



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES**



“Identificación y caracterización de la resistencia a  
antifúngicos de cuatro patógenos oculares en humanos  
pertenecientes al género *Fusarium* sp.”

TESIS INDIVIDUAL

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**LICENCIADA EN BIOLOGÍA**

PRESENTA

ARIADNA ANDREA MEDINA TÉLLEZ

DIRIGIDA POR

Dra. ROSA PAULINA CALVILLO MEDINA

Santiago de Querétaro, Querétaro, mayo, 2021



**Universidad Autónoma de Querétaro**



**Facultad de Ciencias Naturales**

Identificación y caracterización de la resistencia a antifúngicos de cuatro patógenos  
oculares en humanos pertenecientes al género *Fusarium sp.*

**TESIS INDIVIDUAL**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

**Licenciado en Biología**

**Presenta:**

Ariadna Andrea Medina Téllez.

**Dirigido por:**

Dra. Rosa Paulina Calvillo Medina.

Dra. Rosa Paulina Calvillo Medina

Director

Dr. Juan Campos Guillén

Asesor

Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez

Asesor

Dr. Víctor Manuel Bautista de Lucio

Asesor

## Resumen

Los hongos filamentosos han desarrollado estrategias adaptativas para colonizar diferentes ambientes mediante factores de virulencia. Los cuales les permiten causar infecciones en seres humanos. Las infecciones pueden ser causadas en personas sanas (queratitis, onicomicosis). Sin embargo, cada vez se describen más infecciones graves en pacientes inmunodeprimidos. Aunado a esto la resistencia a antifúngicos es cada vez más común en hongos. El objetivo de este trabajo fue aislar, identificar cuatro aislados oculares del género *Fusarium sp*, así como determinar su resistencia a tres antifúngicos usados en humanos. Las muestras fueron obtenidas de úlceras corneales humanas y cultivadas en agar Dextrosa Sabouraud (SDA), Se identificaron mediante morfología, métodos moleculares, amplificando (PCR) el fragmento intergénico ITS, la subunidad mayor ribosomal y el factor de alargamiento de polimerasa e inferencia filogenética de máxima verosimilitud. Por último, se caracterizó la resistencia de los hongos a tres antifúngicos en diferentes tiempo y concentraciones. Los resultados mostraron que los aislados pertenecen al género *Neocosmospora*. El cual es muy cercano filogenéticamente a *Fusarium* con características fenotípicas muy similares. También demostramos que tres de los cuatro aislados son una nueva especie y que todos los aislado muestran mayor resistencia al Itraconazol y mayor susceptibilidad a la anfotericina. Es necesario realizar más estudios sobre infecciones micóticas para comprender la biología de los hongos patógenos, realizar su correcta identificación y caracterizar su susceptibilidad a antifúngicos usados en la terapia en humanos.

**Palabras clave:** Patógenos fúngicos oculares, identificación fúngica, resistencia a antifúngicos.

## Abstract

Filamentous fungi have developed adaptive strategies to colonize different environments through virulence factors. Which allow them to cause infections in humans. Infections can be caused in healthy people (keratitis, onychomycosis). However, more and more serious infections are being described in immunosuppressed patients. In addition to this, antifungal resistance is increasingly common in fungi. The objective of this work was to isolate, identify four ocular isolates of the genus *Fusarium* sp, as well as determine their resistance to three antifungals used in humans. The samples were obtained from human corneal ulcers and cultured on Sabouraud Dextrose Agar (SDA), Seron using morphology, molecular methods, amplifying (PCR) the intergenic ITS fragment, the major ribosomal subunit and the polymerase elongation factor and maximum phylogenetic inference. verisimilitude. Finally, the resistance of the fungi to three antifungals was characterized at different times and concentrations. The results show that they belong to the genus *Neocosmospora*. Which is phylogenetically very close to *Fusarium* with very similar phenotypic characteristics. We also show that three of the four isolates are a new species and that all isolates show greater resistance to Itraconazole and greater susceptibility to amphotericin. Further studies on fungal infections are necessary to understand the biology of pathogenic fungi, make their correct identification and characterize their susceptibility to antifungals used in human therapy.

**Key words:** Ocular fungal pathogens, fungal identification, antifungal resistance.

## Comité tutorial

Directora:

Dra. Rosa Paulina Calvillo Medina.

Asesores:

Dr. Juan Campos Guillén.

Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez.

Dr. Victor Manuel Bautista de Lucio.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

## Agradecimientos

A mi madre Ana Beda Téllez Jiménez, por el amor, apoyo, confianza, prácticamente por todo, pues sin ella no soy nadie.

A mi padre Andrés Medina Ramos, por la fuerza, por inculcarme el carácter, la obstinación para seguir luchando a pesar de la adversidad y por esas ganas con las que ama día con día a la mujer en la que me he convertido.

A mi hermana Alejandra Medina Téllez, por brindarme apoyo con las cosas que se me dificultan, la confianza y amor incondicional.

A mi hermana Brenda Jimena Maya Téllez, por ser mi mayor ejemplo a seguir, tanto como hermana, hija, hermana y ahora como madre.

A Fernando Francisco Solís quien tengo un apoyo incondicional, cariño y lealtad.

A Salvador Larios Montoya quien me apoyo en todo mi proceso de la carrera, siempre estuvo conmigo y por mostrarme que, si uno quiere, lo logra en grande.

A la Dra Rosa Paulina Calvillo Medina por enseñarme la pasión hacia los hongos y la maravilla que es el reino Fungi y por generar esa importancia que tienen hoy en día para mí.

A mis asesores de tesis por las correcciones de la tesis, generar confianza y el conocimiento.

A la Universidad Autónoma de Querétaro.

## Índice

1.Introducción.....	1
2.Antecedentes.....	3
2.1 Los hongos como patógenos.....	3
2.2 Patología causada por hongos filamentosos a nivel ocular.....	4
2.3 Factores de virulencia fúngicos y la biopelícula en hongos.....	5
2.4 Las características, la patología de <i>Fusarium</i> y géneros asociados.....	7
3.Justificación.....	9
4.Hipótesis.....	10
5.Objetivos.....	10
5.1 Objetivos generales.....	10
5.2 Objetivos particulares.....	10
6.Metodología.....	11
6.1 Material biológico.....	11
6.2 Crecimiento de microorganismos.....	11
6.3 Conservación de las cepas.....	12
6.4 Identificación fenotípica (macro y microscópica).....	12
6.5 Identificación molecular.....	13
6.5.1 Extracción de ADN genómico.....	13
6.5.2 Electroforesis en gel de agarosa al 1%.....	14

6.5.3 Identificación molecular del aislado fúngico mediante la amplificación del fragmento ITS1-5.8S rDNA-ITS2, la subunidad mayor ribosomal(LSU) y el factor de alargamiento alfa (EF1 $\alpha$ ) .....	14
6.5.4 Inferencia filogenética.....	16
6.6 Susceptibilidad fúngica .....	16
6.7. Actividad hemolítica.....	17
7. Resultados.....	18
7.1 Casos clínicos.....	18
7.2 Identificación de aislados fúngicos.....	29
7.2.1 Análisis morfológico .....	29
7.2.2 Análisis filogenéticos.....	34
7.3 Ensayo antifúngicos.....	39
7.4 Actividad hemolítica.....	41
8. Discusión .....	43
9. Conclusión .....	49
10. Bibliografía.....	50
11. Apéndices .....	54
11.1 Apéndice 1.....	54
11.2 Apéndice 2 .....	60
11.3 Apéndice 3.....	61



# 1 Introducción

Los hongos tienen un papel importante en la ecología del planeta, en la vida de los seres humanos, así como en su hábitat natural. Tienen un papel fundamental en los procesos ecológicos, como simbioses, parásitos o descomponedores de materia orgánica e inorgánica. Pero también, pueden ser patógenos de plantas generando pérdidas millonarias en los cultivos, o causar infecciones superficiales (queratitis), así como, profundas en humanos, las cuales pueden ser invasivas y letales. En el humano principalmente producen enfermedades como la candidiasis y la tiña de los pies (Kniemeyer, 2011).

Los hongos son eucariontes, entre sus características fundamentales cuentan con una pared celular compuesta principalmente de quitina (al menos en alguna etapa de su ciclo vital), su nutrición es por absorción (quimioorganótrofos) de materia orgánica muerta (saprobios), o de materia orgánica viva (como simbioses o parásitos), tienen talo o micelio y no presentan clorofila. El talo está constituido por hifas (hifomicetos u hongos filamentosos) o por estructuras unicelulares (hongos levaduriformes o blastomicetos); estas últimas se producen por gemación. Estos microorganismos presentan hifas de sustrato e hifas aéreas, con esporangios; dichas hifas pueden ser hialinas (hialofimomicetos) o pigmentadas (feohifomicetos).

En general presentan ciclos de vida complejos y su crecimiento puede ser sésil (adherido al sustrato) o planctónico (libre en el medio) (Arenas, 2008).

Su taxonomía es compleja, en épocas pasadas se agrupaban taxonómicamente por sus características morfológicas y sus estructuras de reproducción. Hoy en día, para la taxonomía se utilizan métodos moleculares y bioquímicos (Seyedmousavi et al. 2014).

La familia *Nectriaceae* en la que se incluyen *Fusarium* y *Neocosmospora* es cosmopolita pues, se observan en distintos sitios como el suelo, el agua, el aire, el material vegetal vivo o muerto, los alimentos y muchos más sustratos. Algunas especies son de gran importancia pues son productores de micotoxinas el cual afecta la salud humana y animales, tal es el caso de los géneros *Fusarium* y *Neocosmospora* (Gräfenhan et al.2011, Lombard et al. 2015).

Los integrantes de estos géneros poseen caracteres morfológicas macro y microscópicos similares. En la actualidad están relacionados con infecciones oportunistas superficiales y sistémicas en personas inmunocompetentes, en donde se han reportado casos de onicomycosis, queratitis y fusariosis invasiva. Sin embargo, existen diferencias en el tratamiento que debe de ser usado en seres humanos de acuerdo a cada uno de estos géneros (Diepeningen et. al 2014). De tal modo que es importante el estudio de estas especies, si correcta categorización y la resistencia de los antifúngicos, pues en la actualidad existe una problemática causada por estos hongos.

## 2 Antecedentes

### 2.1 Los hongos como patógenos.

En la actualidad existe una mayor información sobre los hongos como patógenos, creando un mejor conocimiento acerca de estos. (Guarro, 2012). Los avances en la tecnología y en las terapias médicas han permitido extender la vida de los pacientes en hospitales (Tang et al., 2015). Estos avances desafortunadamente también han promovido el establecimiento de una gran variedad de enfermedades crónicas como las micosis y otros padecimientos en pacientes inmunocomprometidos, hospitalizados y severamente enfermos (Köhler et al. 2015).

En individuos sanos el sistema inmune es capaz de mantener en equilibrio o prevenir la infección causada por hongos. (Shobana et al., 2014). Algunos de estos microorganismos son parte de la microbiota humana, son comensales de plantas y de animales o intervienen en la ecología de los suelos; sin embargo, este equilibrio es delicado y si se rompe, puede derivar en patologías complejas (Tang et al. 2015). Las patologías causadas por hongos, sobre todo en pacientes inmunodeficientes, son por lo general, severas, se diseminan de forma rápida, son difíciles de erradicar (Loussert et al. 2010).

Existen hongos patógenos oportunistas que se asocian principalmente con procesos de inmunosupresión, de trasplantes de órganos y de médula espinal (Jabra-Rizk *et al.*, 2004). Muchos pacientes inmunosuprimidos acuden a los

hospitales debido a infecciones fúngicas incluidas entre ellas las infecciones superficiales con la queratitis (Eswarappa et al. 2015).

## **2.2 Patología causada por hongos filamentosos a nivel ocular**

En el caso de la queratitis (queratomicosis), se encuentran dentro de las primeras cuatro causas de ceguera en el mundo, el 50% se asocia a un clima tropical o subtropical. La queratomicosis genera úlceras corneales que producen disminución o pérdida de la visión, ojos rojos, dolor ocular y secreción (Castellanos-Franco et al. 2017). En algunas ocasiones los pacientes son asintomáticos, pero la escasa información sobre este tema ha provocado que este problema sea cada vez más frecuente. Sin embargo, también puede influir un mal diagnóstico médico, por la incorrecta identificación del agente etiológico y por un tratamiento antifúngico erróneo, el cual no es eficiente en un 60% de los casos (Kredics et al. 2015). Se han descrito alrededor de 105 especies de hongos causantes de este padecimiento (Manikandan et al. 2013).

La incidencia de queratitis infecciosa en Estados Unidos es de 11-28 por 100.000 habitantes al año. (Castellanos-Franco et al. 2017). El principal causante de esta infección es el género *Fusarium*, particularmente la especie *Fusarium solani* con un 65% de casos. Sin embargo, también puede ser producidas por otros hongos como *Neocosmospora*, *Aspergillus*, *Candida*, *Neoscytalidium*, *Bipolaris* y *Acremonium*. Todos estos hongos generan factores de virulencia que les ayudan en el establecimiento de infecciones oculares (Kredics et al. 2015).

### **2.3 Factores de virulencia fúngicos y la biopelícula en hongos.**

Los factores de virulencia son moléculas, enzimas generadas por patógenos que permiten la colonización del huésped y promueven la patogénesis (por ejemplo, la hemólisis de glóbulos rojos). La hemólisis de tipo alfa es una hemólisis incompleta, caracterizada por la destrucción parcial de la membrana de los eritrocitos y pérdida de algo de hemoglobina en el agar. A simple vista este tipo de hemólisis se detecta por la aparición de una coloración verdosa alrededor de la colonia. La beta-hemólisis se caracteriza por la destrucción total de la membrana por lo que se detecta por la aparición de un halo transparente alrededor de la colonia. Cuando los microorganismos no producen ningún tipo de hemólisis se dice que son gamma-hemolíticos (Villanueva, 2019). Los hongos que causan la queratitis presentan factores de virulencia que les permiten colonizar este órgano. Estos factores pueden ser enzimas hidrolíticas (queratinasa, proteasas, colagenasas y quitinasas; toxinas, como paecilotoxina y metabolitos secundarios) (Stone., 2014)

Entre las principales características que le dan la capacidad de infectar a seres humanos y de resistir antifúngicos usados en la terapia, se encuentra la formación de matrices extracelulares o biopelículas. Dicha estructura es importante para la protección a las comunidades microbianas y contribuye a la virulencia de los patógenos humanos y a su resistencia a los fármacos (Robbins et al. 2011). También permite que los microorganismos se adhieran a los tejidos de los hospederos infectados y se incrusten en la matriz extracelular (MEC) (Donlan et al. 2002).

La biopelícula es una estructura que tienen la capacidad para adaptarse y facilitar la virulencia de hongos patógenos (Calvillo-Medina et al. 2019). Una matriz extracelular es un ecosistema microbiano organizado y formado por uno o más microorganismos que están en una matriz extracelular de biopolímeros, con elementos inorgánicos y abióticos que les confieren adherencia y protección a dichos microorganismos (Donlan et al. 2002). El crecimiento de esta es un proceso natural y común de los microorganismos fúngicos. Los hongos se adhieren al sustrato para obtener nutrientes, secretar enzimas y desarrollar hifas apicales. La adherencia puede ser considerada como un proceso metabólico de adaptación al medio (Villena et al. 2007).

Si bien los antifúngicos usados en la terapia han mostrado eficiencia ante cierto tipo de micosis. En la actualidad la resistencia a estos fármacos es cada vez más frecuente. Se han documentado *in vivo* e *in vitro* que varios hongos aislados de humanos, entre ellos *Fusarium* sp. y géneros relacionados como *Neocosmospora* son resistentes a antifúngicos convencionales como polienos (amfotericina B), azoles (fluconazol e itraconazol) y equinocandinas (caspofungina) (Corzo-Leon, D.E et al. 2014). Todos los antifúngicos mencionados aquí son usados en la terapia contra hongos en humanos, siendo los azoles los más utilizados en hospitales públicos de México contra la infección diseminada y localizada como la queratitis causada por *Fusarium* (Calvillo-Medina et al. 2018). El género *Neocosmospora* (como el complejo de especies de '*Fusarium*' *solani*, FSSC) ha sido un grupo de hongos que se describió hace más de 100 años. Entre los integrantes de este género hay importantes especies patógenas para el humano, así como

fitopatógenas, incluidos agentes de pudrición de frutos, pudrición de raíces y amortiguación de plántulas, afectando a diversas plantas hospedadoras (Leslie et al. 2006, Nalim et al. 2011). **2.4 Las características, la patología de *Fusarium* y géneros asociados**

*Fusarium* y sus géneros relacionados como *Neocosmospora* son hongos de distribución global (Mozón et al. 2020). Son hongos saprobios común del suelo, fitopatógenos; comprende más de 100 especies (Alastruey-Izquierdo et al. 2008). Generan hifas hialinas, septadas, que miden de 3-8  $\mu\text{m}$ ; produce macroconidios y microconidios. El color que desarrollan depende de la especie y puede ser blanquecino, crema, anaranjado, rosa, rojizo, púrpura, etc. Estas coloraciones también pueden variar según los diferentes medios de cultivo. El micelio aéreo suele ser abundante y de aspecto algodonoso. La velocidad de crecimiento, la morfología y la pigmentación de la colonia son datos importantes para la identificación (Dignani et al. 2004).

En la actualidad, se tiene más información sobre micosis por este hongo, por ende, se han descrito más casos, especialmente en pacientes con alteraciones de la respuesta inmune, diabéticos, quemados, con heridas abiertas y contaminadas con tierra, con trastornos inmunológicos o con tratamiento de inmunosupresores. Pero también se han detectado concentraciones elevadas de anticuerpos frente a polisacáridos extracelulares en personas sanas, lo que sugiere considerar que existe un contacto frecuente con el hongo (Corzo-Leon et al. 2014).

En la mayoría de las infecciones van a influir el estado inmunológico de la persona, pero en otras ocasiones existen otros factores de virulencia, como la producción de

toxinas y enzimas, que va a tener que ver con el desarrollo de estas infecciones. Uno de los factores más estudiados es la capacidad para adherirse al material plástico, como catéteres y lentes de contacto. El hongo se adhiere a los catéteres, pero no invade la pared de éstos (Calvillo-Medina et al. 2019). Por el contrario, *Fusarium* tiene la capacidad para formar y crecer como biopelícula pues se adhieren, penetran y proliferan dentro de los lentes de contacto. Tanto los macrófagos como los leucocitos polimorfonucleares juegan un papel esencial en la eliminación de estos microorganismos. Así, los polimorfonucleares inhiben el crecimiento de las hifas, mientras que los macrófagos también son capaces de impedir la germinación de las conidias (Mozón et al. 2020).

En los últimos años, *Fusarium* y *Neocosmospora* se han asociado frecuentemente con infecciones en humanos. Es el segundo hongo filamentoso más común en infecciones humanas. La fusariosis ya sea sistémica o localizada (como la queratitis) cada vez resulta más difícil de erradicar. Siendo el complejo de especies de *Fusarium solani* (FSCE), *Neocosmospora solani* y el complejo de especies de *Fusarium oxysporum* (FOCE) las especies más comunes identificadas como agentes etiológicos en humanos (Calvillo-Medina et al. 2019).

### 3 Justificación

En la actualidad tenemos mayor acceso a la información, debido a las herramientas que se tienen, como es la tecnología y la investigación, generando mayor conocimiento. Sin embargo, no en todos los sitios ocurre de la misma forma, puesto que en algunos países invierten más en ciencia que en otros, ocasionando estragos en los estudios. Tal es el caso de las infecciones fúngicas oportunistas en México,



las cuales, en los últimos años han incrementado, causando actualmente una alta tasa de infecciones asociadas a la asistencia en la salud. Estas patologías pueden ser severas para personas inmunodeficientes, se diseminan de forma rápida, son difíciles de erradicar y de identificar por métodos convencionales.

Entre los hongos oportunistas más frecuentemente identificados, está el género *Fusarium* y *Neocosmospora*, los cuales comprenden una distribución global, son saprobios y con gran importancia económica ya que son habituales fitopatógenos. En humanos pueden causar infecciones oportunistas sistémicas y localizadas, como la queratitis. Sin embargo, se cuenta con poca información sobre los factores de virulencia involucrados en la patología de estos microorganismos. Así como de su capacidad de resistir antifúngicos usados en la terapia en humanos. Se tiene cierta evidencia acerca de la formación de biopelícula como un mecanismo de tolerancia a antifúngicos. Por lo tanto, se requiere identificar de manera precisa y conocer su capacidad de tolerancia a antifúngicos, para ayudar a esclarecer la relación hospedero-patógeno entre humanos y hongos causantes de queratitis.

#### **4 Hipótesis.**

Si los cuatro aislados oculares se logran identificar hasta nivel de especie y se caracteriza su resistencia a antifúngicos, se podrá conocer la identidad fúngica de forma correcta así como la resistencia y susceptibilidad a los fármacos usados en la terapia en humanos.

#### **5 Objetivos.**

## 5.1 Objetivos generales

Aislar, identificar y caracterizar la resistencia a antifúngicos de cuatro patógenos oculares en humanos pertenecientes al género *Fusarium* sp.

## 5.2 Objetivos particulares

1. Analizar, cuatro casos clínicos y las características de los pacientes portadores de infecciones fúngicas oculares
2. Aislar e identificar a nivel de especie por métodos fenotípicos y genotípicos (usando tres marcadores moleculares) cuatro aislados clínicos de *Fusarium* sp.
3. Realizar un análisis de inferencia filogenética de máxima verosimilitud para categorizar a los aislados oculares a nivel de especie.
4. Determinar la hemólisis (como posible factor de virulencia) y analizar la susceptibilidad/tolerancia a tres antifúngicos de los aislados fúngicos, así como su hemólisis.
5. Crear conocimiento e interés sobre *Fusarium* sp.

## 6 Metodología

### 6.1 Material biológico

Se utilizaron cuatro aislados de pacientes con queratitis fúngica, los cuales fueron proporcionados bajo la aprobación del departamento de Microbiología y Proteómica Ocular del Instituto de Oftalmología Fundación de Asistencia Privada “Conde de Valenciana IAP” Ciudad de México. El Comité de Ética e Investigación del Hospital

Instituto de Oftalmología Fundación de Asistencia Privada “Conde de Valenciana IAP” aprobó la implementación de este estudio en el Laboratorio de Microbiología y Proteómica Ocular bajo la responsabilidad del jefe de laboratorio Dr. Víctor Manuel Bautista de Lucio y del hospital. Se apegaron las técnicas a la NOM-024-SSA3-2012 que fue seguida en todo momento.

Todos los residuos peligrosos biológicos infecciosos (RPBI) se procesaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-1995 y a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Todos los experimentos que se realizaron en este trabajo se llevaron a cabo de acuerdo con el manual de “Las buenas prácticas de laboratorio” establecido por la Food and Drug Administration (FDA) y La Agencia de Protección Ambiental (EPA).

## **6.2 Crecimiento de microorganismos**

Los hongos, se cultivaron en SDA, que contenía por cada 1000 mL de agua: 15 g de agar, 40 g de glucosa, 5 g peptona de carne y 5 g peptona de caseína, se ajustará a un pH 6. Se inocularon a 28°C durante 96h (Alastruey-Izquierdo et al. 2008). los aislados fueron depositados en el Instituto de Oftalmología “Fundación Conde de Valenciana”, colección de cultivos de México (IOM) con el número de acceso IOM 325366- IOM 325369 (holotipo y cultivo vivo tipo ex) y en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB) Instituto Politécnico Nacional (IPN), colección de cultivos de México (isotipo).

## **6.3 Conservación de las cepas**

Los cuatro aislados clínicos de *Fusarium* sp. se almacenaron en los medios mencionados, a 4°C o en agua estéril (una asada en 5 mL) a temperatura ambiente, hasta su uso (Arenas, 2008).

#### **6.4 Identificación fenotípica (macro y microscópica)**

Se describieron las características coloniales de los hongos creciendo en SDA y PDA, se tomó en cuenta su textura, su superficie y la producción de pigmento. Para la descripción microscópica se tomó una asada del cultivo, se colocó en un portaobjetos, se tiñó con azul de algodón lactofenol, se observó en el microscopio óptico y se describió el tipo de micelio y el tipo de estructuras de reproducción asexual (Arenas, 2008).

#### **6.5 Identificación molecular**

##### 6.5.1 Extracción de ADN genómico

A partir de un cultivo en medio sólido se recuperó la biomasa con ayuda de un bisturí. Se agregaron 10 mL de nitrógeno líquido y se maceró en un mortero estéril, hasta que se obtuvo un polvo fino. Se añadió de 1 a 2mL de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) nuclear (CTAB al 2%, EDTA 50mM, Tris base 200mM, pH8.0, NaCl 2M y polivinil pirrolidona al 0.5%) y se mezcló hasta obtener una suspensión homogénea. Se dividió la suspensión en microtubos de 1.5 mL (0.5 mL en cada uno), se agregó 2 µL de RNasa (10 mg/mL) y se incubó a 65°C por 1 hora. Se dejó que la muestra alcanzara la temperatura ambiente. Posteriormente, se

adicionó un volumen (500  $\mu$ L) de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló en un vortex hasta formar una emulsión. Se centrifugó a 13000 g a temperatura ambiente por 10 minutos y se transfirió la fase acuosa a otro tubo. Se adicionaron 1/10 de volumen de CTAB al 10 % (CTAB al 10% y NaCl 0.7 M) y se hicieron tres extracciones con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), para conservar la fase acuosa. El sobrenadante se transfirió a un microtubo limpio, se añadió un volumen de isopropanol, se mezcló por inversión y se mantuvo a -20°C toda la noche. El DNA se recuperó por centrifugación a 13000 g por 10 minutos a 4°C. La pastilla se lavó con el etanol al 70% dos veces y se centrifugó a 13000 g por 10 minutos a 4°C, el sobrenadante se desechó y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente. El DNA se resuspendió en 50 $\mu$ L de agua desionizada estéril. Se determinó la calidad del DNA y se realizó una electroforesis en gel de agarosa (el método se describe posteriormente) (Alastruey-Izquierdo et al. 2008).

#### 6.5.2 Electroforesis en gel de agarosa al 1%

Se preparó una solución de corrimiento de TAE al 1X (TRIS 40mM, ácido acético 11.42 mL/l y EDTA 2mM), se disolvió en 1 gramo de agarosa en 100mL de TAE al 1X y se homogeneizó la mezcla por ebullición. A 25 mL de esta solución de agarosa se agregó 25  $\mu$ L de bromuro de etidio (0.625 mg/mL). La solución se colocó en el molde de la cámara de electroforesis hasta polimerizar. Después se llenó la cámara con TAE 1X, hasta que se cubrió completamente el gel. Se colocaron 5  $\mu$ L de azul de bromofenol y 4  $\mu$ L de muestra en los pozos del gel, se aplicó un voltaje de 80 volts por 60 min. El gel se observó en un fotodocumentador con luz ultravioleta (Gomes et al. 2018)

### 6.5.3 Identificación molecular del aislado fúngico mediante la amplificación del fragmento ITS1-5.8S rDNA-ITS2, la subunidad mayor ribosomal (LSU) y el factor de alargamiento alfa (EF1 $\alpha$ )

Para la identificación molecular de los aislados fúngicos se amplificaron los fragmentos de: ITS1- 5.8S rDNA-ITS2; El EF1 $\alpha$  y el gen 28S. Para la ITS se usaron los iniciadores ITS1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Dyavaiah et al., 2007). Para el EF1 $\alpha$ , los iniciadores EF1 (5'-ATGGGTAAGARGACAAGAC-3') y EF2 (5'- GGARGTACCAGTSATCATGTT-3') (Alastruey-Izquierdo et al. 2008). Para el 28S los iniciadores LOR0 y LR5. (Vilgalys, R et al., 1990). La PCR para los tres marcadores moleculares se realizó de acuerdo con los reactivos y las condiciones mostradas en la tabla 1 basada en los métodos propuestos por White et al., (1990) y Alastruey-Izquierdo et al., (2008). Las condiciones de amplificación para cada uno de los genes se realizaron en un GeneAmp PCR System 9700 (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). Se siguieron los métodos de White et al., (1999) para ITS de Alastruey-Izquierdo et al., (2008) de para EF1 $\alpha$  y de Vilgalys and Hester (1990) para 28S para la amplificación de cada uno de los genes. Para la realización de la secuenciación de los tres marcadores moleculares, se secuenciaron los amplicones, en la empresa Magrogen Inc. Seúl, Corea. Una vez obtenidas las secuencias se editaron en Bio Edit v7.0.9.0 (Hall, 1999). y se subieron a la base de datos de GenBank para obtener números de acceso universales. Se llevó a cabo un análisis en Blast del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

**Tabla 1.** Mezcla de reacción para la amplificación por PCR de los marcadores

usados en este proyecto.

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN	VOLUMEN ( $\mu$ L)
DNA	50 ng	0.5
INICIADOR FW	20 pM	0.5
INICIADOR RV	20 pM	0.5
Mezcla de dNTP	0.2 mM	0.8
Taq polimerasa	2.5 U/ $\mu$ L	1
Regulador	10X	5
H2O DEPC	----	41.7
<b>VOLUMEN FINAL</b>	----	<b>50</b>

#### 6.5.4 Inferencia filogenética

Para realizar la inferencia de los aislados se descargaron secuencias de referencia del Gen Bank y se utilizaron como grupo externo a *Geejayessia atrofusca*. Para la construcción del árbol filogenético, las secuencias se alinearon usando el algoritmo de Clustal W en Clustal X v2.1 (Larkin et al. 2007). Para los alineamientos se editaron en Sevaiew v4.6 (Gouy et al. 2010). La identificación a nivel de especie se realizó por métodos de inferencia filogenética de máxima verosimilitud con 10,000 réplicas de Bootstrap, usando la plataforma en línea PhyML (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>). Para ello, se buscaron los modelos de sustitución nucleotídica que mejor se ajustarán a las secuencias conocidas. Los árboles

filogenéticos, se construyeron y se editaron mediante el programa computacional Tree Figure Drawing Tool v1.4.2 (Guindon et al. 2010).

## 6.6 Susceptibilidad fúngica

Para las pruebas de susceptibilidad antifúngica, los conidios se colectaron de acuerdo con el método descrito por Calvillo-Medina et al, (2018) llenando la superficie de las cajas de Petri con agar SDA con 3 mL de 1x de solución salina tamponada de fosfato (PBS) con 0,01% de Tween-20 (vol/vol). Los conidios se contaron utilizando un hemocitómetro de Neubauer (Lo-Laboroptik Ldh®, UK) bajo un microscopio óptico y se ajustaron a una concentración de  $1 \times 10^5$  conidios/ml en 200  $\mu$ L de medio RPMI 1640 (Sigma®, Alemania). De acuerdo con el documento M38-A del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), se evaluó la concentración mínima inhibitoria (MIC) de tres antifúngicos: amfotericina B (AMP), itraconazol (ITR) y voriconazol (VOR) y se determinó la resistencia o susceptibilidad a los hongos. Se prepararon soluciones antifúngicas en dimetilsulfóxido (DMSO) estéril a cinco concentraciones diferentes (0,5 $\mu$ g/ mL, 2  $\mu$ g/ mL, 4  $\mu$ g/ mL, 8  $\mu$ g/ mL y 16  $\mu$ g/ mL) de AMP, ITR y VOR. Se esterilizaron mediante filtración de 0,22  $\mu$ m (Millipore®,EUA ) y se almacenaron a -70 ° C hasta su uso.

El método de microdilución para cada antifúngico y diferentes concentraciones se llevó a cabo en 200  $\mu$ L de medio RPMI 1640 en placas de micro titulación de poliestireno de fondo plano de 96 pocillos (Corning®, EE. UU.). Las placas se incubaron durante 48, 72, 96 y 120 horas a 28°C. Los ensayos de susceptibilidad a



los antifúngicos se realizaron por sextuplicado. Las placas se midieron con un espectrofotómetro de microplacas (Multiskan Ascent Thermo Labsystems, EUA) a una densidad óptica (DO) de 595 nm.

### **6.7 Actividad hemolítica**

Los cuatro hongos aislados de córnea fueron cultivados en Agar Sangre de Carnero (SBA) a 37°C durante 48 horas para observar la actividad hemolítica. Al observar los halos hemolíticos alrededor del medio de cultivo se determina el tipo de hemólisis que poseen: alfa, beta o gamma. Para leer con exactitud la hemólisis producida, se debe levantar la placa de agar sangre y observarla contra la luz.

## 7 Resultados

### 7.1 Casos clínicos

A continuación, se describen los casos clínicos de los cuatro pacientes de los cuales se aislaron los hongos. Los historiales clínicos fueron proporcionados y descritos en colaboración con el médico oftalmólogo especializado en córnea Carlos Adolfo Müller-Morales, parte del Departamento de Córnea y Cirugía Refractiva, Instituto de Oftalmología Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana. (Apéndice 1 y 2)

#### **Paciente 2734, aislado IOM 325366**

En junio de 2019, un hombre de 52 años en la Ciudad de México buscó tratamiento para una infección ocular. Presentó una historia clínica de dos semanas con ojos rojos, dolor y pérdida visual severa en ojo derecho. La condición de este paciente comenzó después de un problema con un objeto vegetal en su jardín. El paciente no tenía antecedentes médicos significativos ni procedimientos quirúrgicos. Su agudeza visual (MAVC), la cual es una prueba que se realiza para saber la nitidez de la visión y determinar el impacto sobre la capacidad visual que tenga el paciente, a través de una escala de movilidad, en este caso en el ojo derecho fue de “movimiento de la mano” (HM) (Rodríguez, 2014).

En el examen oftalmológico se observó una úlcera central de 9x11 mm con un infiltrado estromal y bordes “plumosos” que invadió parcialmente el limbo inferior. Se observó un defecto epitelial total suprayacente y la cámara anterior presentó la formación de 30% de hipopión (Figura 1).



**Figura 1.** Características clínicas del paciente. Evidencia del nivel de hipopión y un absceso central con bordes “plumosos” que se extienden hasta el 80% de la córnea, se observa una afectación parcial del limbo inferior.

Se reportó una ecografía ocular del ojo izquierdo que no reveló hallazgos patológicos. Del ojo derecho, se realizó un cultivo microbiológico de la lesión y se inició tratamiento médico completo con natamicina cada hora, moxifloxacino cada 2 horas, ITR 100 mg vía oral cada 12 horas, doxiciclina 100 mg vía oral cada 12 horas y vitamina C 1 gr. vía oral cada 24 horas.

El estado del paciente se deterioró rápidamente asociado a un dolor intenso (72 horas después del tratamiento inicial). Durante el examen se observó la cámara anterior poco profunda con ausencia de seidel espontáneo (prueba que es utilizada para descartar la presencia de una comunicación entre la cámara anterior del ojo y la exterior), que integro la perforación corneal. (Figura 2) Con base en la evolución tórpida de las úlceras a pesar del manejo con tratamiento tópico, se realizó una queratoplastia tectónica (TKP). Durante la cirugía se observó una membrana inflamada sobre la cápsula anterior del cristalino, por lo que se tuvo que retirar el cristalino conservando la cápsula lenticular. Se realizó una limpieza de la cámara

anterior, una iridectomía parcial y la colocación de un botón corneal de 9,5 mm. Posteriormente se continuó con gotas de moxifloxacina cada 2 horas, gotas de natamicina cada 2 horas, gotas de atropina al 1% cada 12 horas, 1 gramo de vitamina C por vía oral cada 24 horas, ITR 100 mg por vía oral cada 12 horas.

A las 2 semanas después de la cirugía no se observaron nuevos infiltrados ni datos de actividad infecciosa, se decidió espaciar gotas antifúngicas tópicas, suspender el antifúngico oral e iniciar con fluorometolona tópica cada 6 horas.



**Figura 2.** Características clínicas del paciente. Evidencia de la mala evolución (72 horas después del tratamiento inicial) con evidencia de cámara poco profunda.

Un mes después de la suspensión del tratamiento tópico, se observó un botón corneal transparente, en la cámara anterior formada, con afaquia y agudeza visual de la "percepción de la luz". Se realizó una ecografía ocular de seguimiento, informando el desprendimiento coroideo asociado con desprendimiento de retina sobre el área macular. Se explicó mal pronóstico visual y se considera la posibilidad de cirugía de retina con colocación de lente ocular.

### **Paciente 2480, aislado IOM 325367**

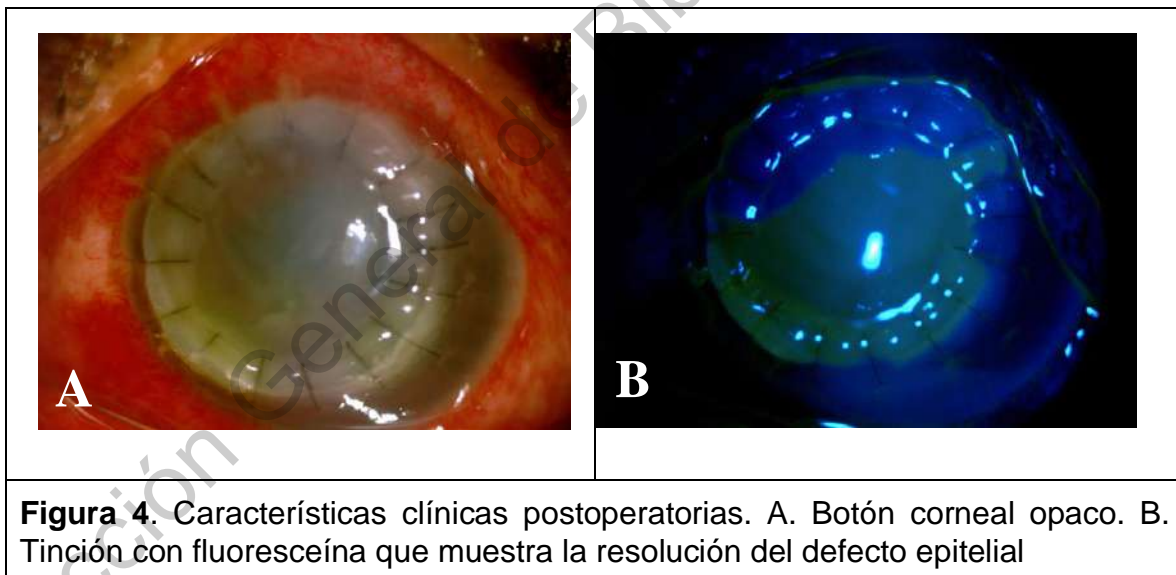
En octubre del 2018, un varón de 39 años acudió a un examen oftalmológico con dos semanas de un problema sobre su ojo izquierdo. Debido a una sensación de cuerpo extraño y la pérdida visual que se ha incrementado conforme pasa el tiempo. El tratamiento previo fue con diclofenaco tópico y tobramicina / dexametasona. No se reportaron antecedentes patológicos u oftalmológicos relevantes. En el examen inicial, la BCVA fue HM. El examen que se realizó con una lámpara de hendidura mostró una inyección ciliar e hiperemia conjuntival severa. La córnea presentaba un infiltrado central denso de 6.5 x 6 mm con bordes plumosos, un defecto epitelial asociado del mismo tamaño y 70% de adelgazamiento central. Se observó una lesión satélite superior de 2x1 mm. La cámara anterior se formó con un 50% de presencia de hipopión. (Figura 3).



**Figura 3.** Características clínicas del paciente. Evidencia de nivel del hipopión y un absceso central con bordes "plumosos". Se puede observar una lesión satélite en la córnea superior.

Se realizó un cultivo microbiológico y se inició un tratamiento tópico de una queratitis bacteriana con moxifloxacino cada hora, natamicina cada hora, doxiciclina 100 mg vía oral cada 12 horas y vitamina C 1 vía oral cada 24 horas. Se reportó una ecografía del polo posterior sin alteraciones. Se tuvo una mala evolución, a la semana de haber iniciado el tratamiento presentó una cámara anterior angosta y lisis corneal central con seidel espontáneo. La presencia microbiológica fue reportada como *Fusarium* sp. y *Staphylococcus epidermidis*.

Debido a la perforación corneal se indicó TKP. Después de la cirugía se continuó el tratamiento con natamicina tópica cada hora, moxifloxacino tópico cada hora, atropina al 1% cada 12 horas e ITR 100 mg por vía oral cada 12 horas. (Figura 4).



Un mes después de la cirugía, se le dio acetato de prednisolona cada 6 horas, se indicó un espaciado del tratamiento tópico previo y se suspendió el antifúngico oral. Una vez documentada la ausencia de actividad infecciosa, se suspendieron los

antifúngicos tópicos y se propone una nueva queratoplastia. Agudeza visual final de "contando dedos" (CF).

### **Paciente 2404, aislado IOM 325368**

En julio de 2018, un hombre de 42 años buscó tratamiento para su ojo derecho. Presentó un historial de 7 días de dolor, ojos rojos y pérdida visual severa en el ojo derecho. La condición actual comenzó luego de un trauma ocular con un objeto desconocido en su lugar de trabajo. Su AV en el ojo derecho fue HM. En el examen, se observó una úlcera central de 4,5x7 mm con un infiltrado estromal con bordes plumosos y se observó un defecto epitelial total suprayacente. La cámara anterior se formó con una presencia de hipopión al 10%. Se realizó un cultivo microbiológico de la lesión y una ecografía ocular para determinar la extensión de la infección. La ecografía resultó sin criterios de endoftalmitis. El tratamiento se inició con moxifloxacino cada hora, doxiciclina 100 mg por vía oral cada 12 horas, aciclovir 200 mg por vía oral cada 4 horas y vitamina C 1 g por vía oral cada 24 horas.

A las 36 horas del abordaje terapéutico inicial, se ajustó un nuevo régimen antibiótico por el resultado del cultivo microbiológico que sugirió que era queratitis fúngica por *Fusarium* sp. Por el cual se decidió comenzar con natamicina tópica cada hora, alternada con moxifloxacina cada hora e ITR100 mg por vía oral cada 12 horas. Se programó una cita para la reevaluación dentro de las 24 horas. Desafortunadamente, se perdió el seguimiento. Cinco días después del tratamiento

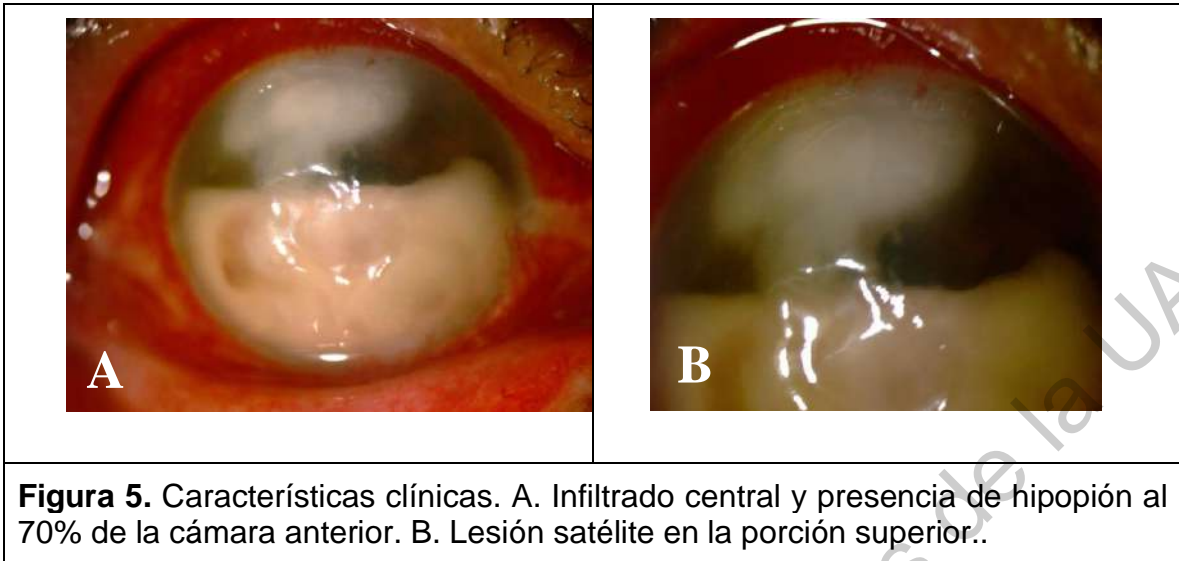
preliminar, el cultivo microbiológico tuvo un resultado definitivo para *Neocosmospora* sp.

### **Paciente 2902, aislado IOM 325369**

En diciembre del 2019, un hombre de 49 años buscó tratamiento para los ojos rojos, fotofobia y pérdida visual progresiva en su ojo izquierdo con siete días de evolución. El paciente sufrió un traumatismo ocular por cuerpo extraño no identificado, por lo que acudió a un médico que le recetó gotas de vancomicina, ceftazidima, natamicina y diclofenaco. El paciente no tenía antecedentes patológicos ni oftalmológicos.

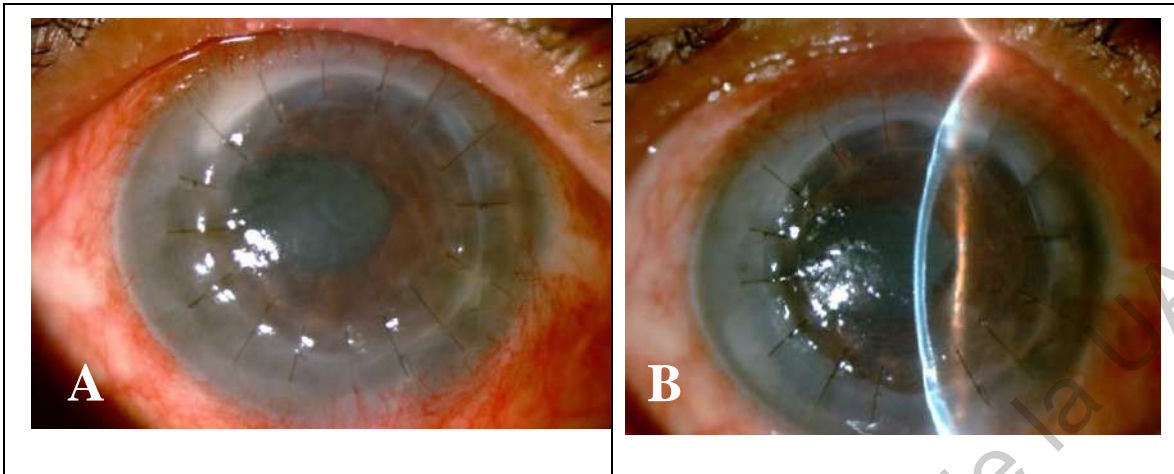
Se realizó un examen físico, en el cual se reportó AVMC de MH, un examen corneal con lámpara de hendidura que identificó un infiltrado central y superior de 8.5x6 mm con bordes plumosos e invasión parcial del limbo en el sector inferior. Se informó la presencia de una lesión de satélite en la porción superior de 6,5x3 mm. Se encontró un adelgazamiento significativo con seidel espontáneo en el centro de la lesión. Se documentó la presencia de hipopión al 70%. Se decidió suspender el tratamiento previo y se programó para TKP de emergencia (Figura 5).





Al realizarse la cirugía presentó una anteriorización del iris-lenticular, se realizaron iridectomías parciales y se colocó un botón corneal de 9 mm. El tejido corneal extraído se envió para realizar un cultivo microbiológico. El tratamiento establecido después de la cirugía fue de moxiflocacina cada 2 horas, natamicina cada 6 horas, atropina cada 12 horas, doxiciclina 100 mg por vía oral cada 12 horas y vitamina C1 gramo cada 24 horas. En su seguimiento postoperatorio presentó una presión intraocular elevada, por lo que se inició un tratamiento antihipertensivo tópico y sistémico.

Tres días después de la cirugía se identificó un nuevo infiltrado en el borde superior del botón corneal (M-1). El informe microbiológico identificó unas estructuras fúngicas, por lo que se decidió iniciar tratamiento oral con ITR 100 mg cada 12 horas y se prescribió antifúngico tópico cada hora (Figura 6).



**Figura 6.** Características clínicas tras la cirugía. Se identificó un nuevo infiltrado en la interfaz corneal en M-1. B. Infiltrado corneal resuelto y una cámara anterior poco profunda.

Un mes después de la cirugía, no se identificaron nuevos infiltrados, se inició un esteroide tópico y se suspendió el antimicótico oral. Dentro de su control postoperatorio mejoró la presión intraocular, aunque no volvió a niveles normales, también se identificó la presencia de catarata. En su último seguimiento, se documentó una agudeza visual con FQ.

A continuación, se expone los datos de los cuatro pacientes analizados en este estudio (Tabla 2). Los cuatro pacientes, son de sexo masculino, mayores a 39 años, ninguno de ellos con antecedente de problemas oculares o historia clínica con dificultades clínicas relevantes. El factor de predisposición en dos pacientes fue por trauma vegetal (VT), y dos por cuerpo extraño desconocido (UFB).

**Tabla 2.** Datos demográficos de pacientes con *Neocosmospora* sp. en queratitis

No.	Género	Edad	Historia ocular	Historia médica	Factor de predisposición
1	Masculino	52	Ninguno	Ninguno	VT
2	Masculino	39	Ninguno	Ninguno	VT
3	Masculino	48	Ninguno	Ninguno	UFB
4	Masculino	42	Ninguno	Ninguno	UFB

\* VT: trauma vegetal, UFB: cuerpo extraño desconocido

En la tabla 2, se muestran los resultados de clínicos de los cuatro pacientes de donde se aislaron los hongos que se identificaron y caracterizaron en este proyecto. De los cuales, tres de cuatro pacientes tuvieron intervención quirúrgica, con queratoplastia terapéutica (TKP) realizando iridectomía en los tres pacientes. Los resultados después de las TPK fueron distintos y, al mismo tiempo, diferentes días de seguimiento. Al final del tratamiento los pacientes no pudieron recuperar la vista debido a los problemas clínicos que generó la fúngica infección en ellos. Dos de ellos quedaron con BCVA de CF, uno más con percepción de luz (LP) y el último con HM (Tabla 3).

**Tabla 3.** Resultados del tratamiento realizado en los cuatro pacientes que presentaron infecciones fúngicas

No.	Intervención quirúrgica	Detalles de la intervención quirúrgica	Resultado ocular	Último seguimiento registrado (días)	Final BCVA
1	Si	TKP, extracción del cristalino, iridectomía parcial	Afaquia, desprendimiento coroidal, desprendimiento de retina	240	LP
2	Si	TKP, iridectomía parcial	Botón corneal no transparente	180	CF
3	Si	TKP, iridectomía parcial	Cámara anterior poco profunda, cataratas, PIO alta	120	CF
4	No	NA	Queratitis corneal	2	HM
* TKP: Queratoplastia terapéutica, LP: Percepción de la luz, CF: contar dedos					

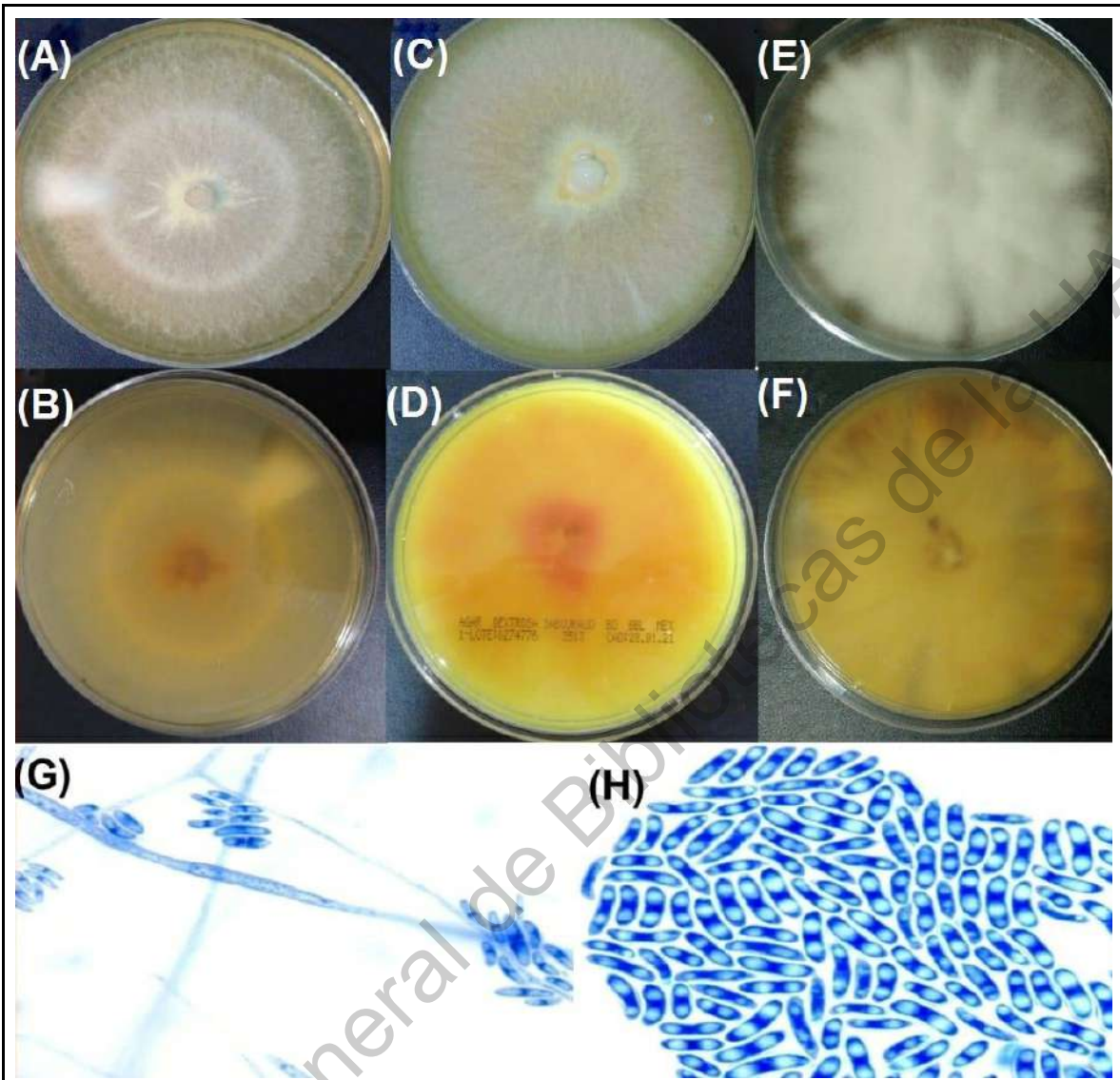
## 7.2 Identificación de los aislados fúngicos

### 7.21 Análisis morfológico

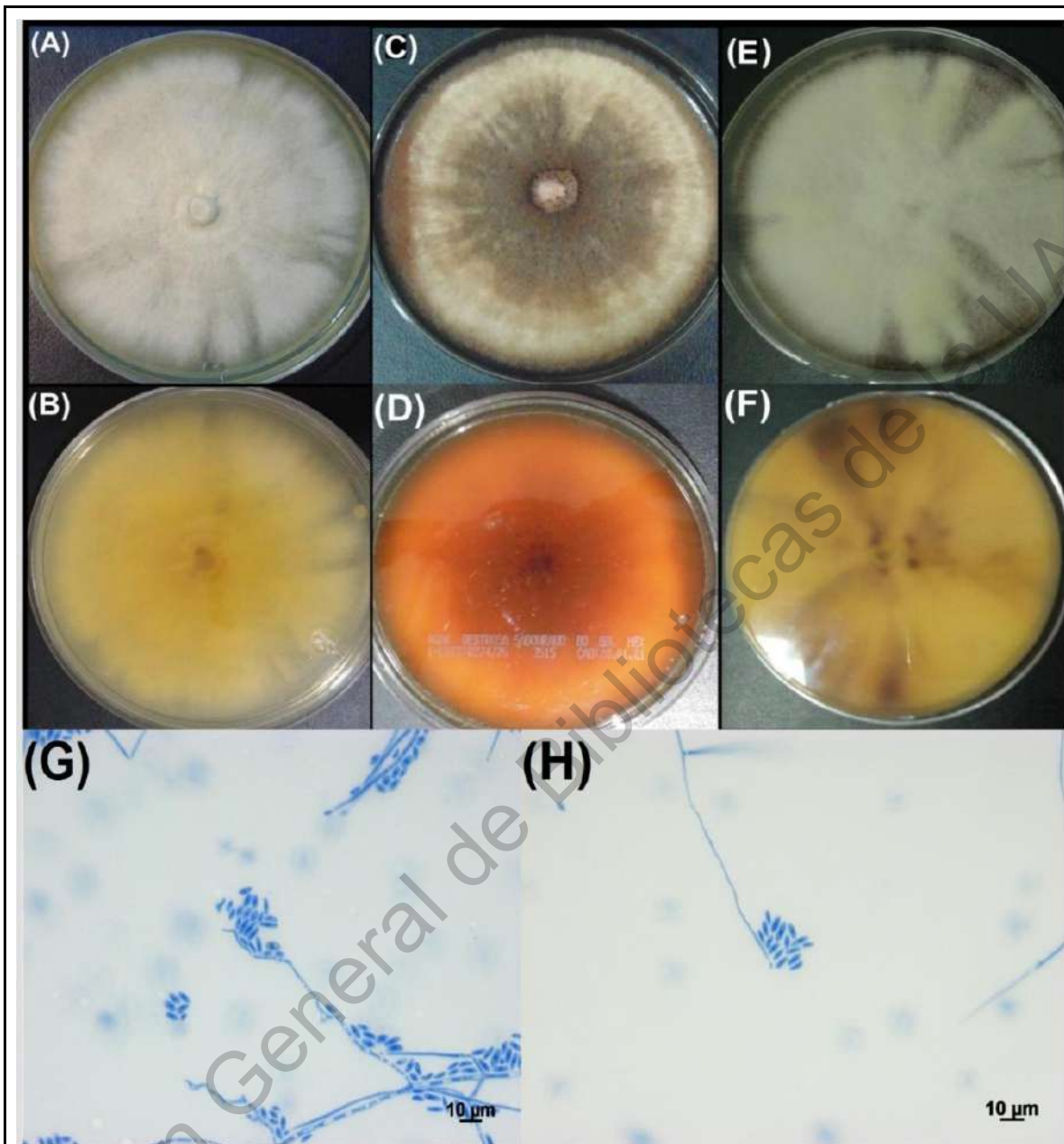
La morfología macroscópica de los hongos observadas en los medios de cultivo de aislamiento (SDA y PDA) ayudaron a la identificación presuntiva, la cual se cita a continuación. Según estos resultados, los patógenos fúngicos en las queratitis descritas aquí se clasificaron pertenecientes al género *Fusarium* (Figuras 7-10). Las características morfológicas microscópicas obtenidas de las tinciones con azul de algodón lactofenol de las estructuras fúngicas (Figuras 7-10) de los cuatro aislados IOM 325366- IOM 325369 los colocaron de igual manera dentro del género *Fusarium*. Sin embargo, existe un género hermano de *Fusarium*, *Neocosmospora*, el cual presenta conidios fusiformes, microconidios y clamidiosporas muy similares a *Fusarium*.

Ambos se han reportado como saprofitos de suelo relacionados a enfermedades en animales, plantas y humanos, donde, el rango de infección puede ser desde infecciones superficiales como onicomycosis y queratitis hasta infecciones diseminadas (Valencia, 2009).

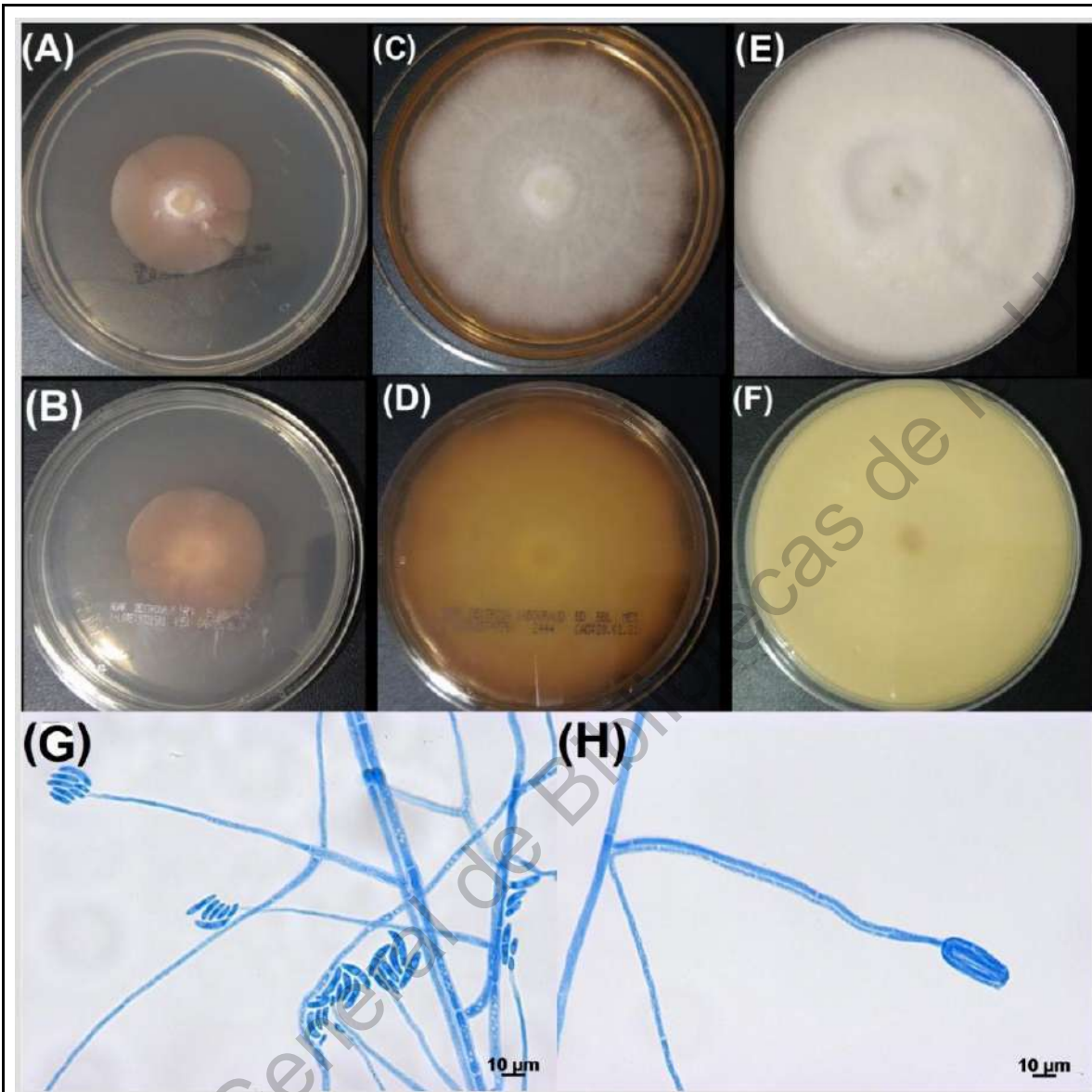
En algunas especies de *Neocosmospora*, son muy similares morfológicamente a *Fusarium*, ejemplo *N. suttoniana* tienen conidios esporoquiales similares a *F. ensiforme*. Sin embargo, produce conidios más pequeños en general y clamidiosporas de paredes lisas



**Figura 7. Morfología macroscópica y microscópica del aislado IOM 325366.** Se muestran las características típicas de este microorganismo. En A y B se observa la morfología macroscópica con un medio de crecimiento de PDA, con micelio hialino después de 10 días de crecimiento. En C y D se ve la morfología macroscópica con un medio de crecimiento de SDA, con micelio hialino después de 10 días de crecimiento. En E y F se percibe la morfología macroscópica con un medio de crecimiento de MEA, con micelio blanco después de 10 días de crecimiento. En G la morfología microscópica en aumento de 400X y 630X muestra el conidióforo y en el H los macroconidios multicelulares.

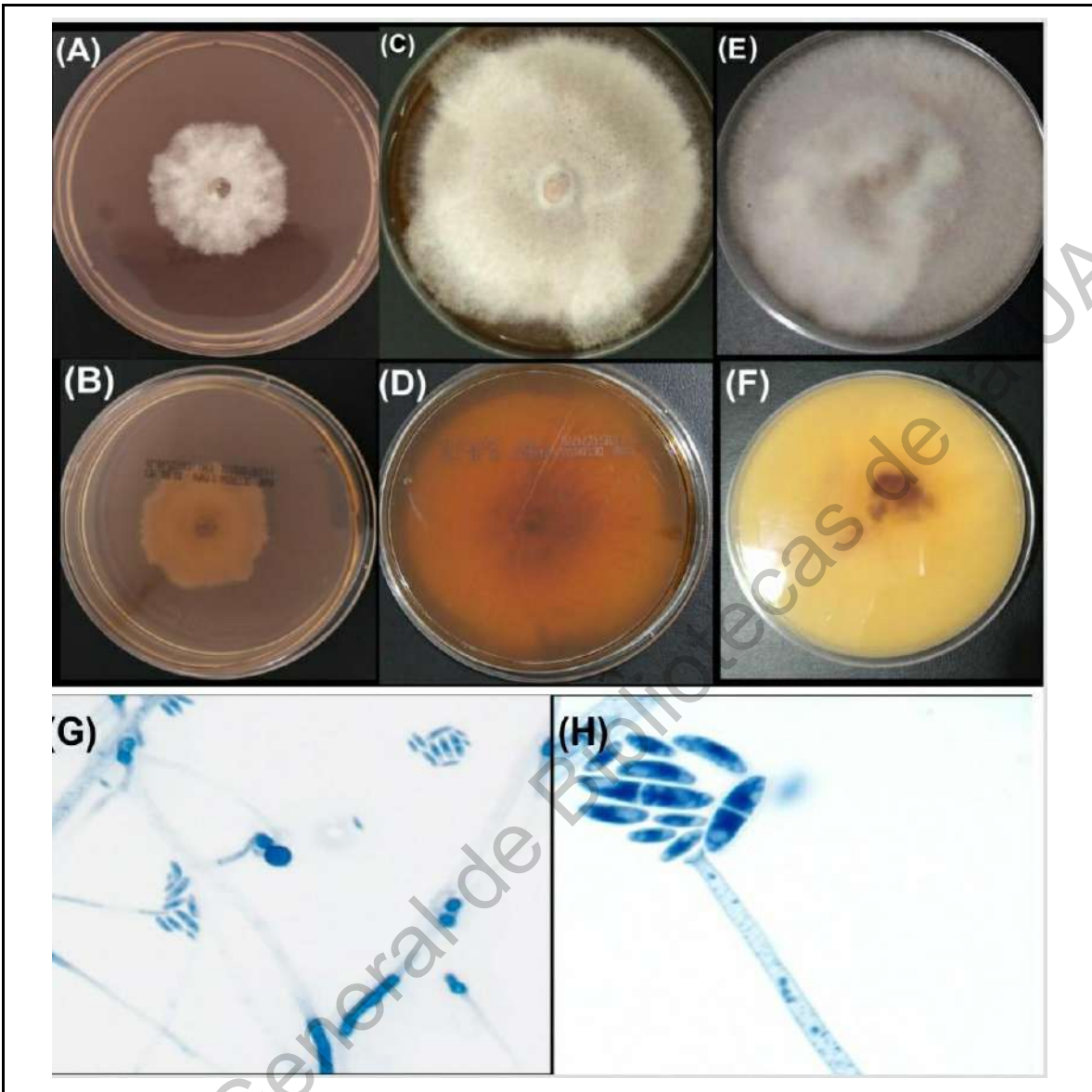


**Figura 8. Morfología macroscópica y microscópica del aislado IOM 325367.** Se observan las características típicas de este microorganismo. En A y B está la morfología macroscópica con un medio de crecimiento de PDA, con micelio hialino después de 10 días de crecimiento. En C y D se ve la morfología macroscópica con un medio de crecimiento de SDA, con micelio h melanzado después de 10 días de crecimiento. En E y F se percibe la morfología macroscópica con un medio de crecimiento de MEA, con micelio hialino después de 10 días de crecimiento. Y en G y H se muestra la morfología microscópica con escalas de 10  $\mu$ l muestra un micelio y macroconidios multicelulares.



**Figura 9. Morfología macroscópica y microscópica del aislado IOM 325368.** Se muestran las características típicas de este microorganismo. En A y B se observa la morfología macroscópica con un medio de crecimiento de PDA, con micelio hialino al inicio y termina en rosado después de 10 días de crecimiento. En C y D se ve la morfología macroscópica con un medio de crecimiento de SDA, con micelio hialino después de 10 días de crecimiento. En E y F se percibe la morfología macroscópica con un medio de crecimiento de MEA, con micelio blanco después de 10 días de crecimiento. En G la morfología microscópica con escala de 10 μl muestra un micelio y macroconidios multicelulares, y en F el micelio con una cabezuela de espora mucosa.





**Figura 10. Morfología macroscópica y microscópica del aislado IOM 325369.** Se observan las características típicas de este microorganismo. En A y B se ve la morfología macroscópica con un medio de crecimiento de PDA, con micelio blanco después de 10 días de crecimiento. En C y D la morfología macroscópica con un medio de crecimiento de SDA, con micelio blanco después de 10 días de crecimiento. En E y F se percibe la morfología macroscópica con un medio de crecimiento de MEA, con micelio blanco ligeramente rosado después de 10 días de crecimiento. En G la morfología microscópica con aumentos de 400X y 630X muestra el conidióforo y en el H los macroconidios multicelulares.

*N. gamsii* se puede distinguir morfológicamente de *F. eumartii*, ya que produce conidios esporodoquiales comparativamente delgados y cortos, que también son menos frecuentemente septados que los conidios de *F. eumartii* y tienen una curvatura apical más pronunciada (Sandoval et al., 2018).

### 7.2.2 Análisis filogenéticos

Basado el conjunto de datos de nrDNA ITS (533 pb de tamaño), la LSU (886 pb) y el EF1 $\alpha$  (pb) los aislados de queratitis IOM 325366- IOM 325369 perteneciente al género *Neocosmospora* sp. El análisis de inferencia filogenética se realizó con las secuencias mostradas en la Tabla 4. Donde se analizaron secuencias de los géneros *Fusarium*, *Neocosmospora* y *G. atrofusca* (utilizado como grupo externo para enraizar el árbol filogenético) (Tabla 4). Los resultados obtenidos en el análisis filogenético mostraron que el mejor modelo de sustitución de nucleótidos obtenido fue GTR. Los parámetros obtenidos fueron: Akaike, Log-verosimilitud = -8269.28947, Parámetro de Gamma Shape = 0.734, freqA = 0.24051, freqC = 0.27993, freqG = 0.24274 y freqT = 0.23681. En la Tabla 4, se observa las secuencias de los géneros que tuvieron un porcentaje de similitud mayor al 90%, de los aislados IOM 325366, IOM 325367 y IOM 32568 Y IOM 325369. Con los siguientes datos generales los cuales son: el nombre de la especie, el aislado, el país donde fue aislado, el sitio de aislamiento y las secuencias de los marcadores moleculares usados en este estudio: el EF1 $\alpha$ , ITS y LSU. Las secuencias aisladas de queratitis tuvieron un porcentaje de similitud al género *Fusarium* mayor a 90% en la base de datos GenBank, Sin embargo, los resultados del análisis de máxima verosimilitud sitúan a las cuatro aislados en cuatro especies distintas dentro de

*Neocosmospora*. colocándolas separadas de las especies de *Fusarium* sp. descritas.

**Tabla 4.** Secuencias de los géneros *Fusarium*, *Neocosmospora* y *G. atrofusca* usadas para enraizar el árbol filogenético)

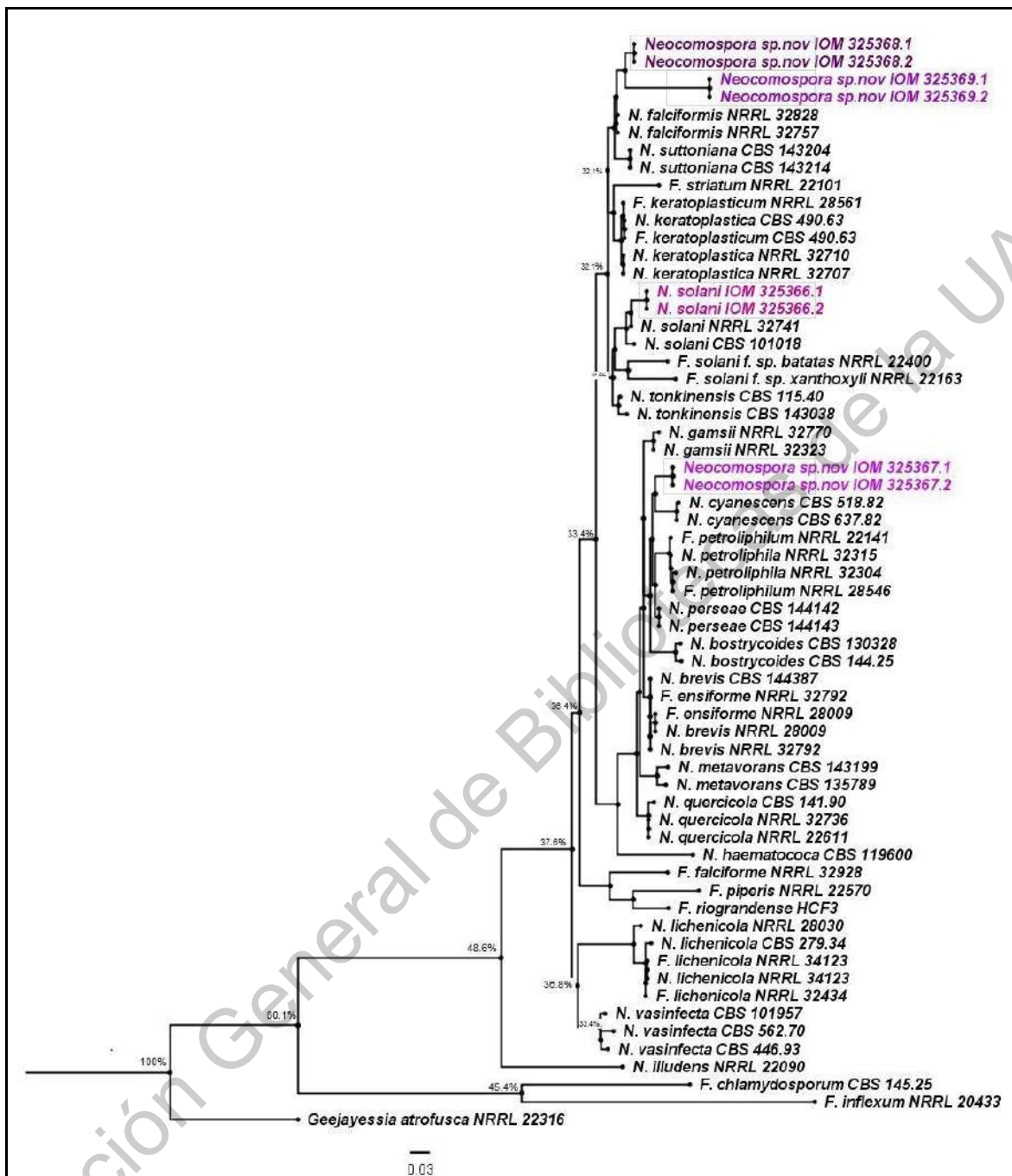
Especie	Aislado	País	Sitio de aislamiento	EF1 $\alpha$	ITS	LSU
<i>*Neocosmospora solani</i>	IOM 325366.1	México	Córnea humana		MW652630	MW652638
<i>*Neocosmospora solani</i>	IOM 325366.2	México	Córnea humana		MW652631	MW652639
<i>*Neocosmospora sp nov</i>	IOM 325367.1	México	Córnea humana		MW652632	MW652640
<i>*Neocosmospora sp nov</i>	IOM 325367.2	México	Córnea humana		MW652633	MW652641
<i>*Neocosmospora sp nov</i>	IOM 325368.1	México	Córnea humana		MW652634	MW652642
<i>*Neocosmospora sp nov</i>	IOM 325368.2	México	Córnea humana		MW652635	MW652643
<i>*Neocosmospora sp nov</i>	IOM 325369.1	México	Córnea humana		MW652636	MW652644
<i>*Neocosmospora sp nov</i>	IOM 325369.2	México	Córnea humana		MW652637	MW652645
<i>F. chlamydosporum</i>	CBS 145.25	Honduras	Humano	MN120754	MH854820	MH866320
<i>F. ensiforme</i>	NRRL 28009	EUA	Ojo humano	DQ246869	DQ094351	DQ236393
<i>F. ensiforme</i>	NRRL 32792	Japón	Humano	DQ247101	DQ094561	DQ236603
<i>F. falciforme</i>	NRRL 32928	EUA	Ojo humano	DQ247176	DQ094301	DQ236376
<i>F. solani f. sp. batatas</i>	NRRL 22400	EUA	<i>Ipomoea batatas</i>	AF178343	AF178407	DQ236345
<i>F. solani f. sp. xanthoxyli</i>	NRRL 22163	Japón	<i>Xanthoxylum sp.</i>	AF178336	AF178401	AF178370
<i>F. inflexum</i>	NRRL 20433	Alemania	Ojo humano	AF008479	NR_152941	U34548
<i>F. keratoplasticum</i>	CBS 490.63	Japón	Ojo humano	DQ246846	DQ094331	DQ236373
<i>F. keratoplasticum</i>	NRRL 28561	EUA	Humano	DQ246902	DQ094375	DQ236417
<i>F. lichenicola</i>	NRRL 34123	India	Ojo humano	DQ247192	DQ094645	DQ236687
<i>F. lichenicola</i>	NRRL 32434	Alemania	Humano	DQ246977	DQ094444	DQ236486
<i>F. petroliphilum</i>	NRRL 28546	EUA	Ojo humano	DQ246887	DQ094361	DQ236403
<i>F. petroliphilum</i>	NRRL 22141	New Zelanda,	Calabaza	AF178329	DQ094307	DQ236349
<i>F. piperis</i>	NRRL 22570	Brasil.	Pimienta negra	AF178360	NR_169886	AF178391

<i>F. riograndense</i>	HCF3	Brasil.	Tejido nasal humano	KX534002	KT186366	KX534001
<i>F. striatum</i>	NRRL 22101	Panamá	Ropa de algodón	AF178333	AF178398	AF178367
<i>N. bostrycoides</i>	CBS 144.25	Honduras	Suelo	LR583597	LR583704	LR583912
<i>N. bostrycoides</i>	CBS 130328	USA	Herida oral humana	DQ246923	DQ094396	DQ236438
<i>N. brevis</i>	CBS 144387	Bélgica	Agua desuelo contaminada	LR583601	LR583708	LR583916
<i>N. brevis</i>	NRRL 28009	USA	Ojo humano	DQ246869	DQ094351	DQ236393
<i>N. brevis</i>	NRRL 32792	Japón	Nódulos subcutáneos humanos	DQ247101	DQ094561	DQ236603
<i>N. cyanescens</i>	CBS 518.82	Países Bajos	Pie humano	LR583605	AB190389	LR583920
<i>N. cyanescens</i>	CBS 637.82	Bélgica	Pie humano	LR583606	LR583712	LR583921
<i>N. falciformis</i>	NRRL 32757	EUA	Arena	DQ247075	DQ094536	DQ236578
<i>N. falciformis</i>	NRRL 32828	EUA	Humano	DQ247135	DQ094594	DQ236636
<i>N. solani</i>	CBS 101018	Italia	Frambuesa	LR583651	LR583770	LR583975
<i>N. solani</i>	NRRL 32741	EUA	Ojo humano	DQ247061	DQ094522	DQ236564
<i>N. gamsii</i>	NRRL 32323	EUA	Líquido de lavado broncoalveolar	DQ246951	DQ094420	DQ236462
<i>N. gamsii</i>	NRRL 32770	EUA	Ojo humano	DQ247083	DQ094544	DQ236586
<i>N. haematococa</i>	CBS 119600	Sri Lanka	Árbol	DQ247510	KM231797	KM231664
<i>N. illudens</i>	NRRL 22090	Nueva Zelanda	Humano	AF178326	AF178393	AF178362
<i>N. lichenicola</i>	CBS 279.34	Somalia	Humano	LR583615	LR583725	LR583933
<i>N. lichenicola</i>	NRRL 28030	Tailandia	Humano	DQ246877	DQ094355	DQ236397
<i>N. lichenicola</i>	NRRL 34123	India	Ojo humano	DQ247192	DQ094645	DQ236687
<i>N. keratoplastica</i>	CBS 490.63	Japón	Humano	LT906670	LR583721	LR583929
<i>N. keratoplastica</i>	NRRL 32710	EUA	Ojo humano	DQ247030	DQ094492	DQ236534
<i>N. keratoplastica</i>	NRRL 32707	EUA	Ojo humano	DQ247027	DQ094490	DQ236532
<i>N. metavorans</i>	CBS 135789	Grecia	Líquido de lavado broncoalveolar	LR583627	LR583738	LR583946
<i>N. metavorans</i>	CBS 143199	EUA	Humano	LR583628	LR583739	LR583947
<i>N. perseae</i>	CBS 144142	Italia	<i>Persea americana</i>	LT991902	LT991940	LT991947
<i>N. perseae</i>	CBS 144143	Italia	<i>Persea americana</i>	LT991903	LT991941	LT991948
<i>N. petroliphila</i>	NRRL 32304	EUA	Uña humana	DQ246932	DQ094402	DQ236444
<i>N. petroliphila</i>	NRRL 32315	EUA	Úlcera inguinal humana	DQ246943	DQ094412	DQ236454

<b><i>N. quercicola</i></b>	CBS 141.90	Italia	<i>Quercus cerris</i>	DQ247634	LR583760	LR583964
<b><i>N. quercicola</i></b>	NRRL 22611	EUA	Córnea humana	DQ246841	DQ094326	DQ236368
<b><i>N. quercicola</i></b>	NRRL 32736	EUA	Ojo humano	DQ247056	DQ094517	DQ236559
<b><i>N. suttoniana</i></b>	CBS 143214	EUA	Herida humana	DQ247163	DQ094617	DQ236659
<b><i>N. suttoniana</i></b>	CBS 143204	EUA	Úlcera corneal humana	DQ246944	DQ094413	DQ236455
<b><i>N. tonkinensis</i></b>	CBS 115.40	Vietnam	Úlcera corneal humana	LT906672	MG189941	MG189926
<b><i>N. tonkinensis</i></b>	CBS 143038	Países bajos	Córnea humana	LT906673	MG189942	MG189927
<b><i>N. vasinfecta</i></b>	CBS 446.93	Japón	Arena	LR583670	LR583791	LR583996
<b><i>N. vasinfecta</i></b>	CBS 562.70	EUA	<i>Arachis hypogaea</i> nut	DQ247606	AF178413	AF178382
<b><i>N. vasinfecta</i></b>	CBS 101957	Alemania	Sangre esputo y herida	LR583676	LR583797	LR584002
<b><i>Geejayessia atrofusca</i></b>	NRRL 22316	EUA	<i>Staphylea trifolia</i>	AF178361	AF178423	AF178392

\*Hongos estudiados en este proyecto. IOM: Colección de cultivos de México, NRRL: Agricultural Research Service Culture Collection, CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures

El árbol filogenético (Figura 11) muestra que el aislado IOM 325366 es demasiado cercano a *Neocosmospora solani*, por lo que, pertenece a esta especie. El aislado IOM 325367, es cercano a la especie *Neocosmospora cyanescens*. Sin embargo, presenta una distancia genética suficiente para considerarlo *Neocosmospora* sp.nov. Los aislados IOM 325368 y IOM 325369 están cerca de la especie *Neocosmospora falciformis*. Sin embargo, se ven demasiado divergentes por lo que se propone que son dos nuevas especies. Para la categorización de las tres nuevas especies es necesario realizar la descripción morfológica y la clave dicotómica, cuyos resultados exceden los objetivos del presente proyecto.



**Figura 11. Análisis de inferencia filogenética de los aislados fúngicos IOM 325366, IOM 325367 y IOM 32568 Y IOM 325369.** El análisis realizado con el método de Máxima Verosimilitud mostró que el aislado IOM 325366 pertenece a la especie *N. sonali*, el aislado IOM 325367. IOM 325368 y el aislado IOM 325369 pertenece a las nuevas especies categorizadas como *Neocosmospora* sp.nov, Los valores del Bootstrap se indican en los nodos con valores menores al 32%. Como grupo externo *G.atrofusca* NRRL 22316

### 7.3 Ensayo antifúngico

Una vez identificadas los cuatro aislados fúngicos, se analizó la prueba antifúngica de *Neocosmospora* para AMP, ITR y VOR, las cuales se muestran en la Tabla 5. Los resultados mostraran que la concentración mínima inhibitoria (MIC) para cada uno de los antifúngicos en los aislados clínicos. El aislado IOM 325366 tuvo una susceptibilidad a AMP, ITRA y VOR en todas las concentraciones probadas, y mostró crecimiento hasta las 120 h. El aislado IOM 325367 mostró resistencia a AMP, ITRA y VOR después de 120 h de crecimiento, incluso a las concentraciones más altas y hasta las 144 h. De la misma manera, IOM 325367 expuesto a la concentración de 2 µg / ml es el único que creció más que el control a las 120 h (datos no mostrados). Cuando el hongo fue expuesto a otras concentraciones de AMP, mostró una tendencia a crecer hasta las 120 h y luego detener la actividad celular a las 144 h.

El aislado IOM 325368 mostró resistencia a ITRA Y VOR después de 144 h de crecimiento, incluso a las concentraciones más altas y susceptibilidad al AMP después de 120 h de crecimiento. El aislado IOM 325369 mostró resistencia a ITRA después de 144 h de crecimiento, incluso a las concentraciones más altas y susceptibilidad al AMP y VOR 120 h de crecimiento (Tabla 5). Estos resultados sugieren que la MIC de ITRA frente a este último podría ser 16 µg/mL o incluso mayor a esta concentración. En el caso de AMP, con a la excepción del aislado IOM 325367, la actividad fúngica fue estable y mostró una tendencia a crecimiento

**Tabla 5.** Concentración mínima inhibitoria de la prueba antifúngica de los aislados IOM 325366, IOM 325367, IOM 325368 e IOM 325369 de los antifúngicos AMP, ITRA, VOR.

Aislado	Antifúngicos	MIC ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )	Actividad metabólica (h)
IOM 325366	*AMP	<4	120
	*ITRA	<4	120
	*VOR	<0.5	120
IOM 325367	**AMP	>16	144
	**ITRA	>16	144
	**VOR	>16	144
IOM 325368	*AMP	<4	120
	**ITRA	>16	144
	**VOR	>16	144
IOM 325369	*AMP	<8	120
	**ITRA	>16	144
	*VOR	<8	120

\*\* : resistente, \* : susceptible; MIC: concentración mínima inhibitoria.

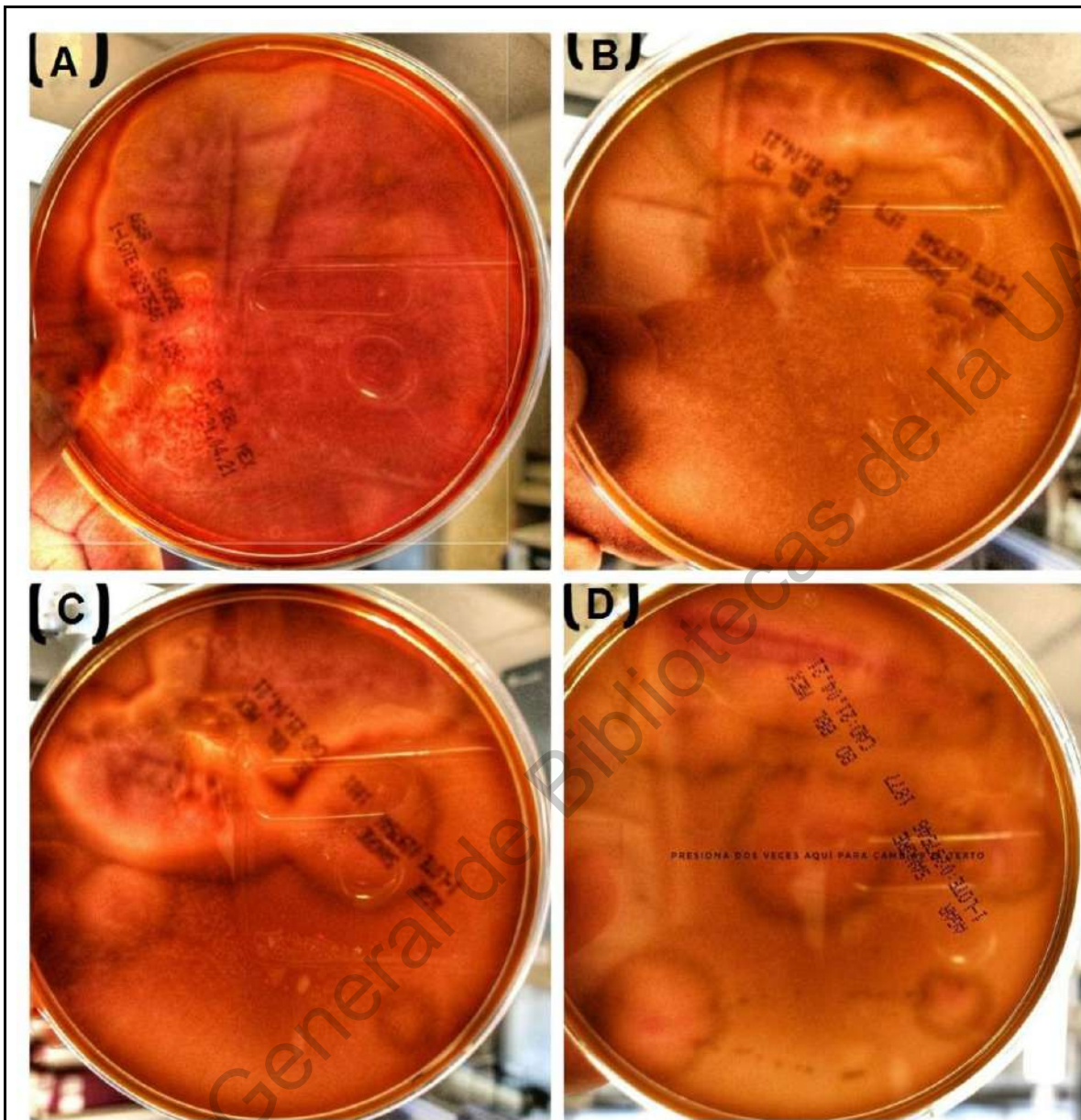
continuo incluso en la concentración más alta de este fármaco (16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) .



En este estudio, se observó que *N. solani* IOM 325366 es susceptible a los tres antifúngicos, *Neocosmospora* sp. nov. IOM 325367 es resistente a AMP (MIC>16 µg / mL) ITR (MIC>16 µg/mL) y VOR(MIC>16 µg/mL) *Neocosmospora* sp. nov. IOM 325368 es resistente ITRA (MIC>16 µg/mL) VOR (MIC>16 µg/mL) y *Neocosmospora* sp. nov. IOM 325369 es resistente a ITRA (MIC>16 µg/mL).

#### **7.4 Actividad hemolítica**

Una vez realizada la prueba antifúngica de *Neocosmospora*, se realizó la actividad hemolítica, para los cuatro aislados de córnea, estos fueron cultivados en Agar sangre de carnero (SBA) a 37°C durante 48 horas, pues a esta temperatura tienen un cierto potencial para establecerse y causar micosis en seres humanos con un sistema inmune comprometido.(Figura 12) El tipo de hemolisis que se observó en los cuatro aislados fue beta hemolisis debido a la presencia de un halo al redor de las colonias de los hongos y pérdida de hemoglobina en el agar.



**Figura 12. Actividad hemolítica de los aislados IOM 325366- IOM 325369.** Los cuatro aislados de córnea fueron cultivados en Agar sangre de carnero (SBA) a 37°C durante 48 horas. En el A se observa el aislado IOM 325366 y en el B el aislado IOM 325367, los cuales, tienen una hemólisis de tipo beta pues se observa un halo al redor de las colonias de los hongos y pérdida de hemoglobina en el agar. En el C se observa el aislado IOM 325368 y, en el D, se observa el aislado IOM 325367 con una beta-hemólisis ya que se ve un halo transparente en el medio de cultivo.

## 8 Discusión

Uno de los desafíos asociados con el estudio de los mecanismos de virulencia de los hongos patógenos es la identificación de las especies involucradas en infecciones en humanos. La asignación a nivel de especie en hongos es compleja, debido a que las características morfológicas no siempre son descriptivas para llegar a ella (Guarro y Gené, 1995). En los últimos años, los enfoques genéticos y moleculares han sido usados para identificar especies de hongos patógenos. Los marcadores moleculares ribosomales, como los usados en este estudio (ITS y LSU) han demostrado ser muy útiles para identificar a los agentes causantes de las infecciones fúngicas humanas. La identificación y descripción de especies en hongos actualmente, se combina con morfología, el uso de marcadores moleculares y los análisis de inferencia filogenética, los cuales son necesarios para definir las especies y corroborar el estatus filogenético de dichos organismos (Crous et al., 2006).

El presente estudio se ha realizado con cuatro hongos filamentosos aislados de queratitis humana. Se identificó a nivel de especie sólo uno de los aislados debido a la falta de estudios en micosis humanas y se evidenció que tres de estos cuatro aislados pertenecen a nuevas especies del género *Neocosmospora* sp. Sin embargo, no fueron categorizados taxonómicamente debido a que la descripción a nivel de especie requiere la descripción morfológica de las estructuras de los hongos lo que excede los objetivos de este estudio.

En hongos existen problemas en la identificación basados en sus características morfológicas como se evidencio en el presente proyecto. En particular, la familia *Nectriaceae*, se encuentra en diversos sitios como el suelo, el agua, el aire, el material vegetal vivo o muerto, los alimentos y muchos más sustratos Sin embargo, algunas especies son de gran importancia pues son productores de micotoxinas que afectan la salud humana y animales, el género *Fusarium sensu lato* se ha segregado recientemente en varios géneros similares a *Fusarium*, es decir, *Albonectria*, *Bisifusarium*, *Cyanonectria*, *Geejayessia*, *Neocosmospora* y *Rectifusarium* (Gräfenhan et al.2011, Lombard et al. 2015).

El género *Neocosmospora* es un complejo de especies de *Fusarium solani*, debido a que se recategorizaron especies descritas originalmente en *Fusarium* al género *Neocosmospora*, promoviendo así una nomenclatura que está anidada filogenéticamente dentro de un *Fusarium* monofilético. Estos hongos son ampliamente resistentes al espectro de antifúngicos que están disponibles para el tratamiento de micosis humanas actualmente (Geiser et al. 2013, O'Donnell 2000).

Por medio de la observación de características morfológicas como son los conidios se consideró que los aislados pertenecían al género *Fusarium*. Sin embargo, al momento de llevar acabo el análisis filogenético demostramos que pertenecen al género *Neocosmospora* sp. Este tipo de errores en la identificación de hongos filamentosos son comunes, por eso resulta de vital importancia realizar identificaciones combinando las características fenotípicas y genotípicas. Los análisis realizados (filogenético y taxonómico) demostraron que tres de los aislados no fueron similares a ninguna de las especies ya descritas. Debido a esto,

propusimos que en los cuatro aislados de queratitis tres son una nueva especie, y el cuarto pertenece a *N. solani*.

Las especies *Fusaria* basándonos en *Neocosmospora* y *Fusarium* tienen caracteres micro morfológicos similares, en la actualidad están relacionados con infecciones superficiales y oportunistas en personas inmunocompetentes, en donde se han reportado casos de onicomycosis y queratitis (Diepeningen et. al 2014).

Algunos hongos patógenos oportunistas filamentosos como *Fusarium spp.*, *Aspergillus spp.*, y *Neocosmospora spp.*, han sido descritos principalmente como agentes de la queratomicosis, que es una enfermedad ocular importante. En el género *Neocosmospora sp.*, su tasa de infección es más baja en comparación con dos géneros mencionados anteriormente. Algunas especies de *Neocosmospora* se han encontrado aisladas y tienen relación con enfermedades humanas prevalentes en todo el mundo, causando principalmente infecciones de la córnea, pero también aisladas de sangre, uñas y piel (Sandoval, et al., 2008). Este género, se encuentran entre los patógenos más importantes asociados a infecciones graves en receptores de trasplantes y pacientes con neoplasias hematológicas malignas, neutropenia persistente o inmunodepresión causada por la terapia con corticosteroides (usado para tratar la artritis reumatoide, la enfermedad intestinal inflamatoria, el asma, las alergias y muchas otras afecciones).

En los países en desarrollo, la queratitis sigue siendo un problema de salud y es la principal causa de ceguera prevenible (Ponce-Angulo et al., 2019). Los hongos tienen una gran capacidad para sobrevivir en una amplia gama de temperaturas y

pH, esto podría ayudar a explicar su amplia distribución y probablemente al desarrollo de micosis (Hernández-Camarena et al., 2015).

Sin embargo, los ojos tienen barreras físicas, químicas y enzimáticas para prevenir la proliferación de microorganismos patógenos. Las causas de la queratitis por los hongos están relacionadas con factores de virulencia que les permiten colonizar este órgano como pueden ser la resistencia a antifúngicos o la capacidad hemolítica (Stone et al., 2014).

Las pruebas realizadas en SBA permitieron analizar la capacidad hemolítica de los microorganismos patógenos. La hemólisis también llamada eritrocateresis es el fenómeno de la desintegración de los eritrocitos (glóbulos rojos) por acción de hemolisinas (proteínas excretadas hacia el exterior de la célula, en este caso, por los microorganismos) puede ser hemólisis parcial o no mostraron hemólisis, el cual va a determinar el riesgo de patogénesis al humano (Maldonado, 2011). Al realizar las pruebas de hemólisis se demostró la capacidad hemolítica de tipo beta o total que junto con la termotolerancia que presentan estos microorganismos, (crecidos a 37°C), se sugiere que dichos aislados podrían tener un cierto potencial para establecerse y causar micosis en seres humanos con un sistema inmune comprometido. Pues los hongos tendrán la capacidad para infectar el tejido corneal de los pacientes.

De acuerdo con estudios realizados en otros hongos como levaduras, la beta hemólisis se ha considerado un factor de virulencia en las infecciones fúngicas, así como en las infecciones causadas por bacterias (Bassetti, et al 2015). Sin embargo, la

información sobre la capacidad hemolítica en hongos filamentos no es mucha y aún queda mucho por describir respecto a su capacidad de virulencia.

En hongos, se ha escrito la resistencia emergente a los azoles, y se han demostrado distintos factores de virulencia, entre ellos: la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares, como fosfolipasa y proteinasa, las cuales, facilitan una adherencia, así como la hemolisina. Dichos factores de virulencias se han descrito en otras especies de levadura que afectan humanos (Bassetti, et al 2015). Además, los factores predisponentes (por ejemplo, lesiones corneales, defectos en el epitelio corneal o el mal uso de lentes de contacto) permiten la colonización de los patógenos. Los factores de riesgo en la queratitis incluyen trauma, inmunosupresión, cirugía previa y el uso de lentes de contacto (Muna'aim et al 2017).

Al revisar los resultados de este estudio con otra literatura, se ponen en evidencia la variabilidad que presenta *Neocosmospora* y *Fusarium* en cuanto a su respuesta a las pruebas antifúngicas (Zhang et al 2006). Ya que existen al menos, 45 especies filogenéticas, hablando solo de *Fusarium solani*, mientras que en otra investigación se ha reportado la existencia de al menos 21 de interés netamente clínico (Guarro, 2012). Pues las diferencias encontradas son independientes del tipo de muestra donde se aisló el hongo, pero también, influye las diferencias de tipo geográfico (Azor et al., 2007).

En otro estudio se utilizó la natamicina y voriconazol, en *Fusarium spp*, concluyendo que la natamicina tiene una mala penetración, puesto que es escasa en presencia

de un epitelio intacto, aunque se cree que el desbridamiento aumenta su penetración, mientras que el VOR puede penetrar más profundamente en el estroma corneal, logrando así concentraciones terapéuticas de manera más eficiente. Estas diferencias en la dosificación y la penetración pueden afectar la eficacia del medicamento (Lalitha et al., 2012).

Estudios realizados en el género *Neocosmospora*, han evidenciado que puede ser resistente a las equinocandinas, aunque la susceptibilidad AMP e ITR puede variar. En el caso de *F. solani* posee una susceptibilidad reducida a los antifúngicos, principalmente AMP. Por otra parte, el uso de este antifúngico 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 (Lortholary et al., 2010).

Por último, cuando ocurre un problema ocular en muchos países y basándonos en México, la identificación de hongos patógenos oculares es una opción sólo en unos pocos casos. Un diagnóstico oportuno y temprano es importante en infecciones localizadas como la queratitis para prevenir una infección generalizada con hongos como *Fusarium* o *Neocosmospora*



## 9 Conclusión

En México existe muy poca investigación acerca de las especies *Fusarium*, por ende, se tiene poca información y conocimiento acerca de las especies patógenas. En este estudio demostramos que los aislados clínicos analizados pertenecen al género *Neocosmospora*, sin embargo, se puede confundir fácilmente con el género *Fusarium*. Pues en algunas ocasiones siguen usando el género *Fusarium* para referirse a los casos de *Neocosmospora* provocando un mal diagnóstico o al auto medicarse, llega a agravarse la situación clínica de los pacientes.

Las pruebas de susceptibilidad antifúngicos mostraron que el uso de itraconazol como primer antibiótico no es conveniente en todos los casos de micosis debido a la tolerancia de los hongos. Y que la anfotericina resulta ser más eficiente en algunos aislados. Es prudente considerar la resistencia a antifúngicos en el diagnóstico y tratamiento de micosis para así poder obtener los resultados deseados en la salud humana.

El presente trabajo es un esfuerzo en conjunto de médicos e investigadores para generar conocimiento sobre la identificación y el tratamiento de hongos patógenos en humanos, los cuales cada vez se vuelven más comunes en personas sanas.

## 10 Bibliografía

1. Alastruey-Izquierdo A., Cuenca-Estrella M., Monzón A., Mellado E. y J.L. Rodríguez- Tudela. 2008. Antifungal susceptibility profile of clinical *Fusarium spp.* isolates identified by molecular methods. *J. Antimicro. Chemother.* 61:805-809.
2. Arenas R. 2008. *Micología médica ilustrada. Tercera Edición.* Editorial McGraw Hill México D.F. 410 pp.
3. Azor M, Gené J, Cano J, Guarro J. 2007. Universal in vitro antifungal resistance of genetic clades of the *Fusarium solani* species complex. *Antimicrob Agents Chemother*; 51:1500-3
4. Bassetti M, De Waele J, Eggimann P, Garnacho-Montero J, Kahlmeter G, Menichetti F, Nicolau D, Paiva J, Tumbarello M, Welte T, Wilcox M, Zahar J, Poulakou G. 2015. Preventive and therapeutic strategies in critically ill patients with highly resistant bacteria. *Intensive Care Med.*41(5):776-95. doi: 10.1007/s00134-015-3719-z.
5. Calvillo-Medina R.P., Martínez-Neria M., Mena-Portales J., Barba-Escoto L., Raymundo T., Campos-Guillén J., Jones G.H., Reyes-Grajeda J.P., González-y-Merchand J.A. & Bautista-de Lucio V.M. 2019. Identification and biofilm development by a new fungal keratitis aetiologic agent. *Mycoses* 62. <https://doi.org/10.1111/myc.12849>
6. Calvillo-Medina RP., Reyes-Grajeda JP., Barba-Escoto L., Bautista-Hernández LA., Campos-Guillén J., Jones GH., Bautista-de Lucio VM. 2019. Proteome analysis of biofilm produced by a *Fusarium falciforme* keratitis infectious agent. *Microb Pathog.* 2019;130:232-241. doi:10.1016/j.micpath.03.001
7. Castellanos-Franco, T., Muñoz-Solórzano, B., Saucedo-Rodríguez, L., Becerra-Cota, M. 2017. Queratitis infecciosas en el Hospital Civil de Guadalajara Fray Antonio Alcalde. *Revista Médica MD.* Disponible en; <https://www.medigraphic.com/pdfs/revmed/md-2017/md1711.pdf>
8. Corzo -Leon D.E., Alvarado-Matute T., Colombo A.L., Cornejo-Juarez P., Cortes J., Echevarria J.I., Guzman-Blanco M., Macias A.E., Nucci M., Ostrosky-Zeichner L., Ponce-de-Leon A., Queiroz-Telles F., Santolaya M.E., Thompson-Moya L., Tiraboschi, I.N., Zurita, J. & Sifuentes-Osornio, J. 2014. Surveillance of *Candida spp* bloodstream infections: Epidemiological trends and risk factors of death in two Mexican tertiary care hospitals. *PLoS ONE* 9: 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097325>
9. Crous P. W., Slippers B. y M. J. Wingfield 2006. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Stud Mycol.* 55: 235–253.
10. Diepeningen, A. D., Al-Hatmi, A. M., Brankovics, B., & Hoog, G. S. (2014). *Taxonomy and Clinical Spectra of Fusarium Species: Where Do We Stand in 2014*
11. Dignani M.C y E. Anaissie. 2004. Human fusariosis. *Clin. Microbial. Infect.* 10:67-75
12. Donlan R., Costerton J. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms, *Clin. Microbiol. Rev.* 167–193.

13. Dyavaiah M., R. Ramani D., Ritterband, M. K. Shah, W. A. Samsonoff, S. Chaturvedi, y V. Chaturvedi. 2007. Molecular characterization, biofilm analysis and experimental biofouling study of *Fusarium isolates* from recent cases of fungal keratitis in New York State. *BMC Ophthalmology*. 7:1.
14. Eswarappa A., Mahesh P., Vijay Varma., Rakesh Madhyastha., Sujeeth Reddy, M. S. Gireesh, K. C. Gurudev, Vijaya V. Mysorekar, y Beena Hemanth. 2015. Unusual fungal infections in renal transplant recipients. *Case Rep Transplant*. 292307:1-4.
15. Geiser DM, Aoki T, Bacon CW, Baker SE, Bhattacharyya MK, Brandt ME, Brown DW, Burgess LW, Chulze S, Coleman JJ, Correll JC, Covert SF, Crous PW, Cuomo CA, De Hoog GS, Di Pietro A, Elmer WH, Epstein L, Frandsen RJN, Freeman S, Gagkaeva T, Glenn AE, Gordon TR, Gregory NF, Hammond-Kosack KE, Hanson LE, Jiménez-Gasco MDM, Kang S, Kistler HC, Kuldau GA, Leslie JF, Logrieco A, Lu G, Lysøe E, Ma LJ, McCormick SP, Migheli Q, Moretti A, Munaut F, O'Donnell K, Pfenning L, Ploetz RC, Proctor RH, Rehner SA, Robert VARG, Rooney AP, Bin Salleh B, Scandiani MM, Scaufaire J, Short DPG, et al. . 2013. Un hongo, un nombre: definir el género *Fusarium* de una manera científicamente sólida que preserva el uso prolongado . *Fitopatología* 103: 400–408. doi: 10.1094 / PHYTO-07-12-0150-LE.
16. Gomes E.C.Q., Godinho V.M., Silva D.A.S., de Paula M.T.R. Vitoreli, G.A. y C.L. Zani. 2018. Cultivable fungi present in Antarctic soils: taxonomy, phylogeny, diversity, and bioprospecting of antiparasitic and herbicidal metabolites. *Extremophiles*. 3:381-393.
17. González-Ramírez A. I., Ramírez-Granillo A., Medina-Canales M. G., Rodríguez-Tovar A. V., y M. M. Martínez-Rivera. 2016. Analysis and description of the stages of *Aspergillus fumigatus* biofilm formation using scanning electron microscopy. *BMC Microbiol*. 16: 243
18. Gouy J., Phookamsak R., y M. Doilom. 2012. Towards a natural classification of Botryosphaerales, *Fungal Divers*. 57: 149–210.
19. Gräfenhan T, Schroers HJ, Nirenberg HI, et al. (2011). An overview of the taxonomy, phylogeny, and typification of nectriaceous fungi in *Cosmospora*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Stilbella*, and *Volutella*. *Studies in Mycology* 68: 79–113.
20. Guarro J. 2012. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. ; 30:33-9.
21. Guarro J. y J. Gene. 1995. Opportunistic *fusarial* infections in humans. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. 14:741–754.
22. Hernandez-Camarena JC, Graue-Hernandez EO, Ortiz-Casas M, Ramirez-Miranda, A, Navas A, Pedro-Aguilar L, Bautista-de Lucio, VM. 2015. Trends in microbiological and antibiotic sensitivity patterns in infectious keratitis: 10-year experience in Mexico City. *Cornea*.; 34:778-785. doi:10.1097/ico.0000000000000428
23. Jabra-Rizk M.A., Falkler W.A. y T.F. Meiller. 2004. Fungal biofilms and drug resistance. *Emerg. Infect. Dis*. 10:14.19.
24. Köhler J. R., Casadevall A., y Perfect J. 2015. The spectrum of fungi that infects humans *Cold. Spring Harb. Perspect. Med*. 3:1-5

25. Kniemeyer O. 2011. Proteomics of eukaryotic microorganisms: The medically and biotechnologically important fungal genus *Aspergillus*. *Proteomics*. 11:3232–3243.
26. Kredics L., Narendran V., Shobana, C. S., Vágvölgyi C. y Manikandan P. 2015. Filamentous fungal infections of the cornea: a global overview of epidemiology and drug sensitivity. *Mycoses*. 58:243–260.
27. Lalitha P, Prajna NV, Oldenburg CE, Srinivasan M, Krishnan T, . . 2012. Organism, minimum inhibitory concentration, and outcome in a fungal corneal ulcer clinical trial. *Córnea*; 31:662-7.
28. Larkin M., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., y D.G. Higgins. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23:2947-2948.
29. Leslie, J., Summerell, B, 2006. El manual de laboratorio de *Fusarium*. Blackwell Publishing Ltd. Disponible en; [https://books.google.com.mx/books?hl=en&lr=&id=Yu3cBAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR3&ots=3Lb3NVh1p&sig=VIQv5KSc05YkwnKczIODIDdYjE&redir\\_esc=#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.mx/books?hl=en&lr=&id=Yu3cBAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR3&ots=3Lb3NVh1p&sig=VIQv5KSc05YkwnKczIODIDdYjE&redir_esc=#v=onepage&q&f=false)
30. Lombard L, Van der Merwe NA, Groenewald JZ, et al. (2015). Generic concepts in Nectriaceae. *Studies in Mycology* 80: 189–245.
31. Loussert, C., C. Schmitt, M. C. Prevost, V. Balloy, E. Fadel, B. Philippe, C. Kauffmann- Lacroix, J. P. Latgé, y A. Beauvais. 2010. In vivo biofilm composition of *Aspergillus fumigates*. *Cell. Microbiol.* 12:405–410.
32. Lortholary O, Obenga G, Biswas P, Caillot D, Chachaty E. 2010. International retrospective analysis of 73 cases of invasive fusariosis treated with voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother*; 54:4446-50.
33. Maldonado, I. 2021. Microorganismos nativos para el control de *Fusarium* en el maíz. CIIDIR. Disponible en <https://www.fps.org.mx/portal/index.php/paquetes-tecnologicos/123-maiz/1882-microorganismos-nativos-para-el-control-de-fusarium-en-maiz>
34. Manikandan P., Varga J., y Kocsubé. 2013. Epidemiology of *Aspergillus* keratitis at a tertiary care eye hospital in South-India and antifungal susceptibilities of the causative agents. *Mycoses*. 56:26– 33.
35. Mozón A., Rodríguez J. 2020. Infecciones causadas por el género *Fusarium*. SEIMC. Disponible en; <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/micologia/fusarium.pdf>
36. Muna'aim MA, Saleh RM, Kasim ZM, Isa MM. 2017. An 8-year retrospective review of microbial keratitis in a secondary referral centre in Malaysia. *Malaysian J Med Heal Sci*.13:47-57.
37. Nalim, F., Samuels, G., Wijesundera, R., & Geiser, D. (2011). New species from the *Fusarium solani* species complex derived from perithecia and soil in the Old World tropics. *Mycologia*, 103(6), 1302-1330.
38. Negri, M., Silva, S., Capoci IR., Azeredo J., Henriques M. 2016. *Candida tropicalis* Biofilms: Biomass, Metabolic Activity and Secreted Aspartyl Proteinase Production. *Mycopathologia*. 181(3-4):217-224. doi:10.1007/s11046-015-9964-4

39. O'Donnell K. 2000. Filogenia molecular del complejo de especies *Nectria haematococca* - *Fusarium solani* . Mycologia 92 : 919–938. doi: 10.1080 / 00275514.2000.12061237
40. Ponce-Angulo DG, Bautista-Hernández LA, Calvillo-Medina RP, Castro-Tecorral FI, Aparicio-Ozores G, López-Villegas EO, Ribas-Aparicio RM, Bautista-de Lucio VM. 2019. Microscopic characterization of biofilm in mixed keratitis in a novel murine model. Microb Pathog. 2020;140:103953. doi:10.1016/j.micpath.103953
41. Robbins P., Uppuluri J., Nett, R., Rajendran G., Ramage A. 2011. Hsp90 governs dispersion and drug resistance of fungal biofilms, PLoS Pathog. 7 (9)
42. Rodríguez, F. 2014. La proyección macular, un nuevo método para determinar la agudeza visual potencial. Universidad de Girona. Disponible en; <https://www.tdx.cat/handle/10803/134734>
43. Sandoval, M., Crous, PW. 2018. Removing chaos from confusion: assigning names to common human and animal pathogens in *Neocosmospora* NCBI. Disponible en; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6344815/>
44. Seyedmousavi S., Netea M. G., Mouton J. W., Melchers W. J. G. Verweij, P. E. y G.S. de Hoog. 2014. Black Yeasts and Their Filamentous Relatives: Principles of Pathogenesis and Host Defense. Clin. Microbiol. Rev. 27:527–542.
45. Shobana, C. S., Mythili, A., Homa, M., Galgóczy, L., Priya, R., Singh, Y. B. y P. Manikandan,. 2014. In vitro susceptibility of filamentous fungi from mycotic keratitis to azole drugs. J. Med. Mycol. 25:44–49.
46. Stone D, Tan JF. 2014. Fungal Keratitis: Update for 2014. Curr Ophthalmol Rep. ;2(3):129-136. doi:10.1007/s40135-014-0047-3
47. Tang J., Iliiev, I. D., Brown, J., Underhill, D. M., y V. A. Funari. 2015. Mycobiome: Approaches to Analysis of Intestinal Fungi. J. Immunological Meth. 3:285-292.
48. Valencia, M. (2009). Caracterización enzimática de cepas de *Fusarium* aisladas de lesiones de animales, humanos y plantas. Pontificia Universidad Javeriana
49. Vilgalys R, Hester M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. J Bacteriol. 1990. 172:4238-4246
50. Villanueva, P. 2019. Aislamiento, identificación y caracterización de hongos extremófilos del complejo volcánico iztaccíhuatl. UAQ. FQ-0034-Patricia Isabel Villanueva García.pdf
51. Villena G. K. y M., Gutiérrez-Correa. 2007. Morphological patterns of *Aspergillus niger* biofilms and pellets related to lignocellulolytic enzyme productivities. Lett. Appli. Microbiol. 45:231-237.
52. Zhang N, O' Donnell K, Sutton DA, Nalim FA, Summerbell RC, Padhye AA, Geiser DM. 2006 Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment. J Clin Microbiol; 44:2186-90.

# 11 Apéndices

## Apéndice 1 Secuencias generadas en este proyecto

### 1.1 IOM 325366 ITS (MW652630)

>Seq1

GCTTCCGACTACACTCATCACCTGTGACATACCTAAAACGTTGCTTCGGCGGGAACAGACGG  
CCCTGTAACAACGGGCCGCCCCGCCAGAGGACCCCTAACTCTGTTTTTATAATGTTTTCTGA  
GTAAACAAGCAAATAAATTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAA  
CGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGC  
ACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTACAACCCTCAGGC  
CCCCGGGCCTGGCGTTGGGGATCGGCGGAAGCCCCCTGTGGGCACACGCCGTCCCTCAAAT  
ACAGTGGCGGTCCCGCCGCGAGCTTCCATTGCGTAGTAGCTAACACCTCGCAACTGGAGAGCG  
GCGCGGCCATGCCGTAAAACACCCAACCTTCTGAA

### 1.2 IOM 325366 ITS (MW652631)

>Seq2

GCTTCCGACTACACTCATCACCTGTGACATACCTAAAACGTTGCTTCGGCGGGAACAGACGG  
CCCTGTAACAACGGGCCGCCCCGCCAGAGGACCCCTAACTCTGTTTTTATAATGTTTTCTGA  
GTAAACAAGCAAATAAATTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAA  
CGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGC  
ACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTACAACCCTCAGGC  
CCCCGGGCCTGGCGTTGGGGATCGGCGGAAGCCCCCTGTGGGCACACGCCGTCCCTCAAAT  
ACAGTGGCGGTCCCGCCGCGAGCTTCCATTGCGTAGTAGCTAACACCTCGCAACTGGAGAGCG  
GCGCGGCCATGCCGTAAAACACCCAACCTTCTGAA

### 1.3 IOM 325366 LSU(MW652638)

>Seq1

CAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTC  
TCGGGCCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTTTTGGTGAAGTGCCTTCCGAGTTCCTGGAA  
CGGGACGCCATAGAGGGTGAGAGCCCCGTCTGGTTGGACACCGATCCTCTGTAAAGCTCCTT  
CGACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCTCTAAATGGGAGGTATATGTCTTCTAAAGCTAAAT  
ACCGGCCAGAGACCGATAGCGCACAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGA  
GAGTTAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGTGACCAGACTTGGGCTTGGTTG  
ATCATCCGGGGTTCTCCCCGGTGCACCTTCCGGCTCAGGCCAGCATCAGTTCGCCCTGGGG  
GATAAAGGCTTCGGGAATGTGGCTCTCTCCGGGGAGT

### 1.4 IOM 325366 LSU(MW652639)

>Seq2

CAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTC  
TCGGGCCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTTTTGGTGAAGTGCCTTCCGAGTTCCTGGAA  
CGGGACGCCATAGAGGGTGAGAGCCCCGTCTGGTTGGACACCGATCCTCTGTAAAGCTCCTT  
CGACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCTCTAAATGGGAGGTATATGTCTTCTAAAGCTAAAT  
ACCGGCCAGAGACCGATAGCGCACAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGA  
GAGTTAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGTGACCAGACTTGGGCTTGGTTG  
ATCATCCGGGGTTCTCCCCGGTGCACCTTCCGGCTCAGGCCAGCATCAGTTCGCCCTGGGG  
GATAAAGGCTTCGGGAATGTGGCTCTCTCCGGGGAGTGTAT

## 1.5 IOM 325366 EF1 $\alpha$

>Seq1

GTCGTGTCATCGGCACGTCGACTCTGGCAGTCGACCACCGTAAGTCAAACCCTCATCGCGATC  
TGCTTATCTCGGGTCGTGGAACCCCGCCTGGCATCTCGGGCGGGGTATTCATCATTCACTTCA  
TGCTGACAATCATCTACAGACCGGTCACTTGATCTACCAGTGCGGTGGTATCGACAAGCGAAC  
CATCGAGAAGTTCGAGAAGGTTGGTGACATCTCCCCGATCGCGCCTTGATATTCCACATCGA  
ATTCCCCGTCGAATCCCTCCATCGCGATACGCTCTGCGCCCGCTTCTCCCGAGTCCCAAAT  
TTTTGCGGTCCGACCGTAATTTTTTTTTGGTGGGGCATTACCCCGCCACTCGGGCGACGTTGG  
ACAAAGCCCTGATCCCTGCACACAAAAACACCAACCCTCTTGCGCGCATCATCACGTGGTT  
CACGACAGACGCTAACCGGTCCAACAATAGGAAGCCGCTGAGCTCGGTAAGGGTTCCTTCAA  
GTACGCCTGGGTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTG  
CCCTCTGGAAGTTCGAGACTCCCCGCTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTGCTGTACCTCT  
CTCACACATGTCTCACCCTAACAAATCAACAGACGCCCCCGGCCACCGTG

## 1.6 IOM 325366 EF1 $\alpha$

>Seq2

GTCGTGTCATCGGCACGTCGACTCTGGCAGTCGACCACCGTAAGTCAAACCCTCATCGCGATC  
TGCTTATCTCGGGTCGTGGAACCCCGCCTGGCATCTCGGGCGGGGTATTCATCATTCACTTCA  
TGCTGACAATCATCTACAGACCGGTCACTTGATCTACCAGTGCGGTGGTATCGACAAGCGAAC  
CATCGAGAAGTTCGAGAAGGTTGGTGACATCTCCCCGATCGCGCCTTGATATTCCACATCGA  
ATTCCCCGTCGAATCCCTCCATCGCGATACGCTCTGCGCCCGCTTCTCCCGAGTCCCAAAT  
TTTTGCGGTCCGACCGTAATTTTTTTTTGGTGGGGCATTACCCCGCCACTCGGGCGACGTTGG  
ACAAAGCCCTGATCCCTGCACACAAAAACACCAACCCTCTTGCGCGCATCATCACGTGGTT  
CACGACAGACGCTAACCGGTCCAACAATAGGAAGCCGCTGAGCTCGGTAAGGGTTCCTTCAA  
GTACGCCTGGGTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTG  
CCCTCTGGAAGTTCGAGACTCCCCGCTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTGCTGTACCTCT  
CTCACACATGTCTCACCCTAACAAATCAACAGACGCCCCCGGCCACCGTG

## 2.1 IOM 325367 ITS(MW652632)

>Seq1

CCTGCGGACTATCACTCATCACCCCTGTGACATACCTAAACGTTGCTTCGGCGGGAATAGACGG  
CCCCGTGAAACGGGCGGCCCGCCAGAGGACCCCTAACTCTGTTTCTATAATGTTTCTTCTG  
AGTAAACAAGCAAATAAATTAACACTTTCAACAACGGATCTCTTGCTCTGGCATCGATGAAG  
AACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC  
GCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACAACCCTCAG  
GCCCCGGGCTGGCGTTGGGGATCGGCGGAGCCCCCGTGGGCACACGCCGTCCCCCAA  
ATACAGTGGCGGTCCCGCCGAGCTTCCATCGCGTAGTAGCTAACACCTCGCGACTGGAGAG  
CGGCGCGGCCACGCCGTAAACACCCAACCTCTTCTGAA

## 2.2 IOM 325367 ITS(MW652633)

>Seq2

CCTGCGGACTATCACTCATCACCCCTGTGACATACCTAAACGTTGCTTCGGCGGGAATAGACGG  
CCCCGTGAAACGGGCGGCCCGCCAGAGGACCCCTAACTCTGTTTCTATAATGTTTCTTCTG  
AGTAAACAAGCAAATAAATTAACACTTTCAACAACGGATCTCTTGCTCTGGCATCGATGAAG  
AACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC  
GCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACAACCCTCAG  
GCCCCGGGCTGGCGTTGGGGATCGGCGGAGCCCCCGTGGGCACACGCCGTCCCCCAA  
ATACAGTGGCGGTCCCGCCGAGCTTCCATCGCGTAGTAGCTAACACTCGCGACTGGAGAGC  
GGCGCGGCCACGCCGTAAACACCCAACCTCTTCTGAA

### 2.3 IOM 325367 LSU(MW652640)

>Seq1

CAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTC  
TCGGGCCCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTTTGGTGAGGTGCCTTCCGAGTTCCTGGAA  
CGGGACGCCATAGAGGGTGAGAGCCCCGTCTGGTTGGACGCCGAACCTCTGTAAAGCTCCTT  
CGACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCTCTAAATGGGAGGTATATGTCTTCTAAAGCTAAAT  
ACCGGCCAGAGACCGATAGCGCACAAGTAGAGTGATCGAAAAGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGA  
GAGTTAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGTGACCAGACTTGGGCTTGTTG  
ATCATCCGGGGTTCTCCCCGGTGCACCTTCCGGGCCAGGCCAGCATCAGTTCGCCCTGGGG  
GACAAAGGCTTCGGGAACGTGGCTCTCTCCGGGGAGTGTTAT

### 2.4 IOM 325367 LSU(MW652641)

>Seq2

CAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTC  
TCGGGCCCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTTTGGTGAGGTGCCTTCCGAGTTCCTGGAA  
CGGGACGCCATAGAGGGTGAGAGCCCCGTCTGGTTGGACGCCGAACCTCTGTAAAGCTCCTT  
CGACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCTCTAAATGGGAGGTATATGTCTTCTAAAGCTAAAT  
ACCGGCCAGAGACCGATAGCGCACAAGTAGAGTGATCGAAAAGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGA  
GAGTTAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGTGACCAGACTTGGGCTTGTTG  
ATCATCCGGGGTTCTCCCCGGTGCACCTTCCGGGCCAGGCCAGCATCAGTTCGCCCTGGGG  
GACAAAGGCTTCGGGAACGTGGCTCTCTCCGGGGAGTGTTAT

### 2.5 IOM 325367 EF1 $\alpha$

>Seq1

TCGTCGTCATCGGCACGTGACTCTGGCAGTCGACCACCGTAAGTCAAACCCTCATCGCGATC  
TGCTTATCTCGGGTCGTGGAACCCCGCCTGGTATCTCGGGCGGGGTATTTCATCAGTCACTTCA  
TGCTGACAATCATCTACAGACCGGTCACTTGATCTACCAGTGCGGTGGTATCGACAAGCGAAC  
CATCGAGAAGTTCGAGAAGGTTGGTGACATCTCCCCGATCGCGCCTTGCTATTCCACATCGA  
ATCCCCTCCTCCGCGACACGCTCTGCGCCCGCTTCTCCCGAGTCCCAAAAATTTTGCGGTTCCG  
ACCGTAATTTTTTTTTTGGTGGGGCATCTACCCCGCCACTCGGGCGACGTTGGACAAAGCCCTG  
ATCCCTGCACACAAAAACACCAAACCCTCTTGGCGCGCATCACGTGGTTCACAACAGACTG  
ACTGGTTCAACAATAGGAAGCCGCTGAGCTCGGCAAGGGTTCCTTCAAGTACGCCTGGGTTCT  
TGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTTCGA  
GACTCCCCGCTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTCGCCGTCATGTCTCTCTCACTCACGTCTC  
ATCACTAACAATAAACAGACGCCCCCGGCCACCGTG

### 2.6 IOM 325367 EF1 $\alpha$

>Seq2

TCGTCGTCATCGGCACGTGACTCTGGCAGTCGACCACCGTAAGTCAAACCCTCATCGCGATC  
TGCTTATCTCGGGTCGTGGAACCCCGCCTGGTATCTCGGGCGGGGTATTTCATCAGTCACTTCA  
TGCTGACAATCATCTACAGACCGGTCACTTGATCTACCAGTGCGGTGGTATCGACAAGCGAAC  
CATCGAGAAGTTCGAGAAGGTTGGTGACATCTCCCCGATCGCGCCTTGCTATTCCACATCGA  
ATCCCCTCCTCCGCGACACGCTCTGCGCCCGCTTCTCCCGAGTCCCAAAAATTTTGCGGTTCCG  
ACCGTAATTTTTTTTTTGGTGGGGCATCTACCCCGCCACTCGGGCGACGTTGGACAAAGCCCTG  
ATCCCTGCACACAAAAACACCAAACCCTCTTGGCGCGCATCACGTGGTTCACAACAGACTG  
ACTGGTTCAACAATAGGAAGCCGCTGAGCTCGGCAAGGGTTCCTTCAAGTACGCCTGGGTTCT  
TGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGATATTGCTCTCTGGAAGTTCGA  
GACTCCCCGCTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTCGCCGTCATGTCTCTCTCACTCACGTCTC  
ATCACTAACAATAAACAGACGCCCCCGGCCACCGTG



### 3.1 IOM 325368 ITS(MW652634)

>Seq1

ACCGGTTACTCATCACCCCTGTGAACATACCTATAACGTTGCCTCGGCGGGAACAGACGGCC  
CCGTAACACGGGCGCCCCCGCCAGAGGACCCCCTAACTCTGTTTCTATAATGTTTCTTCTGA  
GTAAACAAGCAAATAAATTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAA  
CGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGC  
ACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACAACCCTCAGGC  
CCCCGGGCTGGCGTTGGGGATCGGCGGAAGCCCCCTGCGGGCACAACGCCGTCCCCCAA  
TACAGTGGCGGTCCCGCCGCAGCTTCCATTGCGTAGTAGCTAACACCTCGCAACTGGAGAGC  
GGCGCGGCCACGCCGTA AACACCCCAACTTCTGAA

### 3.2 IOM 325368 ITS(MW652635)

>Seq2

ACCGGTTACTCATCACCCCTGTGAACATACCTATAACGTTGCCTCGGCGGGAACAGACGGCC  
CCGTAACACGGGCGCCCCCGCCAGAGGACCCCCTAACTCTGTTTCTATAATGTTTCTTCTGA  
GTAAACAAGCAAATAAATTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAA  
CGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGC  
ACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACAACCCTCAGGC  
CCCCGGGCTGGCGTTGGGGATCGGCGGAAGCCCCCTGCGGGCACAACGCCGTCCCCCAA  
TACAGTGGCGGTCCCGCCGCAGCTTCCATTGCGTAGTAGCTAACACCTCGCAACTGGAGAGC  
GGCGCGGCCACGCCGTA AACACCCCAACTTCTGAA

### 3.3 IOM 325368 LSU(MW652642)

>Seq1

CAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTC  
TCGGGCCCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTTTGGTGAGGTGCCTTCCGAGTTCCTGGAA  
CGGGACGCCATAGAGGGTGAGAGCCCCGTCTGGTTGGACACCGATCCTCTGTAAAGCTCCTT  
CGACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCTCTAAATGGGAGGTATATGTCTTCTAAAGCTAAAT  
ACCGGCCAGAGACCGATAGCGCACAAGTAGAGTGATCGAAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGA  
GAGTTAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGTGACCAGACTTGGGCTTGGTTG  
ATCATCCGGGGTTCTCCCCGTGCACTCTTCCGGCTCAGGCCAGCATCAGTTCCGCCCTGGGG  
GATAAAGGCTTCGGGAATGTGGCTCTCTCCGGGGAGTGTTAT

### 3.4 IOM 325368 LSU(MW652643)

>Seq2

CAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTC  
TCGGGCCCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTTTGGTGAGGTGCCTTCCGAGTTCCTGGAA  
CGGGACGCCATAGAGGGTGAGAGCCCCGTCTGGTTGGACACCGATCCTCTGTAAAGCTCCTT  
CGACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCTCTAAATGGGAGGTATATGTCTTCTAAAGCTAAAT  
ACCGGCCAGAGACCGATAGCGCACAAGTAGAGTGATCGAAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGA  
GAGTTAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGTGACCAGACTTGGGCTTGGTTG  
ATCATCCGGGGTTCTCCCCGTGCACTCTTCCGGCTCAGGCCAGCATCAGTTCCGCCCTGGGG  
GATAAAGGCTTCGGGAATGTGGCTCTCTCCGGGGAGTGTTAT

### 3.5 IOM 325368 EF1 $\alpha$

>Seq1

CTCATGTCATCGGCACGTCGACTCTGGCAGTCGACCACCGTAAGTCAAACCCTCATCGCGATC  
TGCTTATCTCGGGTCGTGGAACCCCGCCTGGCATCTCGGGCGGGTATTTCATCAGTCACTTCA  
TGCTGACAATCATCTACAGACCGGTCACTTGATCTACCAGTGCGGTGGTATCGACAAGCGAAC

CATCGAGAAGTTCGAGAAGGTTGGTGACATCTCCCCGATCGCGCCTTGCTATTCCACAACGA  
ATTCCCTCCCTCGCGATACGCTCTGCGCCCGCTTCTCCCGAGTCCCAAATTTTTGCGGTCCG  
ACCGTAATTTTTTTGGTGGGGCATTACCCCGCCACTCGGGCGACGTTGGACAAAGCCCTGA  
TCCCTGCACACAAAAACCAAACCCTCTTGCGCGCATCATCACGTGGCTCACAACAGACGC  
TAACCGGTCCAACAATAGGAAGCCGCTGAGCTCGGTAAGGGTTCCTTCAAGTACGCCTGGGT  
CCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTT  
CGAGACTCCCCGCTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTGCTGTCACCTCTGTACACATGTCT  
CACCACTAACAAATCAACAGACGCCCCCGGCCACCGTG

### 3.6 IOM 325368 EF1 $\alpha$

>Seq1

CTCATGTCATCGGCACGTGCGACTCTGGCAGTCGACCACCGTAAGTCAAACCCTCATCGCGATC  
TGCTTATCTCGGGTCGTGGAACCCCGCCTGGCATCTCGGGCGGGGTATTCATCAGTCACTTCA  
TGCTGACAATCATCTACAGACCGGTCACTTGATCTACCAGTGCGGTGGTATCGACAAGCGAAC  
CATCGAGAAGTTCGAGAAGGTTGGTGACATCTCCCCGATCGCGCCTTGCTATTCCACAACGA  
ATTCCCTCCCTCGCGATACGCTCTGCGCCCGCTTCTCCCGAGTCCCAAATTTTTGCGGTCCG  
ACCGTAATTTTTTTGGTGGGGCATTACCCCGCCACTCGGGCGACGTTGGACAAAGCCCTGA  
TCCCTGCACACAAAAACCAAACCCTCTTGCGCGCATCATCACGTGGCTCACAACAGACGC  
TAACCGGTCCAACAATAGGAAGCCGCTGAGCTCGGTAAGGGTTCCTTCAAGTACGCCTGGGT  
CCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTT  
CGAGACTCCCCGCTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTGCTGTCACCTCTGTACACATGTCT  
CACCACTAACAAATCAACAGACGCCCCCGGCCACCGTG

### 4.1 IOM 325369 ITS(MW652636)

>Seq1

TGCGGTGCTATCACTCATCACCTGTGACATACCTATAACGTTGCCTCGGCGGGAACAGACGG  
CCCCGTAACACGGGCCGCCCGCCAGAGGACCCCTAACTCTGTTTCTATAATGTTTCTTCT  
GAGTAAACAAGCAAATAