

Artículo original

Susceptibilidad *in vitro* a cinco antifúngicos de aislamientos del Complejo *Fusarium solani* provenientes de úlceras corneales

Andreína Duarte^{a,b}, María Mercedes Panizo^{b,*}, Giuseppe Ferrara^b, Liset Lage^c, Vera Reviakina^b, Maribel Dolande^b

^aCátedra de Microbiología, Instituto de Medicina Tropical "Dr. Félix Pifano", Universidad Central de Venezuela. ^bDepartamento de Micología, Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". ^cSección de Micología, Servicio Autónomo Instituto de Biomedicina. Caracas, Venezuela.

Recibido 9 de junio de 2014; aceptado 23 de septiembre de 2014

Resumen: El Complejo *Fusarium solani* (CFS) se encuentra distribuido en la naturaleza, causando un amplio espectro de infecciones en los humanos, desde superficiales, como la queratitis, hasta infecciones fúngicas invasoras, caracterizándose por su resistencia a los antimicóticos. El objetivo de esta investigación fue determinar la susceptibilidad *in vitro* del CFS frente a cinco antifúngicos. Se utilizaron 30 aislados obtenidos de úlceras corneales provenientes de la colección de cultivos del Departamento de Micología del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" y se siguió el protocolo descrito en el documento M38-A2 del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI), determinando las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) por microdilución en caldo para anfotericina B, itraconazol, posaconazol, voriconazol y fluconazol. En general, todas las drogas presentaron CMI elevadas, siendo voriconazol y anfotericina B los antifúngicos que exhibieron mejor actividad, mientras que itraconazol, posaconazol y fluconazol mostraron actividad nula. Los resultados de este estudio aportaron información importante sobre el comportamiento del CFS frente a los antifúngicos de uso común en la práctica clínica por primera vez en Venezuela. Es imprescindible que el médico conozca la actividad de estas drogas para poder tomar decisiones y orientar una conducta terapéutica adecuada.

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

In vitro susceptibility to five antifungals of *Fusarium solani* Complex isolates obtained from corneal ulcers

Abstract: The *Fusarium solani* Complex (FSC) is distributed in nature, producing a wide spectrum of infections in humans, from superficial ones such as keratitis, to invasive fungal infections, characterized by their resistance to antimicrobials. The purpose of this investigation was to determine the *in vitro* susceptibility of the FSC to five antifungals. We used 30 isolates obtained from corneal ulcers kept at the culture collection of the Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" and we followed the protocol described in the M38-A2 document of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) determining the Minimal Inhibitory Concentrations (MIC) by broth microdilution for amphotericin B, itraconazole, posaconazole, voriconazole and fluconazole. In general, all the drugs presented high MICs, voriconazole and amphotericin B being the antifungals which showed the best activity, while itraconazole, posaconazole and fluconazole showed a null activity. The results of this study provided, for the first time in Venezuela, important information about the behavior of the FSC towards commonly used antifungals. It is mandatory that physicians know the activity of these drugs in order to be able to take decisions and devise an appropriate therapeutic management.

Keywords: *Fusarium solani* Complex, *in vitro* susceptibility tests, antifungals, M38-A2 document.

* Correspondencia:
E-mail: mmpanizo@gmail.com

Introducción

El género *Fusarium* se encuentra ampliamente distribuido en el suelo, plantas y diferentes sustratos orgánicos.

Contiene actualmente más de 50 especies identificadas, de las cuales los patógenos más comunes son las especies del Complejo *Fusarium solani* (CFS) y el Complejo *F. oxysporum*, aunque otras especies del género también han

sido reconocidas como patógenas, destacándose las del Complejo *F. verticillioides* [1-5].

La presentación clínica de las infecciones causadas por *Fusarium* spp. depende, en gran parte, del estado inmune del hospedero y de la vía de entrada del hongo. Las infecciones superficiales como queratitis y onicomicosis se observan generalmente en individuos inmunocompetentes, mientras que las infecciones invasoras se presentan con más frecuencia en pacientes inmunocomprometidos y suelen tener mal pronóstico, debido a su difícil tratamiento [1,3,4,6,7].

