</b>: color blanquecino con pigmentos púrpuras  <b>Tasa de crecimiento</b>: mayor de 30 mm  <b>Células conidiógenas del micelio aéreo</b>: monofiálides  <b>Microconidios</b>: abundantes, 0-1 septos, usualmente obovoides, conidios piriformes o napiformes también presentes, en cabezas mucosas o cadenas cortas  <b>Macroconidios</b>: usualmente en esporodoquios, principalmente 5 septos, de falciformes a rectos  <b>Clamidosporas</b>: escasas, usualmente en cadenas o grupos, marrón claro, lisas</p>
<i>F. nygamai</i>	<p><b>Colonias</b>: de blanco a violeta con el tiempo  <b>Tasa de crecimiento</b>: mayor de 30 mm  <b>Células conidiógenas del micelio aéreo</b>: mono- y polifiálides  <b>Microconidios</b>: abundantes, usualmente 0 septos, ovales, en cabezas mucosas o cadenas cortas  <b>Macroconidios</b>: sólo en esporodoquios, 3-5 septos, rectos a ligeramente curvados  <b>Clamidosporas</b>: abundantes, solitarias, en cadenas o grupos, subhialinas, lisas o rugosas</p>
<i>F. proliferatum</i>	<p><b>Colonias</b>: de blanco a violeta con el tiempo  <b>Tasa de crecimiento</b>: mayor de 30 mm  <b>Células conidiógenas del micelio aéreo</b>: mono- y polifiálides  <b>Microconidios</b>: abundantes, usualmente 0 septos, claviformes (algunos conidios piriformes presentes en cultivos viejos), en cadenas largas  <b>Macroconidios</b>: sólo en esporodoquios, 3-5 septos, rectos a ligeramente curvados  <b>Clamidosporas</b>: ausentes</p>
<i>F. sacchari</i>	<p><b>Colonias</b>: de blanco a violeta con el tiempo  <b>Tasa de crecimiento</b>: mayor de 30 mm  <b>Células conidiógenas del micelio aéreo</b>: mono- y polifiálides  <b>Microconidios</b>: abundantes, usualmente 0-2 septos, ovales y estrechos, en cabezas mucosas, solitarios o en parejas en el <i>locus</i> conidiogénico  <b>Macroconidios</b>: producidos raramente, sólo en esporodoquios, 3-4 septos, falciformes  <b>Clamidosporas</b>: ausentes</p>

\*En medio PDA a 25°C tras 4 días de incubación.

Resultados

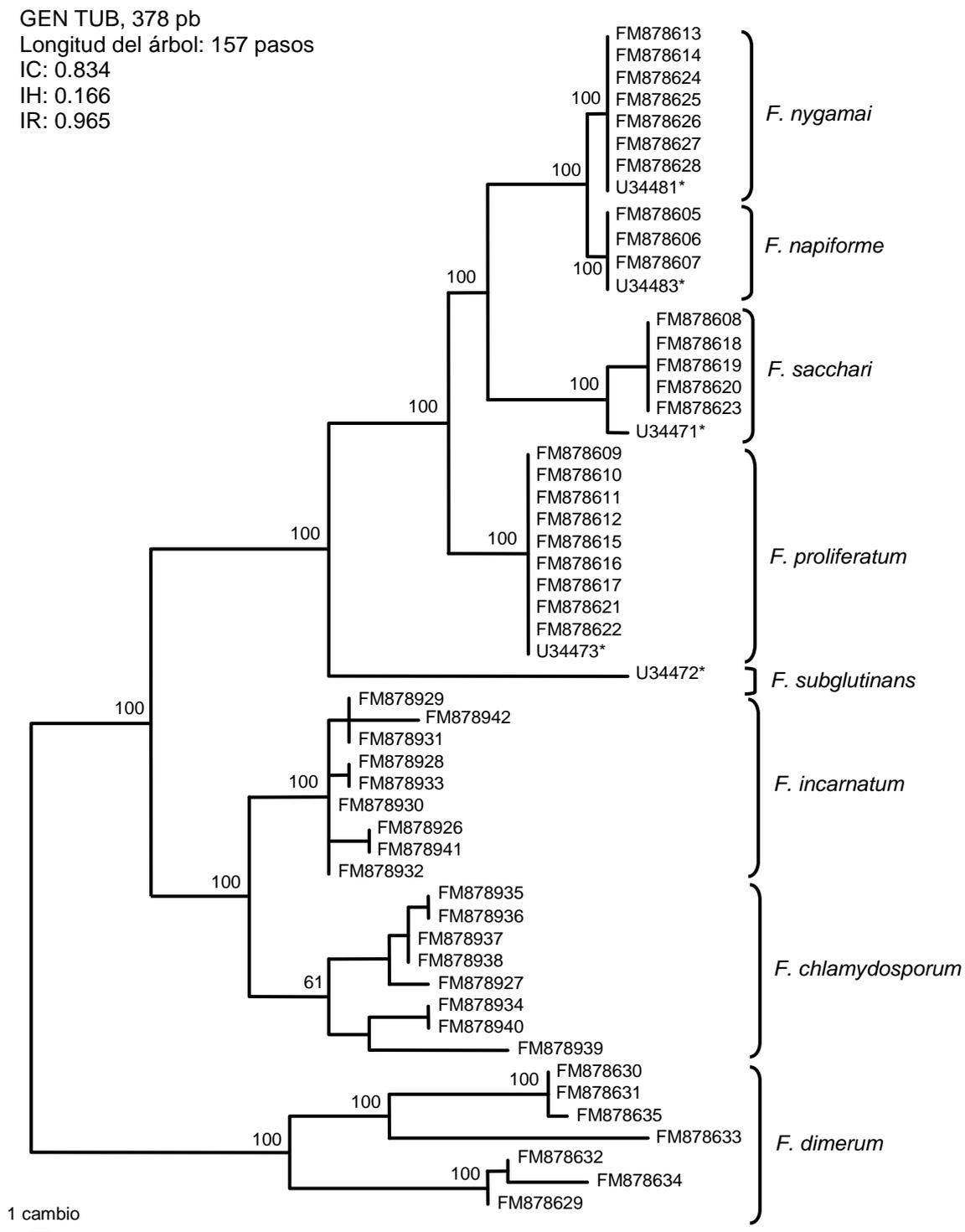


FIG. 1. Uno de los 225 árboles de máxima parsimonia obtenidos a partir de las secuencias del gen  $\beta$ -tubulina. Se indican los valores de *bootstrap* en los nodos. IC, índice de consistencia; IH, índice de homoplasia; IR, índice de retención. Los asteriscos indican las secuencias obtenidas a partir de la base de datos *GenBank*.

pasos de longitud (Fig. 1). Se obtuvieron tres grupos mayoritarios, cada uno de los cuales presentaba un 100% de soporte de *bootstrap*. El primero de ellos comprendía cinco subgrupos diferentes, que correspondían a cinco especies diferentes. Los dos primeros subgrupos incluían los aislados de *F. nygamai* (n=7) y *F. napiforme* (n=3), mientras que el subgrupo formado por los aislados de *F. sacchari* (n=5) era más distante filogenéticamente; el cuarto subgrupo incluía todos los aislados de *F. proliferatum* (n=9), y el más alejado únicamente incluía la secuencia de referencia de *F. subglutinans*. Las cuatro especies presentaban una baja variabilidad intraespecífica, con un único haplotipo en cada caso, excepto para *F. sacchari*, que mostraba dos haplotipos. El segundo grupo principal incluía a los aislados de *F. incarnatum* (n=9) y de *F. chlamydosporum* (n=8) formando dos subgrupos genéticamente diferenciados, los cuales presentaban una mayor variabilidad genética, con 6 y 5 haplotipos diferentes, respectivamente. El tercer grupo principal incluía los aislados identificados morfológicamente como *F. dimerum*, que resultó ser la especie más heterogénea y distante genéticamente, incluyendo tres pequeños subgrupos y 6 haplotipos diferentes.

### Estudio de sensibilidad antifúngica

Los resultados obtenidos para la sensibilidad antifúngica se muestran en la Tabla 3. La terbinafina fue el antifúngico más activo mostrando una media geométrica total (MG) de las CMI de 0.60 mg/L frente a todas las especies estudiadas excepto frente a *F. incarnatum*, la cual presentaba un valor de MG CMI de 10.08 mg/L. AMB fue el segundo fármaco más activo con un valor de MG CMI de 1.94 mg/L. Para esta droga, *F. proliferatum* (MG CMI de 3.70 mg/L), *F. nygamai* (MG CMI de 3.28 mg/L) y *F. napiforme* (MG CMI of 3.18 mg/L) fueron más resistentes que otras especies, mientras

## Resultados

que *F. incarnatum* mostró el valor más bajo para la MG CMI (0.93 mg/L). Aunque el voriconazol mostró baja actividad frente a todos los aislados (MG CMI 4.24 mg/L), fue el tercer antifúngico testado más activo. PSC mostró resultados variables, con valores elevados de CMI en general, pero mostrando cierta actividad para la mayoría de aislados de *F. chlamydosporum*, *F. incarnatum* y *F. sacchari*. El resto de azoles ensayados (RVC, ABC, ITC y KTC) mostraron valores elevados de CMIs para todos los aislados, mientras que FLC, 5-FC y MFG no fueron activos para ninguno de ellos (datos no mostrados).

TABLA 3. Actividades de diferentes antifúngicos frente a aislados de siete especies de *Fusarium* de interés clínico.

Especie (nº aislados)	CMI (mg/L)	ABC	AMB	ITC	KTC	PSC	RVC	TBF	VRC
<i>F. chlamydosporum</i> (8)	Rango MG <sup>a</sup>	4-32 11.31	1-4 1.54	32 32	4-32 8.72	0.5-32 2.38	1-16 7.34	0.125-1 0.27	1-4 2.83
<i>F. dimerum</i> (7)	Rango MG	4-16 8.83	1-2 1.64	32 32	1-32 3.62	32 32	4-16 8.83	0.125-2 0.91	2-8 4
<i>F. incarnatum</i> (9)	Rango MG	8-32 16	0.5-2 0.93	32 32	2-4 2.72	1-32 2.94	8-16 9.33	0.5-32 10.08	2-4 3.70
<i>F. napiforme</i> (3)	Rango MG	4 4	2-4 3.18	32 32	8 8	32 32	2-4 3.18	0.06-0.25 0.12	1-2 1.59
<i>F. nygamai</i> (7)	Rango MG	8-16 9.75	2-8 3.28	32 32	16-32 21.53	32 32	4-16 8.83	0.125-2 0.34	4-8 6.56
<i>F. proliferatum</i> (9)	Rango MG	8-16 10.08	2-8 3.70	32 32	8-32 21.77	32 32	8-32 20.16	0.125-1 0.29	8-16 9.33
<i>F. sacchari</i> (5)	Rango MG	4-8 6.06	1-2 1.52	32 32	2-32 18.38	2 2	4-8 5.28	0.125-0.25 0.14	2-4 3.03
<b>Total (48)</b>	Rango MG	4-32 9.79	0.5-8 1.94	32 32	1-32 8.98	0.5-32 9.94	1-32 8.98	0.06-32 0.60	1-16 4.24

<sup>a</sup> MG, media geométrica; ABC, albaconazol; AMB, anfotericina B; ITC, itraconazol; KTC, ketoconazol; PSC, posaconazol; RVC, ravuconazol; TBF, terbinafina; VRC, voriconazol.

## Discusión

En general, se obtuvo un alto grado de correlación entre la identificación morfológica y molecular de los aislados clínicos recibidos para su identificación. La

única especie que resultó difícil de identificar a nivel morfológico fue *F. sacchari*, debido a su similitud morfológica con *F. subglutinans* (10, 23). De hecho, Nelson y colaboradores (26) consideraron a ambas especies como sinónimas. *F. sacchari*, *F. subglutinans* y otras especies relacionadas constituyen un grupo de especies similares morfológicamente que pueden ser diferenciadas sólo mediante el uso de pruebas de cruzamientos o marcadores moleculares (23). Aunque algunas infecciones en humanos han sido atribuidas a *F. subglutinans* (10, 23), su identificación en estos casos es cuestionable. Ninguno de los aislados clínicos en este estudio fue identificado molecularmente como *F. subglutinans* (Fig. 1). Nuestro estudio pone de manifiesto que *F. chlamyosporum* y, especialmente, *F. dimerum* pueden representar un complejo de especies, tal y como sucede con otras especies de *Fusarium* más comunes como *F. solani*, *F. oxysporum* y *F. verticillioides* (3, 4, 30, 34, 35). Sería interesante realizar más estudios sobre la filogenia de estas dos especies, las cuales han sido asociadas a infecciones severas en varias ocasiones (10, 23).

TBF mostró buena actividad frente a todas las especies testadas, excepto *F. incarnatum*. Estos resultados concuerdan con estudios previos donde la TBF mostró considerable actividad *in vitro* frente el género *Fusarium* (20) y frente a otras dos especies de interés clínico como *F. verticillioides* y *F. thapsinum* (4). Aunque no hay experiencia del uso de este antifúngico en clínica frente a las diferentes especies estudiadas, se ha utilizado con buen resultado en dos casos de onicomicosis debidos a *F. oxysporum* (12). Además, las onicomicosis en uñas del pie producidas por especies de *Fusarium* pueden responder a dicho fármaco, según Gupta y colaboradores (16). Recientemente, se ha publicado un caso de tratamiento eficaz en una infección cutánea diseminada producida por *F. proliferatum* utilizando AMB

liposomal combinada con TBF (27). Esta combinación fue también efectiva en el tratamiento de una infección diseminada por *F. oxysporum* (40).

AMB y VRC, el segundo y tercer antifúngicos más efectivos, respectivamente, constituyen la terapia recomendada para el tratamiento de la fusariosis (9). De hecho, el tratamiento con AMB ha mostrado buenos resultados en diferentes casos clínicos de infección sistémica por *F. chlamydosporum* (21), *F. sacchari* (15), *F. nygamai* (22), *F. dimerum*, en este caso se utilizó la formulación lipídica (24), y *F. proliferatum*, utilizando una combinación combinada de AMB y rifampina (5). En general, el éxito terapéutico estuvo relacionado con una recuperación del nivel de neutrófilos en sangre. A pesar de estos buenos resultados, hay otros casos donde el tratamiento con AMB no funcionó. *F. napiforme* mostró resistencia a este fármaco en el único caso publicado de infección diseminada causada por esta especie (25), así como también en infecciones causadas por *F. proliferatum* (42) y *F. dimerum* (2). En cuanto al VRC, algunos casos han demostrado la eficacia de este antifúngico en el tratamiento eficaz de fusariosis diseminada (36), pero las especies involucradas en estas infecciones no fueron identificadas a nivel de especie. Recientemente, un paciente que había sufrido un trasplante de médula ósea y que presentaba una infección diseminada por *F. dimerum* (6) fue tratado con éxito utilizando este antifúngico.

A pesar de los elevados valores de CMI mostrados por el PSC, se han dado casos de éxito clínico. En el año 2004 se publicó un caso de recuperación clínica tras el tratamiento con PSC en un paciente que había recibido un trasplante de pulmón y que presentaba neumonía producida por *F. proliferatum* (19). Más recientemente, el PSC mostró buena actividad en el tratamiento de una fusariosis diseminada causada por *F. solani* (17). FLC, 5-FC y MFG no mostraron actividad frente a ninguno de los

aislados, lo cual concuerda con los resultados proporcionados por otros autores (4, 13, 38).

En conclusión, en este estudio hemos demostrado que la mayoría de las especies de *Fusarium* de interés clínico pueden ser identificadas a través de un detallado examen morfológico. Este hecho puede ser de gran utilidad para aquellos laboratorios que no tienen posibilidades de realizar una identificación mediante técnicas moleculares. Aún así, hay especies difíciles de diferenciar por sus características morfológicas, tales como *F. sacchari* y *F. thapsinum* (4), y en estos casos la identificación molecular resulta necesaria.

Este es el primer estudio *in vitro* que incluye numerosos aislados de especies clínicas poco comunes del género y demuestra la buena actividad *in vitro* de la TBF frente a todas ellas, excepto *F. incarnatum*. Sin embargo, será necesario realizar estudios *in vivo* para determinar la potencial utilidad clínica de la TBF frente a las diferentes especies ensayadas.

#### **Agradecimientos:**

Los autores agradecen a K. O'Donnell (*National Center for Agricultural Utilization Research*, Peoria, EE.UU.), a los directores del *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (Utrecht, Holanda) y a A. Stchigel (Universitat Rovira i Virgili, Reus, España) por suministrar algunas de los aislados utilizados en este estudio. Asimismo agradecen a Núria Pilas, Catalina Núñez y Eduardo Álvarez sus contribuciones a este trabajo. El presente estudio ha sido respaldado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (España), con las becas CGL 2005-07394/BOS y CGL 2007-65669/BOS.

### Bibliografía:

1. **Alastruey-Izquierdo, A., M. Cuenca-Estrella, A. Monzón, E. Mellado y J. L. Rodríguez-Tudela.** 2008. Antifungal susceptibility profile of clinical *Fusarium* spp. isolates identified by molecular methods. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**:805-809.
2. **Austen, B., H. McCarthy, B. Wilkins, A. Smith y A. Duncombe.** 2001. Fatal disseminated *Fusarium* infection in acute lymphoblastic leukaemia in complete remission. *J Clin. Pathol.* **54**:488-490.
3. **Azor, M., J. Gené, J. Cano y J. Guarro.** 2007. Universal *in vitro* antifungal resistance of genetic clades of the *Fusarium solani* species complex. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:1500-1503.
4. **Azor, M., J. Gené, J. Cano, D. A. Sutton, A. W. Fothergill, M. G. Rinaldi y J. Guarro.** 2008. *In vitro* antifungal susceptibility and molecular characterization of clinical isolates of *Fusarium verticillioides* (*F. moniliforme*) and *Fusarium thapsinum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**: 2228-2231.
5. **Barrios, N. J., D. V. Kirkpatrick, A. Murciano, K. Stine, R. B. Van Dyke y J. R. Humbert.** 1990. Successful treatment of disseminated *Fusarium* infection in an immunocompromised child. *Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **12**:319-24.
6. **Bigley, V. H., R. F. Duarte, R. D. Gosling, C. C. Kibbler, S. Seaton y M. Potter.** 2004. *Fusarium dimerum* infection in a stem cell transplant recipient treated successfully with voriconazole. *Bone Marrow Transplant.* **34**:815-817.
7. **CLSI.** 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard-Second edition. CLSI document M38-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

8. **Cruse, M., R. Telerant, T. Gallagher, T. Lee y J. W. Taylor.** 2002. Cryptic species in *Stachybotrys chartarum*. *Mycologia* **94**:814-822.
9. **Dignani, M. C. y E. J. Anaissie.** 2004. Human fusariosis. *Clin. Microbiol. Infect.* **1**:67-75.
10. **de Hoog, G. S., J. Guarro, J. Gené y M. J. Figueras.** 2000. Atlas of clinical fungi. 2<sup>nd</sup>. ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands, University Rovira i Virgili, Reus, Spain.
11. **Gilgado, F., J. Cano, J. Gené y J. Guarro.** 2005. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. *J. Clin. Microbiol.* **43**:4930-4942.
12. **Gianni, C., Cerri A. y Crosti C.** 1997. Unusual clinical features of fingernail infection by *Fusarium oxysporum*. *Mycoses* **40**:455-459.
13. **Groll, A. H., T. Stergiopoulou, E. Roilides y T. J. Walsh.** 2005. Micafungin: pharmacology, experimental therapeutics and clinical applications. *Exp. Opin. Investig. Drugs.* **14**:489-509.
14. **Guarro, J. y J. Gené.** 1995. *Opportunistic fusarial infections in humans.* *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **14**:741-754.
15. **Guarro, J., M. Nucci, T. Akiti, J. Gené, M. D. Barreiro y R. T. Gonçalves.** 2000. Fungemia due to *Fusarium sacchari* in an immunosuppressed patient. *J. Clin. Microbiol.* **38**:419-421.
16. **Gupta, A. K., T. Gregurek-Novak , N. Konnikov, C. W. Lynde, S. Hofstader y R. C. Summerbell.** 2001. Itraconazole and terbinafine treatment of some nondermatophyte molds causing onychomycosis of the toes and a review of the literature. *J. Cutan. Med. Surg.* **5**:206-210.

17. Gupta, S., N. G. Almyroudis, M. Battiwalla, B. J. Bambach, P. L. McCarthy, A. D. Proefrock, D. Ball, P. Paplham, A. Varma, J. Kwon-Chung y B. H. Segal. 2007. Successful treatment of disseminated fusariosis with posaconazole during neutropenia and subsequent allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl. Infect. Dis.* **9**:156-60.
18. Helm, T. N., D. L. Longworth, G. S. Hall, B. J. Bolwell, B. Fernandez y K. J. Tomecki. 1990. Case report and review of resolved fusariosis. *J. Am. Acad. Dermatol.* **23**:393-398.
19. Herbrecht, R., R. Kessler, C. Kravanja, M. H. Meyer, J. Waller y V. Letscher-Bru. 2004. Successful treatment of *Fusarium proliferatum* pneumonia with posaconazole in a lung transplant recipient. *J. Heart Lung Transplant.* **23**:1451-1454.
20. Jessup, C. J., N. S. Ryder y M. A. Ghannoum. 2000. An evaluation of the *in vitro* activity of terbinafine. *Med. Mycol.* **38**:155-159.
21. Kiehn, T. E., P. E. Nelson, E. M. Bernard, F. F. Edwards, B. Koziner y D. Armstrong. 1985. Catheter-associated fungemia caused by *Fusarium chlamydosporum* in a patient with lymphocytic lymphoma. *J. Clin. Microbiol.* **21**:501-504.
22. Krulder, J. W., R. W. Brimicombe, P. W. Wijermans y W. Gams. 1996. Systemic *Fusarium nygamai* infection in a patient with lymphoblastic non-Hodgkin's lymphoma. *Mycoses* **39**:121-123.
23. Leslie, J. F. y B. A. Summerell. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Ed. Blackwell Publishing, Iowa, USA.
24. Letscher-Bru, V., F. Campos, J. Waller, R. Randriamahazaka, E. Candolfi y R.

- Herbrecht.** 2002. Successful outcome of treatment of a disseminated infection due to *Fusarium dimerum* in a leukemia patient. *J. Clin. Microbiol.* **40**:1100-1102.
- 25. Melcher, G. P., D. A. McGough, A. W. Fothergill, C. Norris y G. Rinaldi.** 1993. Disseminated hyalohyphomycosis caused by a novel human pathogen, *Fusarium napiforme*. *J. Clin. Microbiol.* **31**:1461-1467.
- 26. Nelson, P.E., T.A. Toussoun y W.F.O. Marasas.** 1983. *Fusarium* species: An illustrated manual for identification Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania.
- 27. Neuburger, S., G. Massenkeil, M. Seibold, C. Lutz, I. Tamm, P. le Coutre, B. Graf, B. Doerken y R. Arnold.** 2008. Successful salvage treatment of disseminated cutaneous fusariosis with liposomal amphotericin B and terbinafine after allogeneic stem cell transplantation. *Transpl. Infect. Dis.* **10**:290-293.
- 28. Nirenberg, H. I. y K. O'Donnell.** 1998. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* **90**: 434-458.
- 29. Nucci, M. y E. Anaissie.** 2007. *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**:695-704.
- 30. O'Donnell, K.** 2000. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. *Mycologia* **92**: 919-938.
- 31. O'Donnell, K. y E. Cigelnik.** 1997. Two divergent intragenomic rADN ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Mol. Phylogenet. Evol.* **7**:103-116.
- 32. O'Donnell, K., E. Cigelnik y H. I. Nirenberg.** 1998. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* **90**:465-493.

33. O'Donnell, K., H. I. Nirenberg, A. Takayuki y E. Cigelnik. 2000. A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience* **41**: 61-78.
34. O'Donnell, K., D. A. Sutton, M. G. Rinaldi, K. C. Magnon, P. A. Cox, S. G. Revankar, S. Sanche, D. M. Geiser, J. H. Juba, J. H. van Burik, A. Padhye, E. J. Anaissie, A. Francesconi, T. J. Walsh y J. S. Robinson. 2004. Genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium oxysporum* complex inferred from multilocus DNA sequence data and amplified fragment length polymorphism analyses: evidence for the recent dispersion of a geographically widespread clonal lineage and nosocomial origin. *J. Clin. Microbiol.* **42**:5109-5120.
35. O'Donnell, K., B. A. J. Sarver, M. Brandt, D. C. Chang, J. Noble-Wang, B. J. Park, D. A. Sutton, L. Benjamin, M. Lindsley, A. Padhye, D. M. Geiser y T. J. Ward. 2007. Phylogenetic diversity and microsphere array-based genotyping of human pathogenic fusaria, including isolates from the multistate contact lens-associated U.S. keratitis outbreaks of 2005 and 2006. *J. Clin. Microbiol.* **45**:2235-2248.
36. Pastor, F.J. y J. Guarro. 2007. El papel del voriconazol en el tratamiento de las micosis emergentes. *Rev. Iberoam. Micol.* **24**:228-232.
37. Poirot, J. L., J. P. Laporte, E. Gueho, A. Verny, N. C. Gorin, A. Najman, M. Marteau y P. Roux. 1985. Deep mycosis caused by *Fusarium*. *Presse Med.* **14**:2300-2301.
38. Pujol, I., J. Guarro, J. Gené y J. Sala. 1997. In-vitro antifungal susceptibility of clinical and environmental *Fusarium* spp. strains. *J. Antimicrob. Chemother.* **39**:163-167.

39. Richardson, S. E., R. M. Bannatyne, R. C. Summerbell, J. Milliken, R. Gold y S. S. Weitzman. 1988. Disseminated fusarial infection in the immunocompromised host. *Rev. Infect. Dis.* **10**:1171-1181.
40. Rothe, A., M. Seibold, T. Hoppe, H. Seifert, A. Engert, C. Caspar, M. Karthaus, G. Fätkenheuer, U. Bethe, K. Tintelnot y O. A. Cornely. 2004. Combination therapy of disseminated *Fusarium oxysporum* infection with terbinafine and amphotericin B. *Ann. Hematol.* **83**:394-397.
41. Segal, B. H., T. J. Walsh, J. M. Liu, J. D. Wilson y K. J. Kwon-Chung. 1998. Invasive infection with *Fusarium chlamydosporum* in a patient with aplastic anemia. *J. Clin. Microbiol.* **36**:1772-1776.
42. Summerbell, R. C., Richardson S. E. y J. Kane. 1988. *Fusarium proliferatum* as an agent of disseminated infection in an immunosuppressed patient. *J. Clin. Microbiol.* **26**:82-87.
43. Swofford, D. L. 2001. *PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and other methods) (version 4.0)*. Sinauer Associates, Sunderland, Mass., USA.
44. Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin y D. G. Higgins. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **24**:4876-4882.
45. Tortorano, A. M., A. Prigitano, G. Dho, M. C. Esposito, C. Gianni, A. Grancini, C. Ossi y M. A. Viviani. 2008. Species distribution and *in vitro* antifungal susceptibility patterns of 75 clinical isolates of *Fusarium* spp. from Northern Italy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:2683-2685.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y FILOGENIA MOLECULAR DE ESPECIES DEL GÉNERO FUSARIUM DE INTERÉS CLÍNICO

Mónica Azor Heras

DL: T.1368-2011

## **DISCUSIÓN**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y FILOGENIA MOLECULAR DE ESPECIES DEL GÉNERO FUSARIUM DE INTERÉS CLÍNICO

Mónica Azor Heras

DL: T.1368-2011

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. TAXONOMÍA Y FILOGENIA MOLECULAR

La taxonomía del género *Fusarium* siempre ha sido controvertida y sus especies difíciles de diferenciar a partir de criterios morfológicos debido a que presentan una gran variedad en cuanto a sus características morfológicas, culturales y fisiológicas. En los últimos años, las nuevas técnicas de biología molecular han permitido establecer criterios más adecuados y objetivos para delimitar las diferentes especies del género. Dos de las especies estudiadas dentro del género han sido *F. solani* (O'Donnell, 2000; Aoki *et al.*, 2003) y *F. oxysporum* (O'Donnell *et al.*, 1998) debido a su importancia como agentes fitopatógenos. En los estudios citados, basados en la secuenciación de ADN, y que incluían aislados obtenidos a partir de plantas, se demostró una gran variabilidad genética dentro de las especies morfológicas tradicionalmente consideradas, siendo definidas como complejos de especies (O'Donnell *et al.*, 1998; O'Donnell, 2000). Sin embargo, estos estudios no incluían aislados de origen clínico, a pesar de la gran importancia que presentan ambas especies como agentes causantes de infección en humanos. Este hecho nos llevó a plantear, como uno de los principales objetivos de la presente tesis, la realización de un amplio estudio molecular y morfológico que incluyese aislados de diferentes especies del género *Fusarium* de importancia clínica, principalmente de origen clínico y de zonas geográficas diversas.

El primer estudio se realizó con aislados morfológicamente identificados como *F. solani*, por dos motivos principales: en primer lugar, debido a que es la especie de *Fusarium* de mayor incidencia clínica y, en segundo, porque disponíamos de un gran número de aislados, principalmente de origen clínico. El objetivo del estudio fue determinar la variabilidad genética de dichos aislados. Nuestro trabajo corroboró la existencia de una amplia variabilidad intraespecífica, tal y como ya había descrito O'Donnell (2000) con aislados fitopatógenos. Dicho autor estableció que, dentro de la especie morfológica *F. solani*, se podían diferenciar al menos 26 especies filogenéticas, por lo que pasó a hablarse del complejo de especies de *F. solani*. Además, dichas especies filogenéticas se agrupaban en tres clados diferentes según su origen geográfico. Paralelamente a nuestro trabajo, Zhang y colaboradores (2006) publicaron un estudio molecular en el que incluyeron numerosos aislados clínicos y ambientales de esta misma especie. Según estos autores, el complejo *F. solani* estaría formado por, al menos, 45 especies filogenéticas, distribuidas en los tres clados descritos previamente por O'Donnell (2000). Sin embargo, la aportación más interesante del estudio fue constatar que los aislados clínicos estaban incluidos exclusivamente en el clado 3 (Zhang *et al.*, 2006). En nuestro estudio obtuvimos el mismo resultados, ya que todos nuestros aislados de origen clínico se ubicaron en el clado 3 del complejo. A diferencia del trabajo de O'Donnell (2000), tanto en el estudio de Zhang y colaboradores (2006) como en el nuestro, no se observó relación entre los grupos moleculares y el origen geográfico de los aislados. Asimismo, diferenciamos 28 haplotipos y, al menos, cuatro especies filogenéticas, correspondientes a los cuatro grupos moleculares que se observan en el árbol filogenético obtenido (Fig. 1, pág. 114). Es de destacar que 26 de los aislados de *F. solani* incluidos en nuestro estudio,

representativos de los diferentes haplotipos, fueron incorporados en un macroestudio del complejo realizado recientemente por O'Donnell y colaboradores (2008), corroborando nuestros resultados.

Con el objeto de describir formalmente dichas especies filogenéticas y facilitar, principalmente a los laboratorios clínicos, la detección de las mismas, se realizó un exhaustivo estudio fenotípico para determinar si existían características morfológicas y/o fisiológicas que nos permitieran diferenciarlas. El estudio fisiológico incluyó numerosas pruebas bioquímicas, la mayoría de las cuales no se habían utilizado en los anteriores estudios de este tipo para el género. Además, se puso a punto el método de microdilución, una técnica más fácil, rápida y simple que las descritas anteriormente (Thrane, 1986; Wasfy *et al.*, 1987). A pesar de ello, no se detectó ningún patrón bioquímico característico. El estudio morfológico realizado tampoco permitió encontrar ningún carácter morfológico concluyente, por lo que, en conjunto, no obtuvimos características diferenciadoras que permitieran describir a dichos grupos filogenéticos como nuevas especies.

En el caso de *F. oxysporum*, O'Donnell y colaboradores (1998b) ya habían puesto de manifiesto la variabilidad intraespecífica de la especie, considerando a *F. oxysporum* como un complejo de especies, aunque también se habían estudiado únicamente aislados fitopatógenos. De hecho, en base a un estudio *multilocus* basado en la secuenciación de los genes EF-1 $\alpha$  y mtSSU, que demostraron ser altamente informativos a nivel intraespecífico, llegaron a identificar 3 clados diferentes. Más tarde, O'Donnell y colaboradores (2004) ampliaron el estudio incluyendo muchos más aislados, de origen clínico y de diferentes procedencias geográficas, además de

secuenciar una nueva región (la región espaciadora intergénica, IGS), y de utilizar la técnica AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*). En dicho estudio, se obtuvieron 4 clados diferentes, 3 de los cuales coincidían con los previamente establecidos (O'Donnell *et al.*, 1998b). En nuestro trabajo incluimos un total de 28 aislados, principalmente clínicos e identificados morfológicamente como *F. oxysporum* (de Hoog *et al.*, 2000). Se pretendía determinar la correlación con los grupos moleculares previamente descritos por O'Donnell y colaboradores (1998b) y si existían grupos diferentes a los ya establecidos. La secuenciación de un fragmento del gen EF-1 $\alpha$ , que se escogió como gen marcador debido a su elevada variabilidad, y la comparación con secuencias de referencia obtenidas a partir del *GenBank*, nos permitió comprobar que nuestros aislados se distribuían entre los cuatro grupos moleculares ya descritos por el equipo de O'Donnell (O'Donnell *et al.*, 1998b y 2004). A pesar de incluir aislados de diferentes procedencias geográficas, de origen tanto clínico como ambiental, no se obtuvieron nuevos grupos moleculares diferentes a los previamente establecidos. A nivel morfológico no se observaron diferencias remarcables entre los aislados de los diferentes grupos obtenidos, por lo que no se realizó un estudio fenotípico más exhaustivo.

*F. verticillioides* (*F. moniliforme*) es una de las especies que, junto a otras, constituye el denominado complejo de especies *Gibberella fujikuroi* (O'Donnell y Cigelnik, 1997; O'Donnell *et al.*, 1998a; O'Donnell *et al.*, 2000). En los últimos años, está cobrando importancia como agente causal de infecciones en el hombre, de hecho ha pasado a ser la tercera especie en orden de importancia dentro del género, tras *F. solani* y *F. oxysporum* (Guarro y Gené, 1995). Sin embargo, la información acerca de

esta especie puede ser confusa debido a que puede ser confundida con especies morfológicamente similares como *F. fujikuroi*, *F. nygamai*, *F. proliferatum* o *F. thapsinum* entre otras, todas ellas también pertenecientes al complejo de especies de *G. fujikuroi* (O'Donnell *et al.*, 1998a; O'Donnell *et al.*, 2000). Debido a esto los objetivos planteados con respecto a los aislados clínicos de *F. verticillioides* fueron: verificar molecularmente la identificación morfológica de dichos aislados y determinar la posible existencia de variabilidad genética en los mismos, tal y como ya había sido establecido para *F. solani* y *F. oxysporum*. En nuestro estudio molecular se utilizó la región TUB del gen de la  $\beta$ -tubulina puesto que había sido descrita como una región de gran utilidad para diferenciar especies del complejo *G. fujikuroi* (O'Donnell *et al.*, 1998a; O'Donnell *et al.*, 2000). Una de las aportaciones de este trabajo fue el hecho de comprobar que nuestra región amplificada, un fragmento de 433 pb de dicho gen, permitía diferenciar las especies del complejo al igual que el gen total (1283 pb aprox.) secuenciado en trabajos anteriores (O'Donnell y Cigelnik, 1997; O'Donnell *et al.*, 1998a). Para comprobar que nuestro fragmento aportaba la misma información, introdujimos varias secuencias obtenidas a partir del *GenBank*, que correspondían a diferentes especies del complejo y que habían sido depositadas por estos autores (O'Donnell *et al.*, 1998a; O'Donnell *et al.*, 2000). Por lo que pudimos comprobar, la secuenciación de este fragmento permite diferenciar las especies del complejo *G. fujikuroi* de forma adecuada, y de una manera más económica y sencilla, ya que sólo se requiere un único par de cebadores frente a los nueve utilizados en los trabajos anteriores (O'Donnell y Cigelnik, 1997; O'Donnell *et al.*, 1998a; O'Donnell *et al.*, 2000). Asimismo, la región secuenciada permitió comprobar la existencia de variabilidad intraespecífica en los aislados de la especie *F. verticillioides* estudiados. Este hecho

había sido demostrado previamente por otros autores (Mitter *et al.*, 2001; Kini *et al.*, 2002), aunque sólo para aislados de origen ambiental. Mitter y colaboradores (2001) demostraron, utilizando la técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*), que la proximidad genética entre los aislados se relacionaba con una producción similar de giberelina. Kini y colaboradores (2002), utilizando también la técnica RAPD, hallaron considerable variación genética entre los 28 aislados de *F. verticillioides* que estudiaron. Dicho estudio mostró la existencia de 6 grupos moleculares, cada uno de ellos formado por aislados obtenidos a partir de una misma especie de planta. En nuestro trabajo, no se encontró ninguna relación entre el origen de las muestras y los grupos moleculares obtenidos, ya que se han agrupado aislados de diferentes orígenes, clínico y ambiental, así como de diferentes procedencias geográficas. En futuros estudios, sería interesante comprobar si los tres grupos moleculares que hemos obtenido entre los aislados de la especie *F. verticillioides* presentan diferencias en cuanto a la producción de giberelina, tal y como indicaba el estudio de Mitter *et al.* (2001), así como otras características fenotípicas diferenciadoras. También cabe destacar el hecho de que el estudio molecular realizado permitió identificar a cuatro de los aislados, inicialmente identificados como *F. verticillioides*, como *F. thapsinum*, poniendo de manifiesto la dificultad para discriminar ambas especies únicamente mediante criterios morfológicos. *F. thapsinum* ha sido recientemente descrita como agente responsable de un caso de fungemia (Yücesoy *et al.*, 2004). Según Klittich y colaboradores (1997) dicha especie se distingue de *F. verticillioides* por la producción de un pigmento difusible de color amarillento y un menor crecimiento en medio PDA, así como la presencia de cadenas de microconidios más cortas. Sin embargo, en nuestras cepas sólo se observó la producción de pigmentos, y no en todas ellas. Por lo

tanto, debido a la inestabilidad de los caracteres fenotípicos sería recomendable la utilización de técnicas moleculares para distinguir ambas especies. En concreto, la secuenciación de la región TUB ha demostrado ser un buen marcador para la identificación de estas y otras especies del complejo *G. fujikuroi*.

Además de las especies mencionadas hasta el momento, en clínica se han descrito otras especies de *Fusarium* como agentes responsables de infecciones en el hombre. Estas especies son *F. chlamydosporum*, *F. dimerum*, *F. incarnatum*, *F. napiforme*, *F. nygamai*, *F. proliferatum* y *F. sacchari* (de Hoog *et al.*, 2000; Nucci y Anaissie, 2007) y han sido asociadas a diferentes tipos de infección, en particular queratomycosis y otras infecciones oculares (de Hoog *et al.*, 2000), así como infecciones diseminadas en pacientes inmunocomprometidos (Kiehn *et al.*, 1985; Poirot *et al.*, 1985; Richardson *et al.*, 1988; Summerbell *et al.*, 1988; Barrios *et al.*, 1990; Helm *et al.*, 1990; Segal *et al.*, 1998; Austen *et al.*, 2001; Letscher-Bru *et al.*, 2002). Su incidencia real en clínica es difícil de determinar, ya que son especies poco conocidas y difíciles de diagnosticar. Debido a esto, el objetivo principal de este estudio fue facilitar algunos caracteres fenotípicos, en los casos en que fuera factible, que permitieran el reconocimiento de estas especies en el laboratorio clínico, así como evaluar la correlación entre la identificación morfológica y molecular. De hecho, el estudio morfológico realizado para los aislados de las diferentes especies nos permitió establecer una tabla con las principales características morfológicas diferenciadoras (Tabla 2, pág. 153). Para el estudio molecular se secuenció la región TUB del gen de la  $\beta$ -tubulina que, como ya se indicó anteriormente, es una región muy informativa para distinguir especies de *Fusarium* y se incluyeron secuencias de referencia de esta

región, obtenidas a partir del *GenBank*. La comparación con estas secuencias de referencia permitió confirmar la identificación morfológica de la mayoría de las especies, a excepción de *F. sacchari*, morfológicamente muy similar a *F. subglutinans*, por lo que se recomienda el uso de la secuenciación para su correcta identificación. Además, a pesar de que el número de aislados para cada una de las especies no era elevado, el estudio molecular permitió comprobar la presencia de variabilidad intraespecífica para *F. chlamydosporum*, *F. incarnatum* y *F. dimerum*, las cuales presentaron 5, 6 y 6 haplotipos respectivamente, hecho que aún no había sido establecido hasta el momento y que sería interesante estudiar en un futuro.

Como hemos visto, los diferentes estudios moleculares realizados para varias de las especies dentro del género *Fusarium* han confirmado que la secuenciación es un método potente y adecuado para la identificación de las especies del género. También ha permitido constatar que existe variabilidad intraespecífica tanto para el complejo de las especies de *F. solani* y *F. oxysporum*, hecho ampliamente comprobado en la literatura (O'Donnell *et al.*, 1998b; O'Donnell, 2000; Aoki *et al.*, 2003; O'Donnell *et al.*, 2004), como para *F. verticillioides* y, posiblemente, para otras especies como *F. chlamydosporum*, *F. dimerum* y *F. incarnatum*. Asimismo, los estudios fenotípicos realizados con los aislados de *F. solani*, *F. oxysporum* y *F. verticillioides* ponen de manifiesto la inexistencia de caracteres diferenciadores que permitan distinguir a las especies filogenéticas obtenidas. Sin embargo, la mayoría de las especies menos frecuentes en clínica han podido ser identificadas y reconocidas según sus características morfológicas, lo que resulta de utilidad para aquellos laboratorios clínicos que no dispongan de técnicas moleculares para su identificación.

A pesar de ello, se ha demostrado que la identificación morfológica de algunas de ellas, tales como *F. thapsinum* o *F. sacchari*, debería corroborarse mediante técnicas moleculares.

## 5.2. ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD ANTIFÚNGICA *IN VITRO*

En general, dada la importancia clínica de varias especies del género, y que aún no se ha establecido un tratamiento eficaz frente a las diferentes infecciones que ocasionan, el estudio de su respuesta antifúngica *in vitro* tiene un evidente interés clínico. La baja actividad *in vitro* de los diferentes antifúngicos utilizados hasta el momento para el género *Fusarium* ha sido comprobada en varios estudios (Pujol *et al.*, 1997; Paphitou *et al.*, 2002; Lewis *et al.*, 2005; Sabatelli *et al.*, 2006), siendo *F. solani* la especie más resistente. Además, como ya hemos comentado anteriormente, *F. solani* y *F. oxysporum* han sido descritos como complejos de especies en diversos estudios de filogenia molecular (O'Donnell *et al.*, 1998b; O'Donnell, 2000; O'Donnell *et al.*, 2004 y Zhang *et al.*, 2006) y el estudio molecular que llevamos a cabo con aislados de *F. verticillioides* demostró que esta especie también presenta una elevada variabilidad intraespecífica. Estos hechos plantean el interrogante de si las nuevas especies filogenéticas pueden llegar a tener un diferente comportamiento en cuanto a su sensibilidad antifúngica, lo cual resultaría de gran importancia a nivel clínico. Por tanto, uno de los aspectos novedosos de esta tesis fue el de relacionar la variabilidad genética intraespecífica con el comportamiento frente a diferentes antifúngicos, tanto de uso tradicional como de reciente desarrollo. Para ello, se realizaron ensayos de sensibilidad antifúngica *in vitro* incluyendo aislados representativos de los diferentes

grupos filogenéticos obtenidos en cada caso. Por último, la reciente aparición de casos clínicos donde el agente causal de la infección pertenece a otras especies del género menos comunes, y por tanto, menos estudiadas hasta la fecha, plantea la necesidad de evaluar su sensibilidad antifúngica frente a los diferentes fármacos.

En el estudio que realizamos con los aislados del complejo de *F. solani*, todos los antifúngicos ensayados mostraron poca actividad, tal y como ya había sido demostrado por otros autores (Pujol *et al.*, 1997; Capilla *et al.*, 2001; Pfaller *et al.*, 2002), confirmando la elevada resistencia de esta especie al tratamiento antifúngico. Anfotericina B y voriconazol son los dos fármacos recomendados para el tratamiento de la fusariosis (Dignani y Anaissie, 2004), sin embargo, ninguno de ellos presentó buena actividad frente a los aislados estudiados lo que concuerda, en el caso de la anfotericina B, con la baja eficacia observada en estudios *in vivo* (Guarro *et al.*, 1999) y con el bajo éxito obtenido en varios casos clínicos (Hennequin *et al.*, 1997; Nucci *et al.*, 2003; Dignani y Anaissie, 2004). En cuanto al voriconazol, otros estudios *in vitro* también corroboran la baja eficacia observada en nuestros resultados (Lewis *et al.*, 2005; Sabatelli *et al.*, 2006). Aunque se ha observado que este fármaco ha sido efectivo en varios casos clínicos de fusariosis (Consigny *et al.*, 2003; Perfect *et al.*, 2003; Bigley *et al.*, 2004), en ninguno de ellos *F. solani* fue el agente causal de la infección. Estudios previos de sensibilidad antifúngica *in vitro* para los azoles de más reciente aparición (posaconazol, ravuconazol y albaconazol) ya habían mostrado una baja actividad de estos antifúngicos frente a *F. solani* (Capilla *et al.*, 2001; Cuenca-Estrella *et al.*, 2005; Cuenca-Estrella *et al.*, 2006; Sabatelli *et al.*, 2006), hecho que ha sido corroborado por nuestros resultados. Nuestro estudio ha sido el primero en comparar la sensibilidad antifúngica de aislados representativos de los diferentes

grupos filogenéticos del complejo *F. solani*. En los resultados obtenidos, sin embargo, no se han observado diferencias en el comportamiento de los grupos moleculares frente a los antifúngicos ensayados, mostrando todos los aislados una elevada resistencia frente a los mismos.

En el caso del segundo complejo de especies más importante en clínica, *F. oxysporum*, existían varios trabajos previos en los que se estudiaba la sensibilidad antifúngica *in vitro* de aislados de este complejo frente a diferentes antifúngicos comúnmente utilizados como AMB, voriconazol, itraconazol y fluconazol. En general, los aislados de este complejo mostraban elevada resistencia a los diferentes fármacos, observándose valores altos de CMI, aunque menores que los obtenidos para la especie *F. solani* (Pujol *et al.*, 1997; Espinel-Ingroff, 2001; Espinel-Ingroff *et al.*, 2001; Lewis *et al.*, 2005; Cuenca-Estrella *et al.*, 2006). En el caso de la AMB, los valores de CMI descritos en los diferentes trabajos mencionados, oscilaban dentro de un amplio rango de valores (0.5 y >16 mg/L), sin embargo, la experiencia clínica ha demostrado una escasa eficacia de este antifúngico en el tratamiento de las infecciones producidas por *F. oxysporum* (Krcmery *et al.*, 1997; Olivares *et al.*, 2005). Otros azoles, de más reciente aparición, como posaconazol, ravuconazol y albaconazol, así como la micafungina y la terbinafina, también han mostrado baja actividad (García-Effron *et al.*, 2004; Cuenca-Estrella *et al.*, 2006; Sabatelli *et al.*, 2006; Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2008; Tortorano *et al.*, 2008), resultados confirmados en nuestro estudio. Al igual que en el caso de *F. solani*, tampoco existía ningún trabajo anterior en que se relacionase la variabilidad genética del complejo *F. oxysporum* con la sensibilidad antifúngica a los diferentes fármacos. Por tanto, incluimos aislados representativos de los cuatro grupos

moleculares obtenidos en el estudio molecular y que coincidían con los previamente establecidos por O'Donnell y colaboradores (1998b, 2004). Aunque para la mayoría de los antifúngicos todos los aislados presentaron un comportamiento similar, la terbinafina mostró diferencias estadísticamente significativas en su actividad frente a las diferentes especies filogenéticas. Los aislados de los grupos 1 y 2 eran sensibles al fármaco (MG CMI: 0.25 mg/L y MG CMI: 0.35 mg/L, respectivamente), mientras que el único aislado perteneciente al grupo 4 mostraba una resistencia elevada (MG CMI: 32 mg/L) y los aislados del grupo 3 presentaban diferente comportamiento dependiendo del subgrupo molecular al que pertenecían. En estudios previos de sensibilidad antifúngica *in vitro*, la terbinafina había mostrado valores variables frente a los aislados de *F. oxysporum*, que iban desde 0.5 a 16 mg/L (García-Effron *et al.*, 2004) y desde 0.5 a 32 mg/L (Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2008), lo que estaría de acuerdo con nuestros resultados. En estos trabajos, sin embargo, no se identificaba a qué grupo molecular pertenecían los aislados. En clínica, a pesar de los pocos datos existentes, la terbinafina ha mostrado buenos resultados en el tratamiento de dos casos de onicomycosis causados por esta especie (Gianni *et al.*, 1997) y también en la terapia combinada con AMB, en el tratamiento de un caso de infección diseminada causada por dicho hongo (Rothe *et al.*, 2004).

La tercera especie más importante en clínica, *F. verticillioides*, presentaba en general, menor resistencia a los antifúngicos que las anteriores, según los estudios previos de sensibilidad antifúngica *in vitro* publicados (Espinel-Ingroff, 2001; García-Effron *et al.*, 2004; Sabatelli *et al.*, 2006). Los antifúngicos AMB, voriconazol, posaconazol y terbinafina mostraban valores relativamente bajos de CMI frente a

aislados de esta especie (Sabatelli *et al.*, 2006; Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2008). Con respecto a la especie *F. thapsinum*, no existían estudios previos sobre su respuesta a los antifúngicos ya que se trata de una especie descrita recientemente (Klittich *et al.*, 1997). Ya habíamos observado que AMB y voriconazol eran poco efectivos frente a los complejos de especies *F. solani* y *F. oxysporum*. De nuevo, tanto para *F. verticillioides* como *F. thapsinum* ambos antifúngicos presentaron baja actividad, con valores de CMI entre 2 y 4 mg/L. Estos resultados son similares, en el caso de *F. verticillioides*, a los obtenidos por otros autores (Espinel-Ingroff, 2001; Tortorano *et al.*, 2008). Para el resto de antifúngicos, sin embargo, ambas especies mostraron comportamientos diferentes. *F. verticillioides* fue más sensible, con valores de CMI menores que frente a *F. solani* y *F. oxysporum*, mientras que *F. thapsinum* presentó valores similares a *F. solani* para todos los fármacos estudiados excepto AMB, voriconazol y terbinafina, frente a los que presentó mayor sensibilidad. En general, según nuestros resultados, la terbinafina fue el agente antifúngico más eficaz, con unos valores de MG CMI total de 0.24 mg/L frente a *F. verticillioides* y de 0.44 mg/L frente a *F. thapsinum*, los cuales difieren de los presentados en trabajos anteriores para *F. verticillioides* por otros autores; García-Effron y colaboradores (2004) obtuvieron un rango de valores de CMI entre 1 y 4 mg/L, aunque en este caso sólo estudiaron dos aislados, y Alastruey-Izquierdo y colaboradores (2008) obtuvieron una MG CMI de 3.23 mg/L para 13 aislados. Otro de los antifúngicos que resultó efectivo para *F. verticillioides* en nuestro estudio fue el posaconazol, con una MG CMI de 0.83 mg/L. Nuestros resultados coinciden con Sabatelli y colaboradores (2006), quienes obtuvieron valores de CMI de 1 mg/L. No hay datos publicados acerca del uso de ambos fármacos en clínica frente a infecciones producidas por *F. verticillioides* o *F. thapsinum*. Sin embargo, en algunos

casos clínicos, se han producido recuperaciones en pacientes con fusariosis tratados con posaconazol, aunque las especies implicadas no fueron identificadas (Raad *et al.*, 2006).

A pesar de que en recientes trabajos sobre especies clínicas de *Fusarium* se incluían aislados de *F. proliferatum*, *F. incarnatum* y *F. dimerum* (García-Effron *et al.*, 2004; Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2008; Tortorano *et al.*, 2008) no existen datos para la mayoría de las especies del género de menor incidencia clínica en relación a su sensibilidad antifúngica. En nuestro estudio hemos incluido aislados de *F. chlamydosporum*, *F. dimerum*, *F. incarnatum*, *F. nygamai*, *F. napiforme*, *F. proliferatum* y *F. sacchari*, especies poco frecuentes en clínica, pero descritas como agentes de infecciones en el hombre en más de una ocasión. De nuevo, la terbinafina ha demostrado ser el antifúngico más activo frente a dichas especies, con valores de CMI inferiores a 1 mg/L en todos los casos, excepto frente a *F. incarnatum* cuyos aislados no fueron todos sensibles, mostrando un valor de MG CMI de 10.08 mg/L. Estos resultados concuerdan con los datos publicados para esta especie (Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2008). Asimismo, la terbinafina había mostrado buena actividad *in vitro* frente a diferentes aislados de *Fusarium*, aunque no habían sido identificados a nivel de especie (Jessup *et al.*, 2000) y, como ya habíamos indicado, también frente a *F. verticillioides* y *F. thapsinum*. En cuanto a su eficacia en clínica, hemos comentado anteriormente que el tratamiento con terbinafina resultó eficaz frente a varias infecciones causadas por *F. oxysporum*. Además, también ha mostrado ser una terapia efectiva en varios casos de onicomicosis producidos por especies no identificadas del género *Fusarium* (Gupta *et al.*, 2001) y en un caso de infección

cutánea diseminada debida a *F. proliferatum* (Neuburguer *et al.*, 2008), donde se administró en combinación con AMB.

Como conclusión, podemos decir que los resultados de los estudios de sensibilidad a los antifúngicos *in vitro* llevados a cabo para las diferentes especies del género, han permitido corroborar la elevada resistencia de las especies del complejo *F. solani* frente a todos los fármacos ensayados, y determinar que no existen diferencias en el comportamiento de las diferentes especies filogenéticas ensayadas. En el caso de *F. oxysporum*, se han obtenido resultados más alentadores, ya que la terbinafina presentó buena actividad frente a los aislados de los grupos moleculares 1, 2 y algunos subgrupos del grupo 3. Sería interesante aumentar el número de aislados de cada grupo filogenético, así como realizar estudios *in vivo* para corroborar los resultados obtenidos. En cuanto al resto de especies ensayadas, la terbinafina mostró buena actividad frente a todas ellas, excepto *F. incarnatum*. El posaconazol fue el segundo antifúngico más eficaz, mostrando buena actividad frente a *F. verticillioides* y frente a algunos aislados de *F. incarnatum* y *F. chlamydosporum*. A la vista de estos resultados y de los diferentes casos clínicos en que ya ha sido utilizada, la terbinafina se plantea como una buena opción terapéutica para el tratamiento de las infecciones por *Fusarium*. Para confirmarlo sería necesario realizar estudios *in vivo* con las diferentes especies ensayadas.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y FILOGENIA MOLECULAR DE ESPECIES DEL GÉNERO FUSARIUM DE INTERÉS CLÍNICO

Mónica Azor Heras

DL: T.1368-2011

## **CONCLUSIONES**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y FILOGENIA MOLECULAR DE ESPECIES DEL GÉNERO FUSARIUM DE INTERÉS CLÍNICO

Mónica Azor Heras

DL: T.1368-2011

## 6. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos se extraen las siguientes conclusiones:

1. Las regiones del ADN seleccionadas para llevar a cabo los estudios moleculares de las especies de *Fusarium* de interés clínico han sido: la región ITS del ADNr, la región TUB del gen de la  $\beta$ -tubulina y un fragmento del gen del EF-1 $\alpha$ .

Para los aislados identificados morfológicamente como *Fusarium solani*:

2. El análisis multigénico realizado a un total de 50 aislados confirma que *F. solani* constituye un complejo de especies y pone de manifiesto la existencia de cuatro grupos filogenéticos diferentes, no descritos previamente por otros autores.
3. A pesar de encontrar ciertas diferencias microscópicas entre alguno de los grupos filogenéticos obtenidos, no pudimos determinar diferencias fenotípicas claras que permitieran describir nuevas especies a partir de dichos clados.
4. El estudio de sensibilidad *in vitro* ha permitido demostrar que los grupos moleculares obtenidos presentan una elevada resistencia frente a todos los antifúngicos ensayados.

Para los aislados identificados morfológicamente como *Fusarium oxysporum*:

5. El análisis del gen del EF-1 $\alpha$  ha permitido confirmar la correcta identificación morfológica de un total de 28 aislados de *F. oxysporum* y agruparlos en cuatro grupos filogenéticos bien diferenciados, previamente descritos por otros autores para este complejo.
6. Se ha demostrado que dichos grupos moleculares presentan diferente sensibilidad antifúngica *in vitro* frente a la terbinafina, y una elevada resistencia al resto de antifúngicos ensayados.

Para los aislados identificados morfológicamente como *Fusarium verticillioides*, así como para aislados de otras especies de *Fusarium* de menor incidencia clínica:

## Conclusiones

---

7. La región TUB del gen de la  $\beta$ -tubulina ha resultado ser un excelente marcador molecular para identificar las siguientes especies: *F. verticillioides*, *F. thapsinum*, *F. chlamyosporum*, *F. dimerum*, *F. incarnatum*, *F. napiforme*, *F. nygamai*, *F. proliferatum* y *F. sacchari*.
8. Las especies *F. verticillioides*, *F. chlamyosporum*, *F. incarnatum* y *F. dimerum* presentan una elevada variabilidad intraespecífica para la región TUB estudiada, y probablemente constituyen complejos de especies.
9. Se ha obtenido una buena correlación entre la identificación morfológica y molecular de las cepas de las especies mencionadas en la conclusión 7, excepto en los casos de *F. thapsinum* y *F. sacchari* para las que resulta necesaria la identificación molecular.
10. El estudio de sensibilidad *in vitro* revela que la terbinafina es el antifúngico de mayor actividad frente a la mayoría de las especies mencionadas anteriormente.

## **BIBLIOGRAFÍA**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI

SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y FILOGENIA MOLECULAR DE ESPECIES DEL GÉNERO FUSARIUM DE INTERÉS CLÍNICO

Mónica Azor Heras

DL: T.1368-2011

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Ajello L., Padhye A. A., Chandler F. W., McGinnis M. R., Morganti L. y Alberici F.** 1985. *Fusarium moniliforme*, a new mycetoma agent. Restudy of a European case. Eur. J. Epidemiol. 1:5-10.
- Alastruey-Izquierdo A., Cuenca-Estrella M., Monzón A., Mellado E. y Rodríguez-Tudela J. L.** 2008. Antifungal susceptibility profile of clinical *Fusarium* spp. isolates identified by molecular methods. J. Antimicrob. Chemother. 61:805-809.
- Albisetti M., Lauener R. P., Güngör T., Schär G., Niggli F. K. y Nadal D.** 2004. Disseminated *Fusarium oxysporum* infection in hemophagocytic lymphohistiocytosis. Infection 32:364-366.
- Alexopoulos C. J., Mims C. W. y Blackwell M.** 1996. *Introductory mycology*. 4th ed. Wiley J. and sons, Inc., New York.
- Anaissie E. J., Kuchar R. T., Rex J. H., Francesconi A., Kasai M., Müller F. M., Lozano-Chiu M., Summerbell R. C., Dignani M. C., Chanock S. J. y Walsh T. J.** 2001. Fusariosis associated with pathogenic *Fusarium* species colonization of a hospital water system: a new paradigm for the epidemiology of opportunistic mold infections. Clin. Infect. Dis. 33:1871-1878.
- Aoki T., O'Donnell K., Homma Y. y Lattanzi A. R.** 2003. Sudden-death syndrome of soybean is caused by two morphologically and phylogenetically distinct species within the *Fusarium solani* species complex-*F. virguliforme* in North America and *F. tucumaniae* in South America. Mycologia 95: 660-684.
- Arikan S., Lozano-Chiu M., Paetznick V., Nangia S. y Rex J. H.** 1999. Microdilution susceptibility testing of amphotericin B, itraconazole, and voriconazole against clinical isolates of *Aspergillus* and *Fusarium* species. J. Clin. Microbiol. 37:3946-3951
- Arney K. L., Tiernan R. y Judson M. A.** 1997. Primary pulmonary involvement of *Fusarium solani* in a lung transplant recipient. Chest 112:1128-1130.

**Austen B., McCarthy H., Wilkins B., Smith A. y Duncombe A.** 2001. Fatal disseminated *Fusarium* infection in acute lymphoblastic leukaemia in complete remission. *J. Clin. Pathol.* 54:488-490.

**Avise J. C. y Ball R. M. Jr.** 1990. Principles of genealogical concordance in species concept and biological taxonomy. En *Oxford Surveys in Evolutionary Biology* (D. Futuyma y J. Antonovics, Eds.), Vol. 7, pp. 45-67. Oxford Univ. Press, Oxford.

**Avise J. C.** 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman and Hall, New York.

**Barnett J. A., Payne R. W. y Yarrow D.** 1983. *Yeasts: characteristics and identification*. Cambridge: Cambridge University Press. New York, USA.

**Barnett J. A., Payne R. W. y Yarrow D.** 2000. *Yeasts: characteristics and identification*. 3<sup>rd</sup>. Ed. Cambridge: Cambridge University Press. New York, USA.

**Barrios N. J., Kirkpatrick D. V., Murciano A., Stine K., Van Dyke R. B. y Humbert J. R.** 1990. Successful treatment of disseminated *Fusarium* infection in an immunocompromised child. *Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 12:319-324.

**Besl H. y Bresinsky A.** 1997. Chemosystematics of *Suillaceae* and *Gomphidiaceae* (suborder *Suillineae*). *Plant Syst. Evol.* 206:223-242.

**Bigley V. H., Duarte R. F., Gosling R. D., Kibbler C. C., Seaton S. y Potter M.** 2004. *Fusarium dimerum* infection in a stem cell transplant recipient treated successfully with voriconazole. *Bone Marrow Transplant.* 34:815-817.

**Bodey G. P., Boktour M., Mays S., Duvic M., Kontoyiannis D., Hachem R. y Raad I.** 2002. Skin lesions associated with *Fusarium* infection. *J. Am. Acad. Dermatol.* 47:659-666.

**Booth C.** 1971. *The Genus Fusarium*, p. 237. Commonwealth Mycology Institute, Kew, Surrey, England.

- Booth C.** 1981. Perfect states (teleomorphs) of *Fusarium* species, pp. 446-52. En P. E. Nelson, T. A. Tousson, and R. J. Cook (eds.), *Fusarium: Diseases, Biology, and Taxonomy*. University Park: Pennsylvania State Univ. Press. 457 pp.
- Boutati E. I. y Anaissie E. J.** 1997. *Fusarium*, a significant emerging pathogen in patients with hematologic malignancy: ten years' experience at a cancer center and implications for management. *Blood* 90:999-1008.
- Bowman K. O. y Kastenbaum M. A.** 1992. Overdispersion of aggregated genetic data. *Mutat Res.* 272:133-137.
- Bridge P. D.** 1985. An evaluation of some physiological and biochemical methods as an aid to the characterization of species of *Penicillium* subsection *fasciculata*. *J. Gen. Microbiol.* 131:1887-1895.
- Brint J. M., Flynn P. M., Pearson T. A. y Pui C. H.** 1992. Disseminated fusariosis involving bone in an adolescent with leukemia. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 11:965-968.
- Bruns T. D., Vilgalys R., Barns S. M., González D., Hibbett D. S., Lane D. J., Simon L., Stickel S., Szaro T. M., Weisburg W. G. y Sogin M. L.** 1992. Evolutionary relationships within the fungi: analyses of nuclear small subunit rRNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 1:231-241.
- Buchanan R. E. y Gibbons N. E. (ed.).** 1974. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8<sup>th</sup> ed. Baltimore: Williams and Wilkins Co.
- Bushelman S. J., Callen J. P., Roth D. N. y Cohen L. M.** 1995. Disseminated *Fusarium solani* infection. *J. Am. Acad. Dermatol.* 32:346-351.
- Caccone A., Moriyama E. N., Gleason J. M., Nigro L. y Powell J. R.** 1996. A molecular phylogeny for the *Drosophila melanogaster* subgroup and the problem of polymorphism data. *Mol. Biol. Evol.* 13:1224-1232.
- Camin A. M., Michelet C., Langanay T., de Place C., Chevrier S., Guého E. y Guiguen C.** 1999. Endocarditis due to *Fusarium dimerum* four years after coronary artery bypass grafting. *Clin. Infect. Dis.* 28:150.

**Capilla J., Ortoneda M., Pastor F. J. y Guarro J.** 2001. *In vitro* antifungal activities of the new triazole UR-9825 against clinically important filamentous fungi. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:2635-2637.

**Carbone I. y Khon L. M.** 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91:553-556.

**Castagnola E., Garaventa A., Conte M., Barretta A., Faggi E. y Viscoli C.** 1993. Survival after fungemia due to *Fusarium moniliforme* in a child with neuroblastoma. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 12:308-309.

**Caux F., Aractingi S., Baurmann H., Reygagne P., Dombret H., Romand S., Dubertret L.** 1993. *Fusarium solani* cutaneous infection in a neutropenic patient. *Dermatology* 186:232-235.

**Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard-Second edition. CLSI document M38-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

**Consigny S., Dhedin N., Datry A., Choquet S., Leblond V. y Chosidow O.** 2003. Successful voriconazole treatment of disseminated *Fusarium* infection in an immunocompromised patient. *Clin. Infect. Dis.* 37:311-313.

**Cowan S. T.,** 1974. *Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria*, 2<sup>nd</sup> ed., Cambridge University Press. Cambridge.

**Cracraft J.** 1983. Species concept and speciation analysis. In *Current Ornithology*. Vol. 1, pp. 159-187. Plenum Press, New York.

**Cruse M., Telerant R., Gallagher T., Lee T. y Taylor J. W.** 2002. Cryptic species in *Stachybotrys chartarum*. *Mycologia* 94:814-822.

**Cuenca-Estrella M., Gómez-López A., Mellado E., García-Effron G., Monzón A. y Rodríguez-Tudela J. L.** 2005. *In vitro* activity of ravuconazole against 923 clinical isolates of nondermatophyte filamentous fungi. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:5136-5138.

- Cuenca-Estrella M., Gómez-López A., Mellado E., Buitrago M. J., Monzón A. y Rodríguez-Tudela J. L.** 2006. Head-to-head comparison of the activities of currently available antifungal agents against 3,378 Spanish clinical isolates of yeasts and filamentous fungi. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:917-921.
- de Hoog G. S., Marvin-Sikkema F. D., Lahpoor G. A., Gottschall J. C., Prins R. A. y Guého E.** 1994. Ecology and physiology of the emerging opportunistic fungi *Pseudallescheria boydii* and *Scedosporium prolificans*. *Mycoses* 37:71-78.
- de Hoog G. S., Guarro J., Gené J. y Figueras M. J.** 2000. *Atlas of clinical fungi*. 2<sup>nd</sup> ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands, University Rovira i Virgili, Reus, Spain.
- Dignani M. C. y Anaissie E. J.** 2004. Human fusariosis. *Clin. Microbiol. Infect.* 1:67-75.
- Dobzhansky, T. H.** 1935. The Y chromosome of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 20: 366-376.
- Donnio A., Van Nui D. N., Catanese M., Desbois N., Ayeboua L. y Merle H.** 2007. Outbreak of keratomycosis attributable to *Fusarium solani* in the French West Indies. *Am. J. Ophthalmol.* 143:356-358.
- Durán J. A., Malvar A., Pereiro M. y Pereiro M.** 1989. *Fusarium moniliforme* keratitis. *Acta Ophthalmol.* 67:710-713.
- Eljaschewitsch J., Sandfort J., Tintelnot K., Horbach I. y Ruf B.** 1996. Port-a-cath-related *Fusarium oxysporum* infection in an HIV-infected patient: treatment with liposomal amphotericin B. *Mycoses* 39:115-119.
- Espinel-Ingroff A. y Shadomy S.** 1989. *In vitro* and *in vivo* evaluation of antifungal agents. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 8:352-361.
- Espinel-Ingroff A. y Kerkering T. M.** 1991. Spectrophotometric method of inoculum preparation for the *in vitro* susceptibility testing of filamentous fungi. *J. Clin. Microbiol.* 29:393-394.

**Espinel-Ingroff A., Kish C. W. Jr., Kerkering T. M., Fromtling R. A., Bartizal K., Galgiani J. N., Villareal K., Pfaller M. A., Gerarden T., Rinaldi M. G. *et al.* 1992.** Collaborative comparison of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. *J. Clin. Microbiol.* 30:3138-3145.

**Espinel-Ingroff A.** 1994. La estandarización de las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos y métodos alternativos. *Revista Española de Quimioterapia* 7:20-31.

**Espinel-Ingroff A., Dawson K., Pfaller M., Anaissie E., Breslin B., Dixon D., Fothergill A., Paetznick V., Peter J., Rinaldi M. *et al.* 1995.** Comparative and collaborative evaluation of standardization of antifungal susceptibility testing for filamentous fungi. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:314-319.

**Espinel-Ingroff A.** 2001. *In vitro* fungicidal activities of voriconazole, itraconazole, and amphotericin B against opportunistic moniliaceous and dematiaceous fungi. *J. Clin. Microbiol.* 39:954-958.

**Espinel-Ingroff A., Boyle K. y Sheehan D. J.** 2001. *In vitro* antifungal activities of voriconazole and reference agents as determined by NCCLS methods: review of the literature. *Mycopathologia* 150:101-115.

**Farris J. S.** 1983. The logical basis of phylogenetic analysis. Pp. 277-302. En: *Advances in Cladistics* (Platnick NI and Funk VA, eds.), Columbia University Press. New York.

**Felsenstein J.** 1978. Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. *Sys. Zool.* 27:401-410.

**Felsenstein J.** 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* 17:368-376.

**Felsenstein J.** 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.

**Ferrer C., Alio J., Rodriguez A., Andreu M. y Colom F.** 2005. Endophthalmitis caused by *Fusarium proliferatum*. *J. Clin. Microbiol.* 43:5372-5375.

**Frisvad J. C. y Filtenborg O.** 1990. Secondary metabolites as consistent criteria in *Penicillium* taxonomy and a synoptic key to *Penicillium* subgenus *Penicillium*. In *Modern concepts in Penicillium and Aspergillus Classification* (R. A. Samson and J. I. Pitt, Eds.), pp. 373-384. Plenum Press, New York.

**Fromtling R. A., Galgiani J. N., Pfaller M. A., Espinel-Ingroff A., Bartizal K. F., Bartlett M. S., Body B. A., Frey C., Hall G., Roberts G. D. et al.** 1993. Multicenter evaluation of a broth macrodilution antifungal susceptibility test for yeasts. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:39-45.

**Galgiani J. N., Reiser J., Brass C., Espinel-Ingroff A., Gordon M. A., Kerkering T. M.** 1987. Comparison of relative susceptibilities of *Candida* species to three antifungal agents as determined by unstandardized methods. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31:1343-1347.

**García-Effron G., Gómez-López A., Mellado E., Monzón A., Rodríguez-Tudela J. L. y Cuenca-Estrella M.** 2004. *In vitro* activity of terbinafine against medically important non-dermatophyte species of filamentous fungi. *J. Antimicrob. Chemother.* 53:1086-1089.

**Geiser D. M., Pitt J. I. y Taylor J. W.** 1998. Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin producing fungus *Aspergillus flavus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:388-393.

**Gerlach W. y Nirenberg H.** 1982. The genus *Fusarium* – a pictorial atlas. *Mitt. Biol. Bundesanst. Land Forstwirtschaft. Berl. Dahlem* 209:1-406.

**Ghosh A., Maity P. K., Hemashettar B. M., Sharma V. K. y Chakrabarti A.** 2002. Physiological characters of *Sporothrix schenckii* isolates. *Mycoses* 45:449-454.

**Gianni C., Cerri A. y Crosti C.** 1997. Unusual clinical features of fingernail infection by *Fusarium oxysporum*. *Mycoses* 40:455-459.

**Glass N. L. Y Donaldson G. C.** 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1323-1330.

**Godoy P., Cano J., Gené J., Guarro J., Höfling-Lima A. L. y Colombo A. L.** 2004. Genotyping of 44 isolates of *Fusarium solani*, the main agent of fungal keratitis in Brazil. J. Clin. Microbiol. 42:4494-4497.

**Gorman S. R., Magiorakos A. P., Zimmerman S. K. y Craven D. E.** 2006. *Fusarium oxysporum* pneumonia in an immunocompetent host. South Med. J. 99:613-616.

**Gradon J. D., Lerman A. y Lutwick L. I.** 1990. Septic arthritis due to *Fusarium moniliforme*. Rev. Infect. Dis. 12:716-717.

**Guarro J. y Gené J.** 1992. *Fusarium* infections. Criteria for the identification of the responsible species. Mycoses 35:109-114.

**Guarro J. y Gené J.** 1995. Opportunistic fusarial infections in humans. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 14:741-754.

**Guarro J., Gené J. y Stchigel A. M.** 1999. Developments in fungal taxonomy. Clin. Microbiol. Rev. 12:454-500.

**Guarro J., Nucci M., Akiti T. y Gené J.** 2000a. Mixed infection caused by two species of *Fusarium* in a human immunodeficiency virus-positive patient. J. Clin. Microbiol. 38:3460-3462.

**Guarro J., Nucci M., Akiti T., Gené J., Barreiro M. D. y Gonçalves R. T.** 2000b. Fungemia due to *Fusarium sacchari* in an immunosuppressed patient. J. Clin. Microbiol. 38:419-421.

**Guarro J., Rubio C., Gené J., Cano J., Gil J., Benito R., Morandier M. J. y Miguez E.** 2003. Case of keratitis caused by an uncommon *Fusarium* species. J. Clin. Microbiol. 41:5823-5826.

**Guilhermetti E., Takahachi G., Shinobu C. S. y Svidzinski T. I.** 2007. *Fusarium* spp. as agents of onychomycosis in immunocompetent hosts. Int. J. Dermatol. 46:822-826.

**Guinvarc'h A., Guilbert L., Marmorat-Khuong A., Lavarde V., Chevalier P., Amrein C., Guillemain R. y Berrebi A.** 1998. Disseminated *Fusarium solani* infection with endocarditis in a lung transplant recipient. *Mycoses* 41:59-61.

**Gupta A. K., Gregurek-Novak T., Konnikov N., Lynde C. W., Hofstader S. y Summerbell R.C.** 2001. Itraconazole and terbinafine treatment of some nondermatophyte molds causing onychomycosis of the toes and a review of the literature. *J. Cutan. Med. Surg.* 5:206-210.

**Hattori N., Shirai A., Sugiura Y., Li W., Yokoyama K., Misawa Y., Okuzumi K. y Tamaki K.** 2005. Onychomycosis caused by *Fusarium proliferatum*. *Br. J. Dermatol.* 153:647-649.

**Hawksworth D. L.** 1974. *Mycologist's Handbook*. Kew: Commonwealth Mycological Institute.

**Hawksworth D., Kirk P., Sutton B. y Pegler D.** 1996. *Ainsworth's and Bisby's Dictionary of the Fungi*, 8th ed. CABI, Wallingford, UK.

**Helm T. N., Longworth D. L., Hall G. S., Bolwell B. J., Fernandez B. y Tomecki K. J.** 1990. Case report and review of resolved fusariosis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 23:393-398.

**Hemo I., Pe'er J. y Polacheck I.** 1989. *Fusarium oxysporum* keratitis. *Ophthalmologica* 198:3-7.

**Hennequin C., Benailly N., Sully C., Sorin M., Scheinmann P., Lenoir G., Gaillard J. L., Berche P.** 1997. *In vitro* susceptibilities to amphotericin B, itraconazole, and miconazole of filamentous fungi isolated from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:2064-2066.

**Hillis D. M. y Bull J. J.** 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst. Boil.* 42:182-192.

**Hirata T., Kimishima E., Aoki T., Nirenberg H. I. y O'donnell K.** 2001. Morphological and molecular characterization of *Fusarium verticillioides* from rotten banana imported into Japan. *Mycoscience* 42:155-166.

**Huelsenbeck J. P., Ronquist R., Nielsen R. y Bollback J. P.** 2001. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science*. 294:2310-2314.

**Husain S., Alexander B. D., Munoz P., Avery R. K., Houston S., Pruett T., Jacobs R., Dominguez E. A., Tollemar J. G., Baumgarten K., Yu C. M., Wagener M. M., Linden P., Kusne S. y Singh N.** 2003. Opportunistic mycelial fungal infections in organ transplant recipients: emerging importance of non-*Aspergillus* mycelial fungi. *Clin. Infect. Dis.* 37:221-229.

**Imwidthaya S., Chuntrasakul C. y Chantarakul N.** 1984. Opportunistic fungal infection of the burn wound. *J. Med. Assoc. Thai.* 67:242-248.

**Jessup C. J., Ryder N. S. y Ghannoum M. A.** 2000. An evaluation of the *in vitro* activity of terbinafine. *Med Mycol.* 38:155-159.

**Jureen R., Koh T. H., Wang G., Chai L. Y., Tan A. L., Chai T., Wong Y. W., Wang Y., Tambyah P. A., Beuerman R. y Tan D.** 2008. Use of multiple methods for genotyping *Fusarium* during an outbreak of contact lens associated fungal keratitis in Singapore. *BMC Infect Dis.* 8:92.

**Kasuga T, Taylor J. W. y White T. J.** 1999. Phylogenetic relationships of varieties and geographical groups of the human pathogenic fungus, *Histoplasma capsulatum* Darling. *J. clin. Microbiol.* 37:653-663.

**Kiehn T. E., Nelson P. E., Bernard E. M., Edwards F. F., Koziner B. y Armstrong D.** 1985. Catheter-associated fungemia caused by *Fusarium chlamydosporum* in a patient with lymphocytic lymphoma. *J. Clin. Microbiol.* 21:501-504.

**Kini, K. R., V. Leth, y S. B. Mathur.** 2002. Genetic variation in *Fusarium moniliforme* isolated from seeds of different host species from Burkina Faso based on Random Amplified Polymorphic DNA Analysis. *J. Phytopathol.* 150:209-212.

**Kishino H. y Hasegawa M.** 1989. Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from DNA sequence data, and the branching order in hominoidea. *J. Mol. Evol.* 29:170-179.

**Klittich, C., J. F. Leslie, P. E. Nelson y W. F. Marasas.** 1997. *Fusarium thapsinum* (*Gibberella thapsina*): a new species in section *Liseola* from sorghum. *Mycologia* 89:643-652.

**Kornerup A. y Wanscher, J. H.** 1984. *Methuen Handbook of Colour*. 3rd ed. Eyre Methuen Ltd., London.

**Koufopanou V., Burt A. y Taylor J. W.** 1997. Concordance of gene genealogies reveals reproductive isolation in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:5478-5482.

**Koufopanou V., Burt A. y Taylor J. W.** 1998. Correction: Concordance of gene genealogies reveals reproductive isolation in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:8414-8414.

**Krcmery V. Jr., Fuchsberger P., Trupl J., Blahová M., Danisovicová A., Svec J. y Drgona L.** 1993. Fungal pathogens in etiology of septic shock in neutropenic patients with cancer. *Zentralbl Bakteriol.* 278:562-565.

**Krcmery V. Jr., Jesenska Z., Spanik S., Gyarfás J., Nogova J., Botek R., Mardiak J., Sufliarsky J., Sisolakova J., Vanickova M., Kunova A., Studena M. y Trupl J.** 1997. Fungaemia due to *Fusarium* spp. in cancer patients. *J. Hosp. Infect.* 36: 223-228.

**Kreger-van Rij N. J. W.** 1984. *The yeasts – a taxonomic study*. 3rd edn. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

**Krulder J. W., Brimicombe R. W., Wijermans P. W. y Gams W.** 1996. Systemic *Fusarium nygamai* infection in a patient with lymphoblastic non-Hodgkin's lymphoma. *Mycoses* 39:121-123.

**Kumar S., Tamura K. y Nei M.** 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinformatics*. 5:150-163.

**Kwasna H., Chelkowski J. y Zajkowski P.** 1991. *Grzyby* (Mycota), tomo XXII. *Sierpik (Fusarium)*. Warszawa-Krakow, Poland: *Polska Akademia Nauk*, Flora Polska. 137 p.

**Leslie J. F. y Summerell B. A.** 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. 1<sup>st</sup> ed. Blackwell Publishing Professional. Iowa, USA.

**Letscher-Bru V., Campos F., Waller J., Randriamahazaka R., Candolfi E. y Herbrecht R.** 2002. Successful outcome of treatment of a disseminated infection due to *Fusarium dimerum* in a leukemia patient. *J. Clin. Microbiol.* 40:1100-1102.

**Lewis R. E., Wiederhold N. P. y Klepser M. E.** 2005. In vitro pharmacodynamics of amphotericin B, itraconazole, and voriconazole against *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Scedosporium* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:945-951.

**Marasas, W. F. O., Nelson P. E. y Toussoun T. A.** 1984. Toxigenic *Fusarium* species: identity and mycotoxicology. Pennsylvania State University Press, University Park.

**Marasas W. F., Thiel P. G., Sydenham E. W., Rabie C. J., Lübben A. y Nelson P. E.** 1991. Toxicity and moniliformin production by four recently described species of *Fusarium* and two uncertain taxa. *Mycopathologia* 113:191-197.

**Marr K. A., Carter R. A., Crippa F., Wald A. y Corey L.** 2002. Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin. Infect. Dis.* 34:909-917.

**Matsuda, T. y Matsumoto T.** 1986. Disseminated hyalohyphomycosis in a leukemic patient. *Arch. Dermatol.* 122:1171-1175.

**Mayden R. L.** 1997. A hierarchy of species concept: The denouement in the saga of the species problem. In species: *The units of Biodiversity* (M. F. Claridge, H. A. Dawah, and M. R. Wilson, Eds.), pp. 381-424. Chapman and Hall, London.

- Mayr E.** 1940. Speciation phenomena in birds. *Am. Naturalist* 74:249-278.
- Melcher G. P., McGough D. A., Fothergill A. W., Norris C. y Rinaldi M. G.** 1993. Disseminated hyalohyphomycosis caused by a novel human pathogen, *Fusarium napiforme*. *J. Clin. Microbiol.* 31:1461-1467.
- Mitter N., A. C. Srivastava, S. Rebu, A. K. Sarbhoy, y D. K. Agarwal.** 2001. Characterization of gibberellin producing strains of *Fusarium moniliforme* based on DNA polymorphism. *Mycopathologia* 153:187-193.
- Murray P. R., Rosenthal K. S. y Pfaller M. A.** 2006. *Microbiología médica*, 5ª ed. Ed. Elsevier, D. L., Madrid.
- Myoken Y., Sugata T., Kyo T. y Fujihara M.** 1995. Oral *Fusarium* infection in a granulocytopenic patient with acute myelogenous leukemia: a case report. *J. Oral Pathol. Med.* 24:237-240.
- Naiker S. y Odhav B.** 2004. Mycotic keratitis: profile of *Fusarium* species and their mycotoxins. *Mycoses* 47:50-56.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard-second edition M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, PA.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard. M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, PA.
- Nelson P. E., Toussoun T. A. y Marasas W. F. O.** 1983. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press, University Park. Pennsylvania.
- 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.
- Neuburger S., Massenkeil G., Seibold M., Lutz C., Tamm I., le Coutre P., Graf B.,**

**Doerken B. y Arnold R.** 2008. Successful salvage treatment of disseminated cutaneous fusariosis with liposomal amphotericin B and terbinafine after allogeneic stem cell transplantation. *Transpl. Infect. Dis.* 10:290-293.

**Ninet B., Jan I., Bontems O., Léchenne B., Jousson O., Lew D., Schrenzel J., Panizzon R. G. y Monod M.** 2005. Molecular identification of *Fusarium* species in onychomycoses. *Dermatology* 210:21-25.

**Nirenberg H. I.** 1976. Untersuchungen über die morphologische und biologische differenzierung in der *Fusarium*-Sektion *Liseola*. *Mitt. Biol. Bundesanst. Land-u. Forstwirtsch. Berlin-Dahlem.* 169:1-117.

**Nirenberg H. I.** 1990. Recent advances in the taxonomy of *Fusarium*. *Studies in Mycology.* 32:91-101.

**Nirenberg H. I., y K. O'Donnell.** 1998. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90: 434-458.

**Nucci M., Anaissie E. J., Queiroz-Telles F., Martins C. A., Trabasso P., Solza C., Mangini C., Simões B. P., Colombo A. L., Vaz J., Levy C. E., Costa S., Moreira V. A., Oliveira J. S., Paraguay N., Duboc G., Voltarelli J. C., Maiolino A., Pasquini R. y Souza C. A.** 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. *Clin. Microbiol. Reviews.* 20:695-704.

**O'Donnell K. y Cigelnik E.** 1997. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Mol. Phylogenet. Evol.* 7: 103-116.

**O'donnell K., Cigelnik E y Nirenberg H. I.** 1998a. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90:465-493.

**O'Donnell K., Kistler H. C., Cigelnik E. y Ploetz R. C.** 1998b. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 2044-2049.

**O'Donnell K.** 2000. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. *Mycologia* 92: 919-938.

**O'Donnell K., Nirenberg H. I., Aoki T. y Cigelnik E.** 2000. A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience* 41:61-78.

**O'Donnell K., Sutton D. A., Rinaldi M. G., Magnon K. C., Cox P. A., Revankar S. G., Sanche S., Geiser D. M., Juba J. H., van Burik J. A., Padhye A., Anaissie E. J., Francesconi A., Walsh T. J., Robinson J. S.** 2004. Genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium oxysporum* complex inferred from multilocus DNA sequence data and amplified fragment length polymorphism analyses: evidence for the recent dispersion of a geographically widespread clonal lineage and nosocomial origin. *J. Clin. Microbiol.* 42:5109-5120

**O'Donnell K., Sarver B. A., Brandt M., Chang D. C., Noble-Wang J., Park B. J., Sutton D. A., Benjamin L., Lindsley M., Padhye A., Geiser D. M. y Ward T. J.** 2007. Phylogenetic diversity and microsphere array-based genotyping of human pathogenic Fusaria, including isolates from the multistate contact lens-associated U.S. keratitis outbreaks of 2005 and 2006. *J. Clin. Microbiol.* 45:2235-2248.

**O'Donnell K., Sutton D. A., Fothergill A., McCarthy D., Rinaldi M. G., Brandt M. E., Zhang N. y Geiser D. M.** 2008. Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. *J. Clin. Microbiol.* 46:2477-2490.

**Okada H., Hamatani S., Kondo M., Imai T., Itoh S., Isobe K. y Onishi S.** 2000. Successful treatment of disseminated *Fusarium* infection in an infant with leukemia. *Int. J. Hematol.* 72:494-498.

**Olivares R., Alfaro J., Díaz M. C. y Thompson L.** 2005. Disseminated fusariosis by *Fusarium oxysporum* in an adult patient with acute myeloid leukemia and severe febrile neutropenia. *Rev. Chilena Infectol.* 22:356-360.

**Pagliarusco A., Tomazzoli L., Amalfitano G., Polonelli L. y Bonomi L.** 1995. Mycotic keratitis by *Fusarium moniliforme*. *Acta Ophthalmol. Scand.* 73:560-562.

**Paphitou N. I., Ostrosky-Zeichner L., Paetznick V. L., Rodríguez J. R., Chen E. y Rex J. H.** 2002. 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.* 46:3298-3300.

**Pascoe I. G.** 1990. *Fusarium* morphology I: Identification and characterization of a third conidial type, the mesoconidium. *Mycotaxon* 37: 121-160.

**Patoux-Pibouin M., Couatarmanach A., Le Gall F., Bergeron C., De Bièvre C., Guiguen C. y Chevrant-Breton J.** 1992. *Fusarium solani* fusariosis in a leukemic adolescent. *Ann. Dermatol. Venereol.* 119:377-380.

**Pereiro M. Jr., Labandeira J. y Toribio J.** 1999. Plantar hyperkeratosis due to *Fusarium verticillioides* in a patient with malignancy. *Clin. Exp. Dermatol.* 24:175-178.

**Pérez-Pérez L., Pereiro M. Jr., Sánchez-Aguilar D. y Toribio J.** 2007. Ulcerous lesions disclosing cutaneous infection with *Fusarium solani*. *Acta Derm. Venereol.* 87:422-424.

**Perfect J. R., Marr K. A., Walsh T. J., Greenberg R. N., DuPont B., de la Torre-Cisneros J., Just-Nubling G., Schlamm H. T., Lutsar I., Espinel-Ingroff A. y Johnson E.** 2003. Voriconazole treatment for less-common, emerging, or refractory fungal infections. *Clin. Infect. Dis.* 36:1122-1131.

**Pfaller M. A., Burmeister L., Bartlett M. S. y Rinaldi M. G.** 1988. Multicenter evaluation of four methods of yeast inoculum preparation. *J. Clin. Microbiol.* 26:1437-1441.

**Pfaller M. A., Rinaldi M. G., Galgiani J. N., Bartlett M. S., Body B. A., Espinel-Ingroff A., Fromtling R. A., Hall G. S., Hughes C. E., Odds F. C. et al.** 1990. Collaborative

investigation of variables in susceptibility testing of yeasts. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34:1648-1654.

**Pfaller M. A., Messer S. A., Hollis R. J., Jones R. N. y the Sentry Participants Group** 2002. Antifungal activities of posaconazole, ravuconazole, and voriconazole compared to those of itraconazole and amphotericin B against 239 clinical isolates of *Aspergillus* spp. and other filamentous fungi: report from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:1032-1037.

**Pitt J. I.** 1979. *The genus Penicillium and its teleomorphic states Eupenicillium and Talaromyces*. Academic Press, London.

**Poirot J. L., Laporte J. P., Gueho E., Verny A., Gorin N. C., Najman A., Marteau M. y Roux P.** 1985. Deep mycosis caused by *Fusarium*. *Presse Med.* 14:2300-2301.

**Polenghi F. y Lasagni A.** 1976. Observations on a case of mycokeratitis and its treatment with BAY b 5097 (Canesten). *Mykosen* 19:223-226.

**Pontón J., Rùchel R., Clemons K. V., Coleman D. C., Grillot R., Guarro J., Aldebert D., Ambroise-Thomas P., Cano J., Carrillo-Muñoz A. J., Gené J., Pinel C., Stevens D. A. y Sullivan D. J.** 2000. Emerging pathogens. *Med. Mycol.* 38: 225-236.

**Pujol I., Guarro J., Gené J. y Sala J.** 1997. *In vitro* antifungal susceptibility of clinical and environmental *Fusarium* spp. strains. *J. Antimicrob. Chemother.* 39:163-167.

**Raad I. y Hachem R.** 1995. Treatment of central venous catheter-related fungemia due to *Fusarium oxysporum*. *Clin. Infect. Dis.* 20:709-711.

**Raad I., Hachem R. Y., Herbrecht R., Graybill J. R., Hare R., Corcoran G. y Kontoyiannis D. P.** 2006. Posaconazole as salvage treatment for invasive fusariosis in patients with underlying hematologic malignancy and other conditions. *Clin. Infect. Dis.* 42:1398-1403.

**Revankar S. G. y Graybill J. R.** 2003. Antifungal therapy. En: *Clinical Mycology*. Eds.: Anaissie E. J., McGinnis M. R., Pfaller M. A. Elsevier Science, USA.

**Reynolds D. R.** 1993. The fungal holomorph: An overview. In *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics* (D. R. Reynolds and J. W. Taylor, Eds.), pp. 15-25. CAB International, Wallingford, UK.

**Richardson, S. E., Bannatyne R. M., Summerbell R. C., Milliken J., Gold R., y Weitzman S. S.** 1988. Disseminated fusarial infection in the immunocompromised host. *Rev. Infect. Dis.* 10:1171-1181.

**Romano C., Miracco C. y Difonzo E. M.** 1998. Skin and nail infections due to *Fusarium oxysporum* in Tuscany, Italy. *Mycoses.* 41:433-437.

**Rosa R. H. Jr., Miller D. y Alfonso E. C.** 1994. The changing spectrum of fungal keratitis in south Florida. *Ophthalmology* 101:1005-1013.

**Rossmann A. Y., Samuels G. J., Rogerson C. T. y Lowen R.** 1999. Genera of Bionectriaceae, Hypocreaceae and Nectriaceae (Hypocreales, Ascomycetes). *Studies in Mycology.* 42.

**Rothe A., Seibold M., Hoppe T., Seifert H., Engert A., Caspar C., Karthaus M., Fätkenheuer G., Bethe U., Tintelnot K. y Cornely O. A.** 2004. Combination therapy of disseminated *Fusarium oxysporum* infection with terbinafine and amphotericin B. *Ann Hematol.* 83:394-397.

**Sabatelli, F., Patel R., Mann P. A., Mendrick C. A., Norris C. C., Hare R., Loebenberg D., Black T. A. y McNicholas P. M.** 2006. In vitro activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:2009-2015.

**Saitou N. y Imanishi T.** 1989. Relative efficiencies of the Fitch-Margoliash, maximum-parsimony, maximum-likelihood, minimum-evolution, and neighbour-joining methods of phylogenetic tree construction in obtaining the correct tree. *Mol. Biol. Evol.* 6:514-525.

**Saitou N. y Nei M.** 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.

**Sallaber S., Lori G. y Galeppi I.** 1999. Keratomycosis by *Fusarium dimerum*. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 17:146-147.

**Salleh B. y Strange R. N.** 1988. Toxigenicity of some fusaria associated with plant and human diseases in the Malaysian peninsula. *J. Gen. Microbiol.* 134:841-847.

**Sander A., Beyer U. y Amberg R.** 1998. Systemic *Fusarium oxysporum* infection in an immunocompetent patient with an adult respiratory distress syndrome (ARDS) and extracorporeal membrane oxygenation (ECMO). *Mycoses* 41:109-111.

**Segal B. H., Walsh T. J., Liu J. M., Wilson J. D. y Kwon-Chung K. J.** 1998. Invasive infection with *Fusarium chlamydosporum* in a patient with aplastic anemia. *J. Clin. Microbiol.* 36:1772-1776.

**Shadomy S., Espinel-Ingroff A. y Cartwright R. Y.** 1991. Laboratory studies with antifungal agents: susceptibility tests and bioassays. En: *Manual of Clinical Microbiology*, 4<sup>th</sup> ed. Eds. Lennette E. H., Balows A., Hausler W. J., Shadomy H. J. American Society for Microbiology, Washintgon DC.

**Simpson G. G.** 1951. The species concept. *Evolution* 5:285-298.

**Simpson G. G.** 1961. *Principles of Animal Taxonomy*. Columbia University Press, New York.

**Skovgaard K., Rosendhal S., O'Donnell K. y Nirenberg H. I.** 2003. *Fusarium commune* is a new species identified by morphological and molecular phylogenetic data. *Mycologia* 95:630-636.

**Snyder W. C. y Hansen H. N.** 1940. The species concept in *Fusarium*. *Am. J. Bot.* 27:64-67.

**Snyder W. C. y Hansen H. N.** 1941. The species concept in *Fusarium* with reference to section *Martiella*. *Am. J. Bot.* 27:738-742.

**Snyder W. C. y Hansen H. N.** 1945. The species concept in *Fusarium* with reference to *Discolor* and other sections. *Am. J. Bot.* 32:657-666.

**Snyder W. C. y Hansen H. N.** 1954. Variation and speciation in the genus *Fusarium*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 60:16-23.

**Solé M.** 2004. Caracterización morfológica y molecular de hongos queratinofílicos: el orden *Onygenales*. Tesis doctoral. Universitat Rovira i Virgili. Reus.

**Sokal R. R. y Michener C. D.** 1958. *Statistical method for evaluating systematic relationships*. University of Kansas science bulletin. 38:1409-1438.

**Steadham J. E., Geis P. A., Simmank J. L.** 1986. Use of carbohydrate and nitrate assimilations in the identification of dematiaceous fungi. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 5:71-75.

**Summerbell R. C., Richardson S. E. y Kane J.** 1988. *Fusarium proliferatum* as an agent of disseminated infection in an immunosuppressed patient. J. Clin. Microbiol. 26:82-87.

**Swofford D. L.** 2001. *PAUP\*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and other Methods) (Version 4.0)*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

**Taj-Aldeen S. J., Gené J., Al Bozom I., Buzina W., Cano J. F. y Guarro J.** 2006. Gangrenous necrosis of the diabetic foot caused by *Fusarium acutatum*. Med. Mycol. 44:547-552.

**Taylor J. W., Jacobson D. J., Kroken S., Kasuga T., Geiser D. M., Hibbett D. S. y Fisher M. C.** 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. Fungal Genet. Biol. 31:21-32.

**Taylor J. W. y Fisher M. C.** 2003. fungal multilocus sequence typing-it's not just for bacteria. Current opinion in Microbiology 6:351-356.

**Tezcan G., Ozhak-Baysan B., Alastruey-Izquierdo A., Ogunc D., Ongut G., Yildiran S. T., Hazar V., Cuenca-Estrella M., Rodriguez-Tudela J. L.** 2008. Disseminated fusariosis by *Fusarium verticillioides* in an acute lymphoblastic leukemia patient after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. J. Clin. Microbiol. In press.

**Thompson J. D., Gibson T. J., Plewniak F., Jeanmougin F. y Higgins D. G.** 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24:4876-4882.

**Thrane, U.** 1986. The ability of common *Fusarium* species to grow on tannin-sucrose agar. *Lett. Appl. Microbiol.* 2:33-35.

**Tomimori-Yamashita J., Ogawa M. M., Hirata S. H., Fischman O., Michalany N. S., Yamashita H. K. y Alchorne M.** 2002. Mycetoma caused by *Fusarium solani* with osteolytic lesions on the hand: case report. *Mycopathologia* 153:11-14.

**Tortorano A. M., Prigitano A., Dho G., Esposito M. C., Gianni C., Grancini A., Ossi C. y Viviani M. A.** 2008. Species distribution and in vitro antifungal susceptibility patterns of 75 clinical isolates of *Fusarium* spp. from Northern Italy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:2683-2685.

**Uchiyama N., Shindo Y., Mikoshiba H. y Saito H.** 1987. Cutaneous infection caused by *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum*. *J. Dermatol.* 14:471-475.

**Viscoli C., Castagnola E., Moroni C., Garaventa A., Manno G. y Savioli C.** 1990. Infection with *Fusarium* species in two children with neuroblastoma. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 9:773-776.

**Vismer H. F., Marasas W. F. O., Rheeder J. P. y Joubert J. J.** 2002. *Fusarium dimerum* as a cause of human eye infection. *Med. Mycol.* 40:399-406.

**Warnock D. W.** 1995. Fungal complications of transplantation: diagnosis, treatment and prevention. *J. Antimicrob. Chemother.* 36:73-90.

**Wasfy E. H., Bridge P. D. y Brayford D.** 1987. Preliminary studies on the use of biochemical and physiological tests for the characterization of *Fusarium* isolates. *Mycopathologia* 99:9-13.

**White T. J., Bruns T., Lee S. y Taylor J.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p (315-322). *In* M.A. Innis, D.H.

Gelfand, J.J. Sninsky , and T.J. White (ed.). PCR protocols: a guide to the methods and applications. Academic Press. New York.

**Wiley E. O.** 1978. The evolutionary species concept reconsidered. Syst. Zool. 27:17-26.

**Wilson G. S. y Miles A. A.** 1975. Topley and Wilson's principles of bacteriology and immunity, vol. 1, 6<sup>th</sup> edn. London: Edward Arnold.

**Wollenweber H. W. y Reinking O. A.** 1935. *Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung*. Paul Parey, Berlín.

**Yang Z.** 1983. Maximum likelihood estimation of phylogeny from DNA sequences when substitutions rates differ over sites. Mol. Biol. Evol. 10:1396-1401.

**Yarrow D.** 1998. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. Pp. 95-97. En: *The yeasts, a taxonomic study*, 4th ed. (Kurtzman C. P. and Fell J. W. eds.), Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

**Yera H., Bougnoux M. E. , Jeanrot C., Baixench M. T., De Pinieux G. y Dupouy-Camet J.** 2003. Mycetoma of the foot caused by *Fusarium solani*: identification of the etiologic agent by DNA sequencing. J. Clin. Microbiol. 41:1805-1808.

**Yildiran S. T., Kömürcü S., Saraçlı M. A., Gönlüm A., Beyan C., Gün H. y Yalçın A.** 1998. *Fusarium* fungaemia in severely neutropenic patients. Mycoses 41:467-469

**Yücesoy M., Ergon M. C., Oren H. y Gülay Z.** 2004. Case report: a *Fusarium* fungaemia. Mikrobiyol Bul. 38:265-271.

**Zapater R. C., de Arrechea A. y Guevara V. H.** 1972. Kertomycosis due to *Fusarium dimerum*. Sabouraudia. 103:274-275.

**Zapater R. C. y Arrechea A.** 1975. Mycotic keratitis by *Fusarium*. A review and report of two cases. Ophthalmologica. 170:1-12.

**Zhang N., O'Donnell K., Sutton D. A., Nalim F. A., Summerbell R. C., Padhye A. A. y D. M. Geiser.** 2006. Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment. J. Clin. Microbiol. 44:2186-2190.

**Zuckerlandl E. y Pauling L.** 1965. Molecules as documents of evolutionary history. J. Theor. Biol. 8:357-366.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y FILOGENIA MOLECULAR DE ESPECIES DEL GÉNERO FUSARIUM DE INTERÉS CLÍNICO

Mónica Azor Heras

DL: T.1368-2011

## **ANEXO I**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y FILOGENIA MOLECULAR DE ESPECIES DEL GÉNERO FUSARIUM DE INTERÉS CLÍNICO

Mónica Azor Heras

DL: T.1368-2011

Resultados de los tests de asimilación de azúcares y fuentes de nitrógeno.

COMPUESTOS		AISLADOS DEL GRUPO I									AISLADOS DEL GRUPO II							
		7238	7240	7242	7995	7996	7998	8014	8484	8666	7985	7989	7991	8024	8031	8032	8483	8633
HEXOSAS	D-fructosa	+	w	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	D-galactosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	D-glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	D-manosa	+	w	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	L-sorbosa	+	w	w	w	+	w	+	+	w	+	w	w	w	w	+	w	+
DISACÁRIDOS	Celobiosa	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Lactosa	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Maltosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Melibiosa	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Sacarosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TRISACÁRIDOS	Trehalosa	+	+	+	w	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	D-melecitosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
POLISACÁRIDOS	Rafinosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Dextrina	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PENTOSAS	D-arabinosa	+	w	w	w	w	w	w	+	w	w	w	+	+	w	w	w	+
	L-arabinosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	L-ramnosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	D-ribosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	D-xilosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	w	+
ALCOHOLES	L-arabinitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Etanol	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Glicerol	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	D-glucitol	w	w	w	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Inositol	+	w	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+
	D-manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Metanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Ribitol	+	w	w	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ÁCIDOS ORGÁNICOS	Xilitol	w	w	w	w	w	w	w	+	w	w	+	+	+	+	w	+	+
	Ácido cítrico	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w
	Ácido láctico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ácido málico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLICÓSIDOS	Ácido tánico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Salicina	w	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OTROS	D- glucosamina	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w
	Cadaverina	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	-
FUENTES DE NITRÓGENO	Creatina	w	w	w	+	+	+	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w
	Creatinina	w	w	w	+	+	+	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w
	L-lisina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Nitrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Nitrito	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w

+: presencia de crecimiento; -: ausencia de crecimiento; w: *wake*, crecimiento débil



Resultados de los tests de asimilación de azúcares y fuentes de nitrógeno (cont.).

COMPUESTOS		AISLADOS DEL GRUPO III								AISLADOS DEL GRUPO IV						
		4389	4391	7992	8013	8037	8263	8631	8688	7140	7141	8030	8038	8039	8340	8634
HEXOSAS	D-fructosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+	w	w	+
	D-galactosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	D-glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	D-manosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	L-sorbosa	w	w	w	+	+	w	w	w	w	w	w	+	w	w	w
DISACÁRIDOS	Celobiosa	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	w	+	+	w	+
	Lactosa	+	+	+	+	+	w	+	+	w	+	w	+	w	+	+
	Maltosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Melibiosa	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	w
	Sacarosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TRISACÁRIDOS	Trehalosa	+	w	+	+	+	w	+	w	+	+	+	+	+	w	+
	D-melecitosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
POLISACÁRIDOS	Rafinosa	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	w	+	+	+	+
	Dextrina	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	w	+	+
PENTOSAS	D-arabinosa	+	+	w	w	w	w	+	w	+	+	w	w	+	w	+
	L-arabinosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	L-ramnosa	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	D-ribosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	D-xilosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+
ALCOHOLES	L-arabinitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Etanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	w	+
	Glicerol	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	w	+	+	+	w
	D-glucitol	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	w	+	w	+	+
	Inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	w	+	+	w	w
	D-manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Metanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Ribitol	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	w	+	w	w	w
ÁCIDOS ORGÁNICOS	Xilitol	+	+	+	+	w	+	+	+	w	w	w	+	w	w	w
	Ácido cítrico	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w
	Ácido láctico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ácido málico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLICÓSIDOS	Ácido tánico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Salicina	+	+	w	+	+	w	w	+	+	+	w	+	+	w	+
OTROS	D- glucosamina	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w
	Cadaverina	w	w	w	-	w	w	w	w	w	w	w	-	w	w	w
FUENTES DE NITRÓGENO	Creatina	+	+	w	w	w	w	w	+	+	+	w	w	w	w	+
	Creatinina	+	+	w	w	w	w	w	w	+	+	w	w	w	w	+
	L-lisina	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	w/+	+
	Nitrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Nitrito	w	w	w	w	w	w	w	w	w	+	w	+	w	w	w

+: presencia de crecimiento; -: ausencia de crecimiento; w: *wake*, crecimiento débil



Resultados de los tests de crecimiento a diferentes concentraciones de NaCl, MgCl<sub>2</sub> y cicloheximida.

COMPUESTOS	AISLADOS DEL GRUPO I									AISLADOS DEL GRUPO II							
	7238	7240	7242	7995	7996	7998	8014	8484	8666	4389	4391	7992	8013	8037	8263	8631	8688
2 % NaCl	+	+	w	+	+	+	+	+	w	+	w	+	+	+	+	+	+
5 % NaCl	w	w	w	w	+	w	w	+	w	+	w	w	+	w	+	w	w
7 % NaCl	w	w	w	w	w	w	w	+	w	+	w	w	w	w	w	w	w
10 % NaCl	w	w	w	w	w	w	w	w	w	+	-	w	w	w	-	w	w
2 % MgCl <sub>2</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5 % MgCl <sub>2</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+
7 % MgCl <sub>2</sub>	+	+	+	+	+	+	w	w	+	+	+	w	+	+	+	+	+
10 % MgCl <sub>2</sub>	w	+	+	+	w	w	w	+	w	+	w	+	+	+	+	+	+
0.05 % Cicloheximida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	w	w	-	-	-
0.1 % Cicloheximida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	w	w	-	-	-
COMPUESTOS	AISLADOS DEL GRUPO III								AISLADOS DEL GRUPO IV								
	7985	7989	7991	8024	8031	8032	8483	8633	7140	7141	8030	8038	8039	8340	8634		
2 % NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
5 % NaCl	w	+	+	+	+	+	w	+	+	+	w	+	w	w	w		
7 % NaCl	w	w	w	w	w	w	w	+	w	w	w	+	w	w	w		
10 % NaCl	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w		
2 % MgCl <sub>2</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
5 % MgCl <sub>2</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
7 % MgCl <sub>2</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+		
10 % MgCl <sub>2</sub>	w	+	+	+	+	+	w	+	+	w	+	+	w	+	w		
0.05 % Cicloheximida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	w	-	-	-		
0.1 % Cicloheximida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

+: presencia de crecimiento; -: ausencia de crecimiento; w: *wake*, crecimiento débil



## **ANEXO II**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y FILOGENIA MOLECULAR DE ESPECIES DEL GÉNERO FUSARIUM DE INTERÉS CLÍNICO

Mónica Azor Heras

DL: T.1368-2011

## Universal In Vitro Antifungal Resistance of Genetic Clades of the *Fusarium solani* Species Complex<sup>∇</sup>

Mónica Azor, Josepa Gené, Josep Cano, and Josep Guarro\*

Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Tarragona, Spain

Received 28 December 2006/Accepted 29 December 2006

**Eleven antifungal drugs were tested against representative isolates of the four phylogenetic clades of the *Fusarium solani* species complex obtained in a multilocus sequence analysis. They all showed very poor activity, with no differences among the clades. Amphotericin B was the most active drug.**

*Fusarium solani* is a fungus that is widely distributed in nature and is able to produce many plant diseases with important economic impacts and, also, severe, usually fatal, human infections (7, 9, 15, 23). These infections can be characterized by their resistance to practically all available antifungal drugs (3, 21, 24). Primary therapy with voriconazole (VRC) or a lipid formulation of amphotericin B (AMB) is currently recommended (22). Although the response of *Fusarium* spp. to AMB is poor in general, it depends on the species involved, with *F. solani* being the most resistant species, at least in vitro (24). Recently, Zhang et al. (29) used a multilocus sequence analysis approach to demonstrate that under the generic name *F. solani*, at least 45 phylogenetically distinct species exist, most of which have not been described formally. It is unknown if antifungal susceptibility varies among these phylogenetic species. If such differences exist, knowing them could be useful for guiding clinical treatments. Due to the difficulties of testing representative strains of all the phylogenetic species, we tested isolates belonging to the four major clades, inferred from a combined phylogenetic analysis of fragments of three genes, i.e., the translation elongation factor 1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ) and  $\beta$ -tubulin genes and the internal transcribed spacer (ITS) of the nuclear rRNA gene, against traditional and new antifungal drugs.

Fifty isolates from clinical or environmental sources, morphologically identified as *F. solani* (6), were included in the study (Table 1). Isolates were stored by lyophilization and submerged in slant cultures in mineral oil at room temperature. The procedures for DNA extraction, amplification, and sequencing of the different regions analyzed were described by Gilgado et al. (8). The annealing temperature was 55°C, and the primers used were EF-1H and EF-2T (16) for EF-1 $\alpha$ , TUB-F (5) and T22 (17) for  $\beta$ -tubulin, and ITS5 and ITS4 (28) for the ITS. The phylogenetic analysis was performed using PAUP\*, version 4.0b10 (27). Maximum parsimony trees were obtained after 100 heuristic searches with random sequence addition and tree bisection-reconnection branch-swapping algorithms, collapsing zero-length branches,

and saving of all minimal-length trees (MulTrees). The results of the partition homogeneity test showed that the three locus sequence data sets were congruent ( $P = 0.2$ ) and could therefore be combined. Sequences of the three genes were analyzed phylogenetically as separate (data not shown) and combined data sets.

We evaluated the in vitro activities of 11 antifungal drugs against 27 representative strains (22 clinical and 5 environmental) randomly chosen from the main clades obtained in the phylogenetic analysis. The isolates were grown on potato dextrose agar plates and incubated at 25°C for 7 days. We used a microdilution reference method (14), with some modification. The inocula were adjusted to a final concentration of  $4 \times 10^3$  to  $5 \times 10^4$  conidia/ml with a hemocytometer and verified by quantitative colony counts on potato dextrose agar plates. *Paecilomyces variotii* ATCC 36257 was included in each batch of tests as a quality control strain. The antifungal agents tested were AMB, albaconazole, VRC, itraconazole, ravuconazole, terbinafine, ketoconazole (KTC), posaconazole (PSC), micafungin (MFG), fluconazole (FLC), and flucytosine (5-FC). MFG, FLC, and 5-FC were diluted in sterile distilled water, and the rest were diluted in dimethyl sulfoxide. Final drug concentrations ranged from 64 to 0.12  $\mu$ g/ml for FLC and 5-FC, from 128 to 0.25  $\mu$ g/ml for MFG, and from 16 to 0.03  $\mu$ g/ml for the rest. The MIC end point for the triazoles and AMB was defined as the lowest concentration that produced complete inhibition of growth, and that for FLC, KTC, 5-FC, and MFG was defined as the lowest concentration that produced a 50% inhibition of growth.

With the primers used, we were able to amplify and sequence 654, 461, and 573 bp of the EF-1 $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin, and ITS gene sequences, respectively. Parsimony analysis of the combined data set (1,688 bp) yielded three trees of 176 steps in length. Four main clades (I, II, III, and IV) with high bootstrap support were obtained, resulting in a total of 28 different haplotypes and numerous putative cryptic species (Fig. 1). We found no relationship between the biogeographical origins of the isolates and the molecular groups. In order to compare the topology of our trees with those obtained by Zhang et al. (29), we performed a new phylogenetic analysis based on ITS and EF-1 $\alpha$  loci (data not shown). We included our isolates and several representative sequences, retrieved from GenBank, from Zhang et al.'s main groups. In general, our clades did not

\* Corresponding author. Mailing address: Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, C/ Sant Llorenç 21, 43201 Reus, Tarragona, Spain. Phone: 34 977 759359. Fax: 34 977 759322. E-mail: josep.guarro@urv.cat.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 12 January 2007.

TABLE 1. Isolates included in this study

Isolate <sup>a</sup>	Source	GenBank accession no.		
		EF-1 $\alpha$	$\beta$ -Tubulin	ITS
FMR 4389	Human scrotum skin, United States	AM397191	AM419414	AM412634
FMR 4391	Human blood, United States	AM397184	AM419413	AM412635
FMR 7140	Aquarium sand, Spain	AM397227	AM419415	AM412636
FMR 7141	Aquarium sand, Spain	AM397228	AM419416	AM412637
FMR 7238	Human ulcer, Spain	AM397225	AM419417	AM412638
FMR 7240	Human skin lesion, Spain	AM397210	AM419418	AM412639
FMR 7242	Human skin lesion, Spain	AM397212	AM419419	AM412640
FMR 7985	Human keratitis, Brazil	AM397218	AM419406	AM412641
FMR 7988	Human keratitis, Brazil	AM397202	AM419420	AM412642
FMR 7989	Human keratitis, Brazil	AM397219	AM419421	AM412643
FMR 7991	Human keratitis, Brazil	AM397220	AM419412	AM412624
FMR 7992	Human keratitis, Brazil	AM397186	AM419422	AM412625
FMR 7993	Human keratitis, Brazil	AM397198	AM419423	AM412626
FMR 7994	Human keratitis, Brazil	AM397194	AM419424	AM412627
FMR 7995	Human keratitis, Brazil	AM397206	AM419425	AM412628
FMR 7996	Human keratitis, Brazil	AM397199	AM419376	AM412629
FMR 7997	Human keratitis, Brazil	AM397209	AM419377	AM412630
FMR 7998	Human keratitis, Brazil	AM397204	AM419378	AM412631
FMR 8000	Human keratitis, Brazil	AM397207	AM419379	AM412632
FMR 8013	Human keratitis, Brazil	AM397189	AM419380	AM412633
FMR 8014	Human keratitis, Brazil	AM397205	AM419381	AM412604
FMR 8016	Human keratitis, Brazil	AM397226	AM419382	AM412605
FMR 8017	Human keratitis, Brazil	AM397208	AM419383	AM412606
FMR 8019	Human keratitis, Brazil	AM397197	AM419384	AM412607
FMR 8021	Human keratitis, Brazil	AM397195	AM419385	AM412608
FMR 8023	Human keratitis, Brazil	AM397201	AM419386	AM412609
FMR 8024	Human keratitis, Brazil	AM397223	AM419409	AM412610
FMR 8027	Human keratitis, Brazil	AM397203	AM419387	AM412611
FMR 8028	Human keratitis, Brazil	AM397196	AM419388	AM412612
FMR 8030	Human keratitis, Brazil	AM397229	AM419389	AM412613
FMR 8031	Human keratitis, Brazil	AM397213	AM419407	AM412614
FMR 8032	Human keratitis, Brazil	AM397222	AM419410	AM412615
FMR 8036	Human keratitis, Brazil	AM397192	AM419390	AM412616
FMR 8037	Human keratitis, Brazil	AM397188	AM419391	AM412617
FMR 8038	Human keratitis, Brazil	AM397230	AM419392	AM412618
FMR 8039	Human keratitis, Brazil	AM397231	AM419393	AM412619
FMR 8040	Human keratitis, Brazil	AM397193	AM419394	AM412620
FMR 8207	Nematode, Spain	AM397190	AM419395	AM412621
FMR 8263	Nematode, Spain	AM397187	AM419396	AM412622
FMR 8281	Nematode, Spain	AM397215	AM419397	AM412623
FMR 8340	Human fungemia, Qatar	AM397232	AM419398	AM412594
FMR 8482	Human clinical source, Qatar	AM397224	AM419411	AM412595
FMR 8483	Human clinical source, Qatar	AM397221	AM419408	AM412596
FMR 8484	Nematode, Spain	AM397200	AM419399	AM412597
FMR 8631	Human clinical source, Spain	AM397185	AM419400	AM412598
FMR 8633	Human nail, Venezuela	AM397214	AM419401	AM412599
FMR 8634	Human diabetic foot sore, Spain	AM397233	AM419402	AM412600
FMR 8666	Nematode, Spain	AM397211	AM419403	AM412601
FMR 8673	Nematode, Spain	AM397216	AM419404	AM412602
FMR 8688	Nematode, Spain	AM397217	AM419405	AM412603

<sup>a</sup> FMR, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Reus, Spain.

coincide with those of Zhang et al., which confirms the high genetic variability of this complex. However, several of our strains nested in their groups 3 and 4.

Results of the in vitro susceptibility tests are shown in Table 2. In general, all drugs showed high MICs, with no remarkable differences among the clades. AMB was the most active drug, although in no case was the MIC lower than 1  $\mu$ g/ml, followed by VRC. The latter drug showed the most variable results; sometimes the differences among MICs against different isolates in the same clade were >8-fold.

The poor in vitro activities of different antifungal drugs

against *Fusarium* have been reported by other authors many times, with *F. solani* being more resistant than the other species of the genus (12, 19, 24, 26). In this study, AMB was revealed as the most active drug, but only one isolate from clade I and another from clade III showed a MIC of 1  $\mu$ g/ml, with all others showing higher values. Although this drug is recommended for the treatment of fusariosis, it has poor clinical success (7, 11, 15). In cases involving neutropenic patients receiving corticosteroids, the survival rate is practically nil, despite aggressive treatment (15). The poor efficacy of AMB was also demonstrated in animal studies (10). VRC, the other

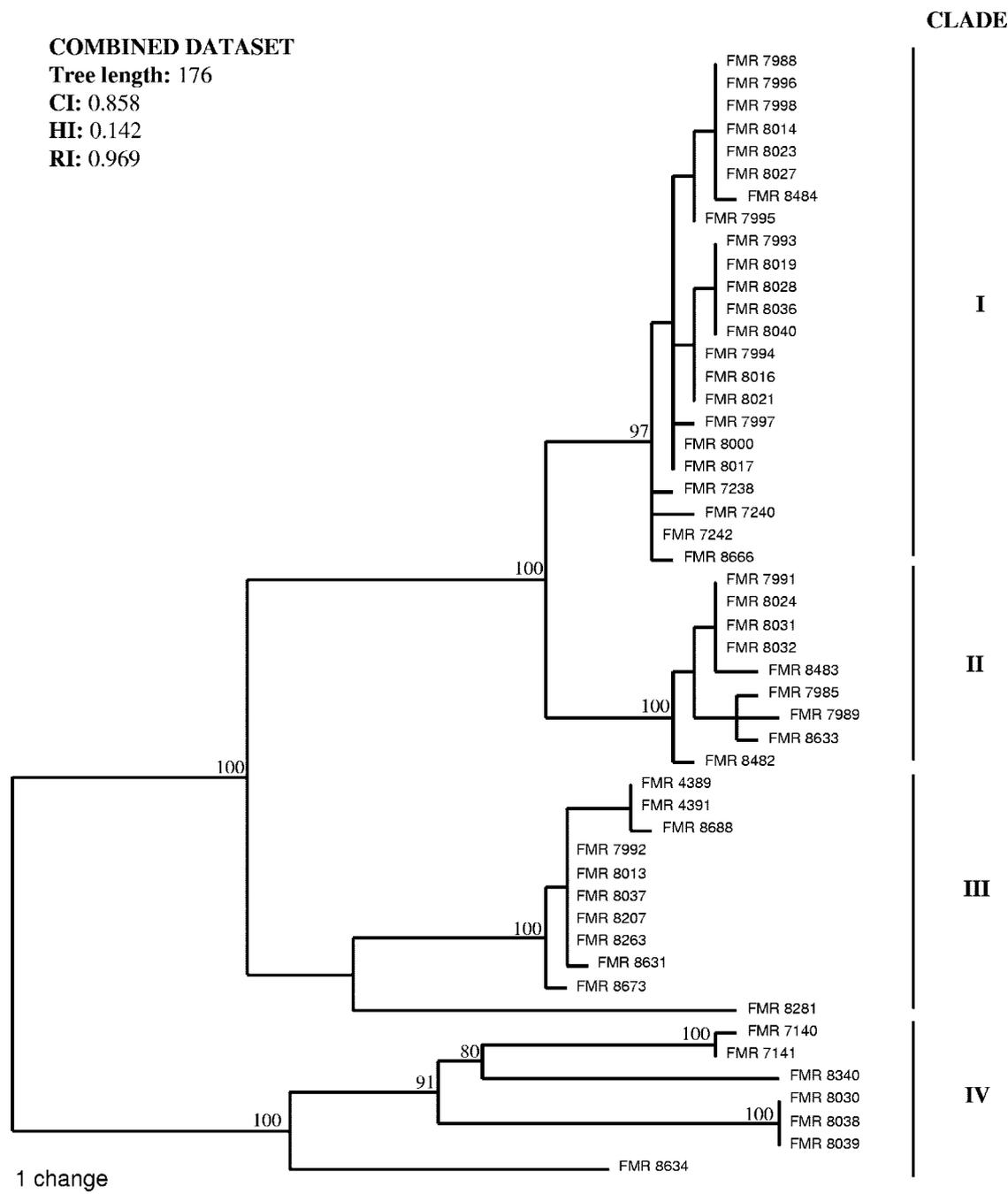


FIG. 1. One of the three most parsimonious trees obtained from heuristic searches, based on a combined data set. Bootstrap support values above 70% are indicated at the nodes. CI, consistency index; RI, retention index; HI, homoplasy index.

recommended drug, is the only agent indicated for treating refractory fusariosis (7). However, in our study, the VRC MICs were always higher than 2 µg/ml, which agrees with the results of other studies (12, 26). This drug was effective in a few clinical cases of fusariosis (2, 4), although in none of them was the species involved referred to as *F. solani*. This is probably linked to the fact that in animal studies *F. solani* was clearly more virulent and more difficult to treat than *F. oxysporum* and *F. verticillioides*, the two other common species of the genus (13, 18). In a recent clinical trial, 45.5% (5/11) of patients

responded satisfactorily to VRC (20), although unfortunately the isolates were not identified to the species level. Arikan et al. (1) demonstrated that the combination of caspofungin plus AMB was synergistic against 100% of strains of *F. oxysporum* but against only 25% of *F. solani* strains. In the case of PSC, we also obtained high MICs, again agreeing with other studies (19, 26). However, in a recent retrospective analysis, PSC as an aggressive treatment for invasive fusariosis gave a 48% successful outcome (25), but the species involved were not listed. In conclusion, the *F. solani* species complex consti-

TABLE 2. Distribution of 27 tested isolates from the four phylogenetic clades of *F. solani*, according to antifungal susceptibility

Antifungal <sup>a</sup>	Clade <sup>b</sup>	No. of isolates with MIC (µg/ml)								
		1	2	4	8	16	32	64	128	256
AMB	I	1	8	2						
	II		4		1					
	III	1	4	2						
	IV		1	3						
VRC	I		3	4	1	2				
	II			1	4	1				
	III			1	1	4	1			
	IV				3	1				
ABC	I to IV								27	
ITC	I to IV								27	
KTC	I to IV								27	
PSC	I to IV								27	
RVC	I to IV								27	
TBF	I to IV								27	
FLC	I to IV								27	
5-FC	I to IV								27	
MFG	I to IV						1	3	10	13

<sup>a</sup> AMB, amphotericin B; VRC, voriconazole; ABC, albaconazole; ITC, itraconazole; KTC, ketoconazole; PSC, posaconazole; RVC, ravuconazole; TBF, terbinafine; FLC, fluconazole; 5-FC, flucytosine; MFG, micafungin.

<sup>b</sup> See Fig. 1.

tutes a group of genetically diverse fungi with poor in vitro and in vivo responses to different antifungal drugs.

We thank Félix Gilgado, Carol Serena, Rita Marimon, and Marçal Mariné for their contributions to this work.

REFERENCES

- Arikan, S., M. Lozano-Chiu, V. Paetznic, and J. H. Rex. 2002. In vitro synergy of caspofungin and amphotericin B against *Aspergillus* and *Fusarium* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:245–247.
- Bigley, V. H., R. F. Duarte, R. D. Gosling, C. C. Kibbler, S. Seaton, and M. Potter. 2004. *Fusarium dimerum* infection in a stem cell transplant recipient treated successfully with voriconazole. *Bone Marrow Transplant.* **34**:815–817.
- Capilla, J., M. Ortoneda, F. J. Pastor, and J. Guarro. 2001. In vitro antifungal activities of the new triazole UR-9825 against clinically important filamentous fungi. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:2635–2637.
- Consigny, S., N. Dhedin, A. Datry, S. Choquet, V. Leblond, and O. Chosidow. 2003. Successful voriconazole treatment of disseminated *Fusarium* infection in an immunocompromised patient. *Clin. Infect. Dis.* **37**:311–313.
- Cruse, M., R. Telerant, T. Gallagher, T. Lee, and J. W. Taylor. 2002. Cryptic species in *Stachybotrys chartarum*. *Mycologia* **94**:814–822.
- de Hoog, G. S., J. Guarro, J. Gené, and M. J. Figueras. 2000. Atlas of clinical fungi, 2nd ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.
- Dignani, M. C., and E. J. Anaissie. 2004. Human fusariosis. *Clin. Microbiol. Infect.* **1**:67–75.
- Gilgado, F., J. Cano, J. Gené, and J. Guarro. 2005. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. *J. Clin. Microbiol.* **43**:4930–4942.
- Guarro, J., and J. Gené. 1995. Opportunistic fusarial infections in humans. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **14**:741–754.
- Guarro, J., I. Pujol, and E. Mayayo. 1999. In vitro and in vivo experimental activities of antifungal agents against *Fusarium solani*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:1256–1257.
- Hennequin, C., V. Lavarde, J. L. Poirot, M. Rabodonirina, A. Datry, S. Aractingi, J. Dupouy-Camet, D. Caillot, F. Grange, L. Kures, O. Morin, B.

- Lebeau, S. Bretagne, C. Guigen, D. Basset, and R. Grillot. 1997. Invasive *Fusarium* infections: a retrospective survey of 31 cases. *J. Med. Vet. Mycol.* **35**:107–114.
- Lewis, R. E., N. P. Wiederhold, and M. E. Klepser. 2005. In vitro pharmacodynamics of amphotericin B, itraconazole, and voriconazole against *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Scedosporium* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:945–951.
- Mayayo, E., I. Pujol, and J. Guarro. 1999. Experimental pathogenicity of four opportunist *Fusarium* species in a murine model. *J. Med. Microbiol.* **48**:363–366.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
- Nucci, M., E. J. Anaissie, F. Queiroz-Telles, C. A. Martins, P. Trabasso, C. Solza, C. Mangini, B. P. Simoes, A. L. Colombo, J. Vaz, C. E. Levy, S. Costa, V. A. Moreira, J. S. Oliveira, N. Paraguay, G. Duboc, J. C. Voltarelli, A. Maiolino, R. Pasquín, and C. A. Souza. 2003. Outcome predictors of 84 patients with hematologic malignancies and *Fusarium* infection. *Cancer* **98**:315–319.
- O'Donnell, K. 2000. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. *Mycologia* **92**:919–938.
- O'Donnell, K., and E. Cigelnik. 1997. Two divergent intragenomic rADN ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are non-orthologous. *Mol. Phylogenet. Evol.* **7**:103–116.
- Ortoneda, M., J. Capilla, F. J. Pastor, I. Pujol, and J. Guarro. 2002. Efficacy of liposomal amphotericin B in treatment of systemic murine fusariosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:2273–2275.
- Paphitou, N. I., L. Ostrosky-Zeichner, V. L. Paetznic, J. R. Rodríguez, E. Chen, and J. H. Rex. 2002. 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.* **46**:3298–3300.
- Perfect, J. R., K. A. Marr, T. J. Walsh, R. N. Greenberg, B. DuPont, J. de la Torre-Cisneros, G. Just-Nubling, H. T. Schlam, I. Lutsar, A. Espinel-Ingroff, and E. Johnson. 2003. Voriconazole treatment for less-common, emerging, or refractory fungal infections. *Clin. Infect. Dis.* **36**:1122–1131.
- Pfaller, M. A., S. A. Messer, R. J. Hollis, R. N. Jones, and the Sentry Participants Group. 2002. Antifungal activities of posaconazole, ravuconazole, and voriconazole compared to those of itraconazole and amphotericin B against 239 clinical isolates of *Aspergillus* spp. and other filamentous fungi: report from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:1032–1037.
- Pfaller, M. A., P. G. Pappas, and J. R. Wingard. 2006. Invasive fungal pathogens: current epidemiological trends. *Clin. Infect. Dis.* **43**:3–14.
- Pontón, J., R. Röchel, K. V. Clemons, D. C. Coleman, R. Grillot, J. Guarro, D. Aldebert, P. Ambrose-Thomas, J. Cano, A. J. Carrillo-Muñoz, J. Gené, C. Pinel, D. A. Stevens, and D. J. Sullivan. 2000. Emerging pathogens. *Med. Mycol.* **38**:225–236.
- Pujol, I., J. Guarro, J. Gené, and J. Sala. 1997. In-vitro antifungal susceptibility of clinical and environmental *Fusarium* spp. strains. *J. Antimicrob. Chemother.* **39**:163–167.
- Raad, I. I., R. Y. Hachem, R. Herbrecht, J. R. Graybill, R. Hare, G. Corcoran, and D. P. Kontoyiannis. 2006. Posaconazole as salvage treatment for invasive fusariosis in patients with underlying hematologic malignancy and other conditions. *Clin. Infect. Dis.* **42**:1398–1403.
- Sabatelli, F., R. Patel, P. A. Mann, C. A. Mendrick, C. C. Norris, R. Hare, D. Loebenberg, T. A. Black, and P. M. McNicholas. 2006. In vitro activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:2009–2015.
- Swofford, D. L. 2001. PAUP\*. Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods), version 4.0. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p. 315–322. *In* M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (ed.), PCR protocols: a guide to the methods and applications. Academic Press, New York, NY.
- Zhang, N., K. O'Donnell, D. A. Sutton, F. A. Nalim, R. C. Summerbell, A. A. Padye, and D. M. Geiser. 2006. Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment. *J. Clin. Microbiol.* **44**:2186–2190.

## In Vitro Antifungal Susceptibility and Molecular Characterization of Clinical Isolates of *Fusarium verticillioides* (*F. moniliforme*) and *Fusarium thapsinum*<sup>∇</sup>

Mónica Azor,<sup>1</sup> Josepa Gené,<sup>1</sup> Josep Cano,<sup>1</sup> Deanna A. Sutton,<sup>2</sup> Annette W. Fothergill,<sup>2</sup> Michael G. Rinaldi,<sup>2,3</sup> and Josep Guarro<sup>1\*</sup>

Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Tarragona, Spain,<sup>1</sup> and Fungus Testing Laboratory, Department of Pathology, The University of Texas Health Science Center<sup>2</sup> and Audie L. Murphy Memorial Veterans' Hospital, South Texas Veterans Health Care System, San Antonio, Texas<sup>3</sup>

Received 7 February 2008/Returned for modification 6 March 2008/Accepted 28 March 2008

**A microdilution method was used to test 11 antifungal drugs against clinical isolates of *Fusarium thapsinum* and three different phylogenetic clades of *Fusarium verticillioides* that were characterized by sequencing a region of the  $\beta$ -tubulin gene. Terbinafine was the most-active drug against both species, followed by posaconazole against *F. verticillioides*.**

*Fusarium verticillioides* (*F. moniliforme*) is one of the most common species involved in fusariosis (7). These infections are frequently refractory to treatment because species of *Fusarium* are generally resistant to the currently available antifungal agents (1, 12). The information available on clinical infections by *F. verticillioides* is limited because in most cases of fusariosis, the identification of the causative agent is not performed, due to the difficulties in species recognition. *F. verticillioides* can be morphologically confused with other species of the *Gibberella fujikuroi* species complex (11, 14, 15). The purposes of this study have been (i) to verify molecularly the morphological identification of numerous clinical isolates of *F. verticillioides*, (ii) to determine whether they constitute a unique phylogenetic group, and in the case that different genetic groups were detected, (iii) to determine if they demonstrate various antifungal susceptibility patterns.

For these first two aims we have sequenced a region of the  $\beta$ -tubulin gene which has proven to be highly informative at the phylogenetic level in different molecular studies of the *G. fujikuroi* complex (13, 14, 15). In this phylogenetic study, we included a total of 46 strains, mainly from clinical sources, that have been morphologically identified as *F. verticillioides* (3). Twelve sequences retrieved from GenBank were also included, 10 of them corresponding to related species of the complex other than *F. verticillioides* and *Fusarium thapsinum* (14, 15) (Table 1). The procedures for DNA extraction and amplification and sequencing of the region analyzed have been previously described (5). With the primers used, TUB-F and T22 (2, 13), we were able to amplify and sequence a fragment of 433 bp. Surprisingly, a BLAST search demonstrated that four of the isolates did not belong to *F. verticillioides*; instead, they were identified as *F. thapsinum*. The morphological differentiation of *F. thapsinum* and *F. verticillioides* is problematic.

According to Klittich et al. (8), the production of a yellow diffusible pigment on potato dextrose agar is the main phenotypic feature distinguishing the two species, but this pigment is not produced by all of the strains.

Parsimony analysis of the data set yielded 120 phylogenetic trees of 79 steps in length (Fig. 1). *F. verticillioides* and *F. thapsinum* were clearly separated from the other species; however, *F. verticillioides* showed a high molecular variability, which was reflected in the existence of three different molecular clades (I, II, and III) and nine different haplotypes. Whether these clades represented different reproductively isolated subgroups can only be determined by the analysis of additional, independent, variable sequence data sets.

We then evaluated the in vitro activity of 11 antifungal drugs against 5 isolates of *F. thapsinum* and 24 of *F. verticillioides* that were randomly selected from the different clades. The isolates were grown on potato dextrose agar plates and incubated at 25°C for 7 days. We used a microdilution reference method (10), with some modifications. The inocula were adjusted to a final concentration of  $4 \times 10^3$  to  $5 \times 10^4$  conidia/ml. Final drug concentrations ranged from 64 to 0.12  $\mu\text{g/ml}$  for fluconazole and flucytosine, from 128 to 0.25  $\mu\text{g/ml}$  for micafungin, and from 16 to 0.03  $\mu\text{g/ml}$  for albaconazole, amphotericin B, itraconazole, ketoconazole, posaconazole, ravuconazole, terbinafine, and voriconazole. The MIC endpoint for amphotericin B, terbinafine, and most triazoles was defined as the lowest concentration that produced complete inhibition of growth; for fluconazole, flucytosine, ketoconazole, and micafungin, the endpoint was defined as the lowest concentration that produced 50% inhibition of growth. Testing was performed twice on two different days, and in those instances where the results did not coincide it was repeated a third time. For those strains, the MIC was considered as the mode of the three MICs.

The susceptibility results are shown in Table 2. For *F. verticillioides*, terbinafine was the most-active drug, followed by posaconazole, ravuconazole, voriconazole, amphotericin B, ketoconazole, albaconazole, and itraconazole in decreasing order of potency. Among these, itraconazole has practically no ac-

\* Corresponding author. Mailing address: Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, C/ Sant Llorenç 21, 43201 Reus, Tarragona, Spain. Phone: 34 977 759359. Fax: 34 977 759322. E-mail: josep.guarro@urv.cat.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 7 April 2008.

TABLE 1. Isolates included in the study and their origin<sup>a</sup>

Species	Isolate no.	Isolate source	GenBank TUB
<i>F. verticillioides</i>	CBS 576.78 (T)	Clinical source, USSR	AM933108
<i>F. verticillioides</i>	CBS 102699	Clinical source, Germany	AM933097
<i>F. verticillioides</i>	CBS 108922	Clinical source, Germany	AM933102
<i>F. verticillioides</i>	CBS 115135	Clinical source, Sweden	AM933089
<i>F. verticillioides</i>	FMR 7236	Clinical source, Spain	AM933098
<i>F. verticillioides</i>	FMR 8585	Clinical source, Spain	AM933094
<i>F. verticillioides</i>	FMR 8694	Clinical source, Spain	AM933111
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC R-1027	Clinical source, United States	AM933092
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC R-1213	Clinical source, United States	AM933112
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC R-1214	Clinical source, United States	AM933115
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC 90-715	Clinical source, United States	AM933118
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC 93-459	Clinical source, United States	AM933116
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC 94-106	Clinical source, United States	AM933105
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC 95-2483	Clinical source, United States	AM933099
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC 96-7	Clinical source, United States	AM933110
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC 96-449	Clinical source, United States	AM933101
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC 96-2334	Clinical source, United States	AM933113
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC 99-1013	Clinical source, United States	AM932522
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC 99-1936	Clinical source, United States	AM933109
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC 00-1810	Clinical source, United States	AM933119
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC 02-185	Clinical source, United States	AM933122
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC 03-72	Clinical source, United States	AM933114
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC 03-504	Clinical source, United States	AM933100
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC 03-1454	Clinical source, United States	AM933103
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC 03-1455	Clinical source, United States	AM933104
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC 03-2552	Clinical source, United States	AM933106
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC 04-506	Clinical source, United States	AM933130
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC 04-695	Clinical source, United States	AM933132
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC 05-430	Clinical source, United States	AM933131
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC 05-431	Clinical source, United States	AM932521
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC 05-1039	Clinical source, United States	AM933090
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC 05-3141	Clinical source, United States	AM933091
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC 06-134	Clinical source, United States	AM933121
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC 06-1103	Clinical source, United States	AM933128
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC 06-1639	Clinical source, United States	AM933129
<i>F. verticillioides</i>	UTHSC 06-3023	Clinical source, United States	AM933120
<i>F. verticillioides</i>	CBS 139.40	<i>Phyllocactus hybridus</i> , Italy	AM933107
<i>F. verticillioides</i>	FMR 9323	Corn, Spain	AM933117
<i>F. verticillioides</i>	FMR 9324	Pig feed, Spain	AM933093
<i>F. verticillioides</i>	FMR 9325	Horse feed, Spain	AM933096
<i>F. verticillioides</i>	FMR 8976	Unknown	AM933095
<i>F. verticillioides</i>			U34413 <sup>b</sup>
<i>F. thapsinum</i> <sup>c</sup>	CBS 539.79	Clinical source, Italy	AM933124
<i>F. thapsinum</i> <sup>c</sup>	UTHSC 98-1202	Clinical source, United States	AM933126
<i>F. thapsinum</i> <sup>c</sup>	UTHSC 03-2158	Clinical source, United States	AM933125
<i>F. thapsinum</i> <sup>c</sup>	UTHSC 03-3093	Clinical source, United States	AM933123
<i>F. thapsinum</i>	CBS 733.97	<i>Sorghum bicolor</i> , South Africa	AM933127
<i>F. thapsinum</i>			U34418 <sup>b</sup>
<i>F. denticulatum</i>			U61550 <sup>b</sup>
<i>F. fujikuroi</i>			U34415 <sup>b</sup>
<i>F. lactis</i>			U61551 <sup>b</sup>
<i>F. napiforme</i>			U34428 <sup>b</sup>
<i>F. nygamai</i>			U34426 <sup>b</sup>
<i>F. pseudoanthophilum</i>			U61553 <sup>b</sup>
<i>F. pseudocircinatum</i>			U34427 <sup>b</sup>
<i>F. ramigenum</i>			U61554 <sup>b</sup>
<i>F. sacchari</i>			U34414 <sup>b</sup>
<i>F. subglutinans</i>			U34417 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> TUB,  $\beta$ -tubulin gene; CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands; FMR, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Reus, Spain; UTHSC, University of Texas Health Science Center at San Antonio, San Antonio, TX; (T), type strain.

<sup>b</sup> Sequences retrieved from GenBank.

<sup>c</sup> Isolates morphologically identified as *F. verticillioides*.

tivity. For *F. thapsinum*, terbinafine was the most-active drug. Voriconazole and amphotericin B followed terbinafine with equivalent potencies. The rest of the tested drugs were not active against this species. In general, the differences among

the MICs of the molecular clades, determined by using the Mann-Whitney U test ( $P < 0.05$ ), were not statistically significant, with the exception of those for ketoconazole and ravuconazole, which showed less activity against the isolates of

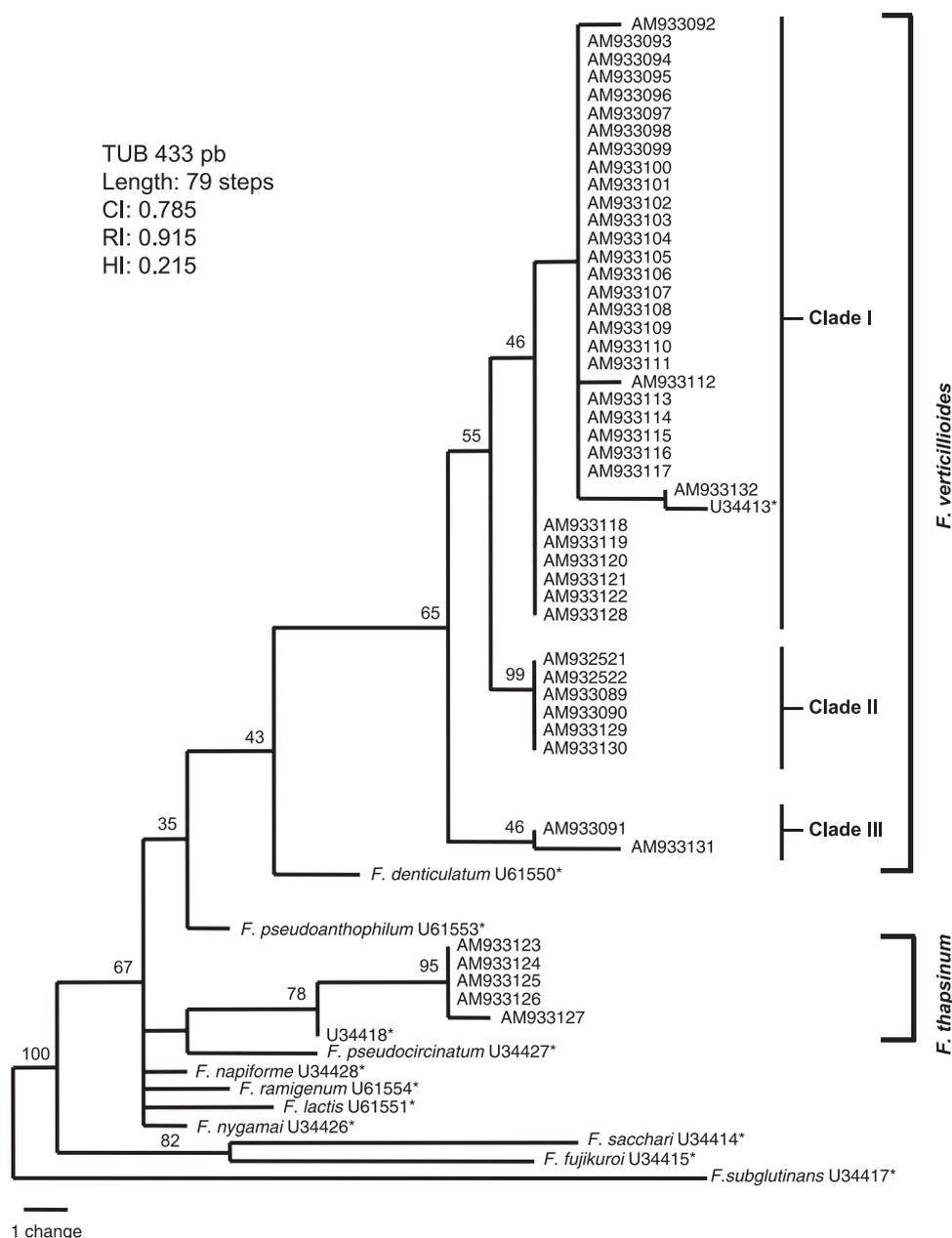


FIG. 1. One of the 120 most-parsimonious trees obtained from heuristic searches based on  $\beta$ -tubulin gene (TUB) sequences. Bootstrap support values are indicated at the nodes. CI, consistency index; RI, retention index; HI, homoplasy index. Asterisks indicate accession numbers of sequences retrieved from GenBank.

clades II and III than those of clade I. Although amphotericin B and voriconazole are the recommended drugs for treating fusariosis (4) and reasonable levels of clinical success (45.5%) have been attained with voriconazole (18), here both drugs showed more-limited activity than that of terbinafine for *F. thapsinum* and of terbinafine and posaconazole for *F. verticillioides*. Unlike *F. verticillioides*, posaconazole was not active against *F. thapsinum*. Fluconazole, flucytosine, and micafungin demonstrated no activity against any of the isolates tested, as had already been demonstrated (6, 19, 21). In a previous in vitro study, terbinafine combined with different azoles, such as albaconazole, ravuconazole, and voriconazole, showed syner-

gistic activity against the three isolates of *F. verticillioides* that were tested (17). No data exists on the clinical use of terbinafine to treat infections by *F. verticillioides*. In some clinical trials, successful outcomes have been reported in patients with fusariosis treated with posaconazole, but the species involved in such cases were not determined (20).

These results are very encouraging because, unlike other pathogenic species of *Fusarium* (1), at least two drugs, posaconazole and terbinafine, seem to exert some activity against *F. verticillioides*. This fact, together with the results shown in animal studies, where *F. verticillioides* was less virulent than *Fusarium solani* (9), would suggest a better prognosis

TABLE 2. Activities of conventional and new antifungal drugs against clinical isolates of *F. verticillioides* and *F. thapsinum*<sup>a</sup>

Species and clade <sup>b</sup> (no. of isolates tested)	MIC [ $\mu$ g/ml; range (GM)]							
	ABC	AMB	ITC	KTC	PSC	RVC	TBF	VRC
<i>F. verticillioides</i>								
Clade I (16)	2-4 (3.03)	2-4 (2.41)	2->16 (12.70)	1-4 (2.00)	0.5-1 (0.79)	1-4 (1.45)	0.125-1 (0.21)	2 (2.00)
Clade II (6)	2-4 (3.56)	2-4 (2.24)	>16 (>16)	4->16 (8)	0.5-1 (0.89)	1-4 (2.24)	0.125-1 (0.31)	2-4 (2.83)
Clade III (2)	4-8 (5.66)	2 (2)	>16 (>16)	4-16 (8)	1 (1)	4 (4)	0.125-0.5 (0.25)	2 (2)
Total (24)	2-8 (3.34)	2-4 (2.33)	2->16 (17.51)	1->16 (3.24)	0.5-1 (0.83)	1-4 (1.77)	0.125-1 (0.24)	2-4 (2.19)
<i>F. thapsinum</i> (5)	16->16 (18.38)	2-4 (2.64)	>16 (>16)	>16 (>16)	>16 (>16)	8->16 (18.38)	0.25-0.5 (0.44)	2-4 (2.64)

<sup>a</sup> GM, geometric mean; ABC, albaconazole; AMB, amphotericin B; ITC, itraconazole; KTC, ketoconazole; PSC, posaconazole; RVC, ravuconazole; TBF, terbinafine; VRC, voriconazole.

<sup>b</sup> See Fig. 1.

for those infections caused by *F. verticillioides* than for those caused by *F. solani*.

This is the first in vitro study of the antifungal susceptibility of *F. thapsinum*. Although *F. thapsinum* is an important plant pathogen, several human infections have also been attributed to this species (16, 22). This study emphasizes the usefulness of molecular methods for the correct identification of species difficult to distinguish morphologically and has demonstrated important differences in the antifungal susceptibility patterns of *F. verticillioides* and *F. thapsinum*.

We thank Núria Pilas, Catalina Núñez, Marçal Mariné, M. Mar Rodríguez, Enrique Calvo, and Manuela Reyes for their contributions to this work.

This work was supported by the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología, grants CGL2005-07394/BOS and CGL 2007-65669/BOS.

#### REFERENCES

- Azor, M., J. Gené, J. Cano, and J. Guarro. 2006. Universal in vitro antifungal resistance of genetic clades of the *Fusarium solani* species complex. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:1500-1503.
- Cruse, M., R. Telerant, T. Gallagher, T. Lee, and J. W. Taylor. 2002. Cryptic species in *Stachybotrys chartarum*. *Mycologia* **94**:814-822.
- de Hoog, G. S., J. Guarro, J. Gené, and M. J. Figueras. 2000. Atlas of clinical fungi, 2nd ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.
- Dignani, M. C., and E. J. Anaissie. 2004. Human fusariosis. *Clin. Microbiol. Infect.* **1**:67-75.
- Gilgado, F., J. Cano, J. Gené, and J. Guarro. 2005. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. *J. Clin. Microbiol.* **43**:4930-4942.
- Groll, A. H., T. Stergiopoulou, E. Roilides, and T. J. Walsh. 2005. Micafungin: pharmacology, experimental therapeutics and clinical applications. *Exp. Opin. Investig. Drugs* **14**:489-509.
- Guarro, J., and J. Gené. 1995. Opportunistic fusarial infections in humans. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **14**:741-754.
- Klittich, C., J. F. Leslie, P. E. Nelson, and W. F. Marasas. 1997. *Fusarium thapsinum* (*Gibberella thapsina*): a new species in section *Liseola* from sorghum. *Mycologia* **89**:643-652.
- Mayayo, E., I. Pujol, and J. Guarro. 1999. Experimental pathogenicity of four opportunist *Fusarium* species in a murine model. *J. Med. Microbiol.* **48**:363-366.
- NCCLS. 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
- Nirenberg, I., and K. O'Donnell. 1998. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* **90**:434-458.
- Nucci, M., and E. Anaissie. 2007. *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**:695-704.
- O'Donnell, K., and E. Cigelnik. 1997. Two divergent intragenomic rADN ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are non-orthologous. *Mol. Phylogenet. Evol.* **7**:103-116.
- O'Donnell, K., E. Cigelnik, and H. I. Nirenberg. 1998. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* **90**:465-493.
- O'Donnell, K., H. I. Nirenberg, A. Takayuki, and E. Cigelnik. 2000. A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience* **41**:61-78.
- O'Donnell, K., B. A. J. Sarver, M. Brandt, D. C. Chang, J. Noble-Wang, B. J. Park, D. A. Sutton, L. Benjamin, M. Lindsley, A. Padhye, D. M. Geiser, and T. J. Ward. 2007. Phylogenetic diversity and microsphere array-based genotyping of human pathogenic fusaria, including isolates from the multistate contact lens-associated U.S. keratitis outbreaks of 2005 and 2006. *J. Clin. Microbiol.* **45**:2235-2248.
- Ortoneda, M., J. Capilla, F. J. Pastor, I. Pujol, and J. Guarro. 2004. In vitro interactions of licensed and novel antifungal drugs against *Fusarium* spp. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **48**:69-71.
- Perfect, J. R., K. A. Marr, T. J. Walsh, R. N. Greenberg, B. DuPont, J. de la Torre-Cisneros, G. Just-Nübling, H. T. Schlam, I. Lutsar, A. Espinel-Ingroff, and E. Johnson. 2003. Voriconazole treatment for less-common, emerging, or refractory fungal infections. *Clin. Infect. Dis.* **9**:1122-1131.
- Pujol, I., J. Guarro, J. Gené, and J. Sala. 1997. In-vitro antifungal susceptibility of clinical and environmental *Fusarium* spp. strains. *J. Antimicrob. Chemother.* **39**:163-167.
- Raad, I. I., R. Y. Hachem, R. Herbrecht, J. R. Graybill, R. Hare, G. Corcoran, and D. P. Kontoyiannis. 2006. Posaconazole as salvage of invasive fusariosis in patients with underlying hematologic malignancy and other conditions. *Clin. Infect. Dis.* **42**:1398-1403.
- Reuben, A., E. Anaissie, P. E. Nelson, R. Hashem, C. Legrand, D. H. Ho, and G. P. Bodey. 1989. Antifungal susceptibility of 44 clinical isolates of *Fusarium* species determined by using a microdilution method. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**:1647-1649.
- Yücesoy, M., M. C. Ergon, H. Oren, and Z. Gülay. 2004. Case report: a *Fusarium* fungemia. *Mikrobiyol. Bul.* **38**:265-271.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y FILOGENIA MOLECULAR DE ESPECIES DEL GÉNERO FUSARIUM DE INTERÉS CLÍNICO

Mónica Azor Heras

DL: T.1368-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y FILOGENIA MOLECULAR DE ESPECIES DEL GÉNERO FUSARIUM DE INTERÉS CLÍNICO

Mónica Azor Heras

DL: T.1368-2011