Las queratitis causadas por el CFS se presentan con frecuencia, especialmente en climas tropicales. La escogencia del agente antifúngico para su tratamiento generalmente es empírica, y parece no existir un consenso sobre el papel de las pruebas de susceptibilidad para guiar la terapia. Estudios realizados en enfermedades sistémicas causadas por hongos dimórficos sugieren que los resultados de las pruebas de susceptibilidad a los antifúngicos y el pronóstico están relacionados, pero esta correlación parece no existir para los hongos filamentosos causantes de enfermedades oculares, ya que aunque el tratamiento que suele indicarse es tópico, algunos antimicóticos necesitan alcanzar una elevada concentración inicial en el globo ocular para alcanzar el éxito terapéutico [8,9].

Las pruebas de susceptibilidad *in vitro* a los antifúngicos constituyen una guía muy valiosa en el tratamiento de las infecciones causadas por hongos; debido a la disponibilidad de nuevos agentes antimicóticos, la escogencia de la terapia basada en el resultado de estas pruebas cada día es más importante. Aunque generalmente no predicen la respuesta terapéutica individual del paciente, si pueden ayudar a establecer una asociación entre Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) elevadas y pobre respuesta al tratamiento antifúngico. Su realización es particularmente importante en casos de queratitis causadas por hongos. En Venezuela no se han realizado investigaciones ni se conoce el comportamiento *in vitro* del CFS frente a los antifúngicos [1,8,9].

El objetivo de esta investigación fue determinar la susceptibilidad *in vitro* de aislados del CFS provenientes de úlceras corneales frente a cinco antifúngicos, que representan las alternativas terapéuticas más comúnmente utilizadas en la práctica clínica.

Materiales y métodos

Se diseñó un estudio experimental y analítico para determinar la susceptibilidad *in vitro* del CFS frente a cinco antifúngicos.

Microorganismos: Se utilizaron 30 aislados del CFS provenientes de úlceras corneales, pertenecientes a la Micoteca del Departamento de Micología del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", los cuales estaban conservados desde 1978 bajo los métodos de preservación de agua por *Castellani* y bajo capa de aceite mineral [10].

Preparación de las muestras: La recuperación de los aislamientos se realizó cultivándolos por 7 días a 28 °C en agar papa dextrosa (pulpas de papa 200 g, peptona 1 g, glucosa 20 g, agar 20 g, agua destilada 1 L; pH=5,6) y agar extracto de malta (extracto de malta 20 g, glucosa 20 g, agar 20 g, agua destilada 1 L; pH=5,6), verificándose viabilidad y pureza.

Determinación del inóculo por densitometría: Se procedió a la preparación de los inóculos siguiendo la metodología descrita por el documento M38-A2 del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), con modificaciones, de acuerdo al trabajo validado por Lage y col [11]; las suspensiones de los inóculos se ajustaron entre las lecturas de 0,5-0,7 unidades McFarland en un densitómetro (Densimat™ bioMérieux) a una longitud de onda de 550 nm. Posteriormente se realizó una dilución 1/50 con el medio de cultivo RPMI 1640 más glucosa al 2%, para obtener una suspensión de trabajo correspondiente a $0,4-5 \times 10^4$ Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/mL) [11,12].

Estudio de la susceptibilidad *in vitro* a los antifúngicos por CMI: Se siguió la metodología descrita por el documento M38-A2 del CLSI, pero utilizando el medio RPMI 1640 más glucosa al 2%, recomendado por el documento EUCAST E.Def 9.1, para asegurar el crecimiento adecuado de los hongos filamentosos en las pruebas de susceptibilidad. Se probaron los siguientes antifúngicos (en polvo, químicamente puros): anfotericina B (AB, Astella Pharma), itraconazol (IZ, Janssen-Cilag), posaconazol (POS, Schering-Plough), voriconazol (VZ, Pfizer) y fluconazol (FZ, Pfizer). Para AB, IZ, VZ y POS se utilizó como solvente dimetil sulfóxido, mientras que para FZ el solvente utilizado fue agua destilada estéril. Las concentraciones finales de las drogas estuvieron en los rangos de 0,03-16 µg/mL para AB, IZ, POS y VZ y de 0,25-128 µg/mL para FZ [11-13].

a) Lectura e interpretación de los resultados: Las placas se leyeron a las 48 horas de forma visual con ayuda de un espejo invertido. Para AB, VZ, POS, e IZ la CMI correspondió a la menor concentración del antifúngico capaz de inhibir el 100% de crecimiento del hongo. Para FZ la CMI se consideró como la menor concentración capaz de inhibir el 50% del crecimiento del hongo, comparándolo con el control de crecimiento. Debido a que no se han establecido puntos de corte para el CFS según el método M38-A2 del CLSI, los resultados fueron interpretados en términos de actividad del antifúngico. Sin embargo, existen puntos de corte microbiológicos. Estos puntos han sido propuestos por estudios multicéntricos referenciados en el documento del CLSI, y se usan sólo para propósitos analíticos. Para AB, IZ, VZ y POS los puntos de corte propuestos (en µg/mL) son: Sensible: ≤ 1 ; Intermedio: 2; Resistente: ≥ 4 . En cuanto a FZ, se considera que prácticamente todos los hongos filamentosos son resistentes a este antifúngico, con excepción de algunos hongos dimórficos y dermatofitos; las CMI deben ser ≥ 64 µg/mL. Para los fines de este trabajo,

ambas consideraciones fueron tomadas en cuenta para el análisis de los resultados [11,12].

b) *Control de calidad*: Se utilizaron las cepas *Aspergillus flavus* ATCC® 204304, *Candida krusei* ATCC® 6258 y *Candida parapsilosis* ATCC® 22019, recomendadas en el documento M38-A2 del CLSI, las cuales fueron tratadas de igual forma que los aislamientos empleados en este estudio. Para la preparación de los inóculos de *C. krusei* ATCC® 6258 y *C. parapsilosis* ATCC® 22019 se siguieron las recomendaciones del documento M27-A3 del CLSI [11,14].

Análisis de los datos: Se elaboró una base de datos en Excel y se analizaron mediante porcentajes y medidas de tendencia central: media geométrica (MG), desviación estándar (DS), moda (M), y rangos de concentración para cada antifúngico. Para el análisis de la susceptibilidad del CFS a los antifúngicos se calcularon el percentil 50 (CMI₅₀) y el percentil 90 (CMI₉₀), que representan los valores que inhiben al 50 y 90% de los aislamientos, respectivamente.

Resultados

En general, todos los antifúngicos probados presentaron CMI elevadas, siendo VZ y AB los que mostraron mejor actividad. Sólo 3 aislados (10%) exhibieron CMI de 2 µg/mL para AB, mientras que 4 (13,3%) lo hicieron para VZ; los demás antifúngicos (IZ, POS y FZ) mostraron actividad escasa o nula (Tabla 1). Los resultados correspondientes a los cálculos de MG, DS, M, rangos de CMI, CMI₅₀, CMI₉₀, distribución de las CMI por antifúngico y porcentajes de sensibilidad y resistencia, según los puntos de corte microbiológicos, se muestran en la tabla 2. AB y VZ presentaron rangos de CMI similares; la distribución de las CMI de IZ y POS fue prácticamente idéntica; sólo un aislado mostró una CMI de 1 µg/mL y 29 exhibieron una CMI ≥16 µg/mL para POS. No se calcularon rangos de concentración para IZ y FZ, ya que los 30 aislamientos del CFS mostraron CMI ≥ 16 y ≥128 µg/mL, respectivamente.

Los valores de MG de las CMI de AB y VZ fueron semejantes, en cambio, sus valores para la M se diferenciaron en una dilución (8 y 4 µg/mL, respectivamente). AB agrupó el 43,3% de los aislamientos alrededor de su M y VZ sólo agrupó el 33,3%. Tomando en cuenta los puntos de corte microbiológicos, todos los antifúngicos probados presentaron elevados porcentajes de resistencia. El antifúngico con el menor porcentaje de resistencia fue VZ (83,3%) seguido de AB (90%). La CMI de la M±1 dilución abarcó el 90% de los aislamientos para AB y el 76% para VZ (Tabla 2). Todas las cepas utilizadas para el control de calidad de las pruebas de susceptibilidad se mantuvieron dentro de los valores límites establecidos por el documento M38-A2.

Discusión

El CFS ha emergido en la última década como el segundo agente causal de infecciones oportunistas por hongos

Tabla 1. Identificación, año de conservación y valores de CMI obtenidos por el método M38-A2 del CLSI para el Complejo *Fusarium solani* (n=30).

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

CMI: concentración mínima inhibitoria; AB: anfotericina b; VZ: voriconazol; IZ: itraconazol; POS: posaconazol; FZ: fluconazol.

filamentosos. Debido a la ausencia de estudios clínicos que comparen la eficacia de los diferentes antifúngicos en las infecciones causadas por este Complejo, cobra importancia realizar pruebas de susceptibilidad *in vitro*, para conocer el comportamiento de estos hongos frente a las drogas y así proporcionar información útil como guía en la instauración

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

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

AB: anfotericina B; VZ: voriconazol; IZ: itraconazol; POS: posaconazol; FZ: fluconazol; CMI: concentración mínima inhibitoria; *CMI en µg/mL; MG: media geométrica; M: moda; CMI₅₀: concentración que inhibe el 50% de los aislamientos; CMI₉₀: concentración que inhibe el 90% de los aislamientos; ** tomando en cuenta los puntos de corte microbiológicos de estudios multicéntricos [11]; S: sensible (≤1 µg/mL); I: intermedio (2 µg/mL); R: resistente (≥4 µg/mL); □ todas las CMI fueron superiores a 64 µg/mL [11].

de una terapia adecuada y oportuna [4,8,9,15].

Un elemento esencial para estudiar un número representativo de aislamientos de este género es su adecuada preservación en una colección de cultivos y así lo han demostrado investigaciones a nivel mundial [1-3,6,7]. En este estudio todos los aislamientos procedían de muestras clínicas de úlceras corneales y se mantuvieron preservados por duplicado en agua destilada estéril según Castellani y bajo capa de aceite mineral desde el año 1978. Estos métodos han demostrado ser capaces de preservar aislamientos fúngicos de forma estable por largos periodos de tiempo, asegurando sus características macro y microscópicas, así como su viabilidad y pureza [1,2,10,16].

De acuerdo con los resultados *in vitro* obtenidos en este estudio, VZ y AB fueron las drogas más activas frente al CFS. Resultados similares han sido reportados por otros investigadores, pero existen diferencias significativas en cuanto a los rangos de CMI y MG (Tabla 3). Para Alastruey-Izquierdo *et al* [1], Azor *et al* [2], Tortorano *et al* [3] y Debourgogne *et al* [7], AB fue la droga más activa para el

CFS, seguido de VZ. Para Oechsler *et al* [9], AB fue la droga más activa, seguida de natamicina y VZ. Los resultados de este estudio son similares a los de Papithou *et al* [17] y Córdoba *et al* [18], con rangos y MG muy semejantes, siendo VZ la droga más activa, seguida de AB. Lewis *et al* [19], sin embargo, obtuvieron resultados muy diferentes, ya que AB y VZ no presentaron actividad frente al CFS. Todos los investigadores citados anteriormente han reportado resultados semejantes para IZ, POS y FZ, obteniendo escasa o nula actividad frente a este Complejo [1-3,7,8,17-19].

Estos resultados ponen en evidencia la variabilidad que presenta el CFS en su respuesta frente a las drogas antifúngicas. Zhang *et al* [20], demostraron que existen al menos 45 especies filogenéticas dentro del Complejo, mientras que en otra investigación se ha reportado la existencia de al menos 21 de interés netamente clínico [5]. Aunque en este estudio no se planteó como objetivo realizar el análisis molecular de este Complejo, según la literatura revisada, las diferencias encontradas son independientes del tipo de muestra donde se aisló el hongo, pero pudiesen

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

Referencias	Anfotericina B		Voriconazol		Itraconazol		Posaconazol		Fluconazol	
	R	MG	R	MG	R	MG	R	MG	R	MG
Alastruey-Izquierdo <i>et al</i> [1]	0,5 - 8	1,33	4 - 16	14	16	16	16	16	ND	ND
Azor <i>et al</i> [2]	1 - 8	NC	4 - 32	NC	32	NC	32	NC	128	NC
Tortorano <i>et al</i> [3]	0,25 - 2	1,25	1 - ≥ 16	9,21	≥ 16	≥ 16	1 - ≥ 16	15,21	ND	ND
Debourgogne <i>et al</i> [7]	0,125 - 2	1,2	1 - 16	4,6	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Lewis <i>et al</i> [19]	16	NC	16	NC	≥ 32	NC	ND	ND	ND	ND
Papithou <i>et al</i> [17]	2 - ≥16	14,8	1 - 8	5,8	ND	ND	4 - ≥ 16	25,3	> 64	128
Córdoba <i>et al</i> [18]	1 - 16	NC	4 - 16	NC	≥ 16	NC	ND	ND	ND	ND
Gajjar <i>et al</i> [8]	1 - 32	6,3	ND	ND	64 - 128	113,7	ND	ND	≥ 128	128
Oechsler <i>et al</i> [9]	0,003 - 4	1*	1 - 16	8*	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Este estudio	2 - ≥ 16	5,8	1 - ≥ 16	5,7	≥ 16	16	1 - ≥16	14,6	≥ 128	128

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

existir diferencias de tipo geográfico. Hasta el presente no se ha documentado la existencia de variaciones en la susceptibilidad antifúngica entre las especies filogenéticas [2,21]

Debido a que el documento M38-A2 no ha establecido puntos de corte para la lectura e interpretación de las CMI para hongos filamentosos, los resultados de este estudio se compararon con los puntos de corte microbiológicos propuestos en estudios multicéntricos, los cuales se encuentran citados en el mencionado documento [11]. Los elevados porcentajes de resistencia obtenidos para todos los antimicóticos son comparables a los resultados de actividad antifúngica discutidos anteriormente [1-3,7-9,17-19].

El tratamiento óptimo para las infecciones causadas por especies del género *Fusarium*, independientemente si son invasoras o superficiales y del tipo de paciente involucrado, es incierto. Se ha demostrado que *F. solani* tiene la capacidad de formar biopelículas en mayor proporción que las otras especies del CFS, haciéndolo más resistente a los antifúngicos que sus contrapartes planctónicas. Se ha reportado que este género, particularmente el CFS, es resistente a las equinocandinas, aunque la susceptibilidad a AB, VZ y POS puede ser variable [1,2,9,15,17]. Comúnmente se ha usado AB liposomal como terapia única o en combinación con azoles, sin embargo, se ha demostrado que la biopelícula formada por *F. solani* posee una susceptibilidad reducida a los antifúngicos, principalmente a AB, lo cual explica en parte los resultados desfavorables obtenidos con esta especie en comparación con otras del género. Por otra parte, el uso de VZ como agente terapéutico en infecciones causadas por *Fusarium* spp. fue aprobado en el año 2002, pero, la experiencia clínica reportada hasta el momento es dispersa y limitada [6,9,22].

Para las queratitis y/o endoftalmitis causadas por *Fusarium* spp. se recomienda tratamiento tópico y las drogas de elección son la natamicina y la AB, pertenecientes a la familia de los polienos. Otro tratamiento recomendado es el uso tópico y sistémico de VZ, cuando este antifúngico presenta rangos de CMI entre 1 - ≥ 8 $\mu\text{g/mL}$, aunque se requieren altas concentraciones de esta droga en el humor acuoso para asegurar su eficacia [22-24]. El rango para VZ reportado en este estudio es similar al de los trabajos citados anteriormente (1 - ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$).

Se ha descrito una asociación entre altas CMI de natamicina y el tratamiento con queratoplastia debido a perforación corneal. Un estudio reciente mostró que cepas de *Fusarium* spp. con elevadas CMI para natamicina y VZ se asociaron con un incremento de la perforación de córnea, debido a falla terapéutica. Estos datos corroboran que la realización de las pruebas de susceptibilidad antifúngica es importante para guiar el tratamiento en estos casos. Por otra parte, estudios previos han demostrado que cepas de este género con bajas CMI se correlacionaron con mejores resultados, debido a la rápida epitelización que suele ocurrir en estos casos. Los aislados de *Fusarium* spp. que presentan altas CMI frente a los antifúngicos son más difíciles de tratar y responden lentamente al tratamiento. Adicionalmente, la

pobre penetración de estas drogas al estroma corneal es una limitación para la rápida eliminación de la infección. Todos estos factores afectan la farmacodinamia, impidiendo el alcance de óptimos niveles terapéuticos, con resultados clínicos desalentadores [9,25].

La terapia de rescate con POS o la combinación de AB liposomal más VZ también ha sido usada con buena respuesta terapéutica [26]. No hay estudios disponibles que correlacionen resultados de pruebas de susceptibilidad con éxito o falla terapéutica para VZ y POS. En el caso de AB se ha reportado que una CMI por encima de 2 $\mu\text{g/mL}$ está asociada a falla terapéutica. Para estos antifúngicos no se puede predecir con exactitud el éxito o fracaso del tratamiento basado sólo en los resultados de las pruebas de susceptibilidad por razones ampliamente explicadas en párrafos anteriores [1,2,15,17].

Otros antifúngicos empleados en el tratamiento de las queratitis son el IZ y FZ. El IZ se usa en forma tópica o sistémica, pero debido a reportes que han demostrado su pobre actividad *in vitro* frente a *Fusarium* spp., sólo se recomienda su uso en presentaciones no complicadas de esta infección; CMI mayores a 8 $\mu\text{g/mL}$ están asociadas a fracaso terapéutico. Caso similar ocurre con FZ, que se usa en forma tópica y oral; tiene una excelente penetración a nivel intraocular, pero no es activo frente a hongos filamentosos, por lo que no debe ser considerado como droga de elección. Se han reportado casos de falla terapéutica en el tratamiento de queratitis por *Fusarium* spp. y usualmente la CMI obtenida en las pruebas de susceptibilidad es ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$ [16,22,27,28].

Para concluir, las drogas más activas *in vitro* frente al CFS en este estudio fueron VOR y AB, mientras que IZ, POS y FZ exhibieron escasa o nula actividad frente al Complejo. La variabilidad de resultados observados en este estudio fue similar a la reportada en la literatura a nivel mundial. Los resultados de este estudio aportaron información importante sobre el comportamiento del CFS frente a los antifúngicos de uso común en la práctica clínica por primera vez en Venezuela. La realización de las pruebas de susceptibilidad, utilizando el método M38-A2, resulta muy laboriosa para ser implementada en los laboratorios de rutina de microbiología, por lo que se recomienda su uso en laboratorios de referencia con fines de investigación y/o para estudios epidemiológicos. Es imprescindible que el médico conozca la actividad de estas drogas para poder tomar decisiones y orientar una conducta terapéutica adecuada.

Referencias

1. Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Monzón A, Mellado E, Rodríguez-Tudela JL. Antifungal susceptibility profile of clinical *Fusarium* spp. isolates identified by molecular methods. J Antimicrob Chem. 2008; 61:805-9.
2. Azor M, Gené J, Cano J, Guarro J. Universal *in vitro* antifungal resistance of genetic clades of the *Fusarium solani* species complex. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51:1500-3.
3. Tortorano AM, Prigitano A, Dho G, Esposito MC, Gianni C,

- Grancini A *et al.* Species distribution and *in vitro* antifungal susceptibility patterns of 75 clinical isolates of *Fusarium* spp. from Northern Italy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52:2683-5.
4. Garnica M, Nucci M. Epidemiology of fusariosis. *Curr Fungal Infect Rep.* 2013; 7:301-5.
5. Guarro J. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012; 30:33-9.
6. Lortholary O, Obenga G, Biswas P, Caillot D, Chachaty E, Bienvenu AL *et al.* International retrospective analysis of 73 cases of invasive fusariosis treated with voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54:4446-50.
7. Debourgogne A, de Hoog S, Lozniewski A, Machouart M. Amphotericin B and voriconazole susceptibility profiles for the *Fusarium solani* species complex: comparison between the E-test and CLSI M38-A2 microdilution methodology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012; 31:615-8.
8. Gajjar DU, Pal AK, Ghodadra BK, Vasavada AR. Microscopic evaluation, molecular identification, antifungal susceptibility, and clinical outcomes in *Fusarium*, *Aspergillus*, and dematiaceous keratitis. *Biomed Res Int.* 2013; 2013:605308. Disponible en: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/605308/abs/>. Consultado: 18 julio 2014.
9. Oechsler RA, Yamanaka TM, Bispo PJM, Sartori J, Zorat Yu MC, Melo ASA *et al.* *Fusarium* keratitis in Brazil: genotyping, *in vitro* susceptibilities, and clinical outcome. *Clin Ophthalmol.* 2013; 7:1693-701.
10. Panizo M, Reviakina V, Montes W, González G. Mantenimiento y preservación de hongos en agua destilada y aceite mineral. *Rev Soc Ven Microbiol.* 2005; 25:35-40.
11. Lage L, Panizo MM, Ferrara G, Reviakina V. Validación del inóculo por densitometría para las pruebas de susceptibilidad a los antifúngicos en *Fusarium* spp. *Rev Soc Ven Microbiol.* 2013; 33:46-52.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard. Second edition. CLSI document M38-A2. Vol. 28 No. 16. Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, Pennsylvania: 2008.
13. Rodríguez-Tudela JL, Arendrup MC, Arikan S, Barchiesi F, Bille J, Chrysanthou E *et al.* EUCAST Technical Note on the method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia-forming moulds. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14:982-4.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard. Third edition. CLSI document M27-A3. Vol. 28 No. 14. Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, Pennsylvania: 2008.
15. Chen SCA, Geoffrey Playford E, Sorrel TC. Antifungal therapy in invasive fungal infections. *Curr Opin Pharmacol.* 2010; 10:1-9.
16. Sabatelli F, Patel R, Mann PA, Mendrick CA, Norris CC, Hare R *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; 50:2009-15.
17. Paphitou NI, Ostrozky-Zeichner L, Paetznick VL, Rodríguez JR, Chen E, Rex JH. *In vitro* activities of investigational triazoles against *Fusarium* species: effects of inoculum size and incubation time on broth microdilution susceptibility test results. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46:3298-300.
18. Córdoba S, Rodero L, Vivot W, Abrantes R, Davel G, Vitale RG. *In vitro* interactions of antifungal agents against clinical isolates of *Fusarium* spp. *Int J Antimicrob Agents.* 2008; 31:171-4.
19. Lewis RE, Wiederhold NP, Klepser ME. *In vitro* pharmacodynamics of amphotericin b, itraconazole, and voriconazole against *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Scedosporium* spp. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49:945-51.
20. Zhang N, O'Donnell K, Sutton DA, Nalim FA, Summerbell RC, Padhye AA, Geiser DM. Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment. *J Clin Microbiol.* 2006; 44:2186-90.
21. O'Donnell K, Sutton DA, Fothergill A, McCarthy D, Rinaldi MG, Brandt ME *et al.* Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and *in vitro* antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. *J Clin Microbiol.* 2008; 46:2477-90.
22. Ansari Z, Miller D, Galor A. Current thoughts in fungal keratitis: diagnosis and treatment. *Curr Fungal Infect Rep.* 2013; 7:209-18.
23. Klont RR, Eggink CA, Rijs A, Wesseling P, Verwiej PE. Successful treatment of *Fusarium* keratitis with cornea transplantation and topical and systemic voriconazole. *Clin Infect Dis.* 2005; 40:e110-2.
24. Scott LJ, Simpson D. Voriconazole: a review of its use in the management of invasive fungal infections. *Drugs.* 2007; 67:269-78.
25. Lalitha P, Prajna NV, Oldenburg CE, Srinivasan M, Krishnan T, Mascarenhas J *et al.* Organism, minimum inhibitory concentration, and outcome in a fungal corneal ulcer clinical trial. *Cornea.* 2012; 31:662-7.
26. Tu EY, McCartney DL, Beatty RE, Springer K, Levy J, Edward D. Successful treatment of resistant ocular fusariosis with posaconazole (SCH-56592). *Am J Ophthalmol.* 2007; 143:222-7.
27. Thomas PA, Abraham DJ, Kalavathy CM, Rajasekaran J. Oral itraconazole therapy for mycotic keratitis. *Mycoses.* 1988; 31:271-9.
28. Rao SK, Madhavan HN, Rao G, Padmanabhan P. Fluconazole in filamentous fungal keratitis. *Cornea.* 1997; 16:700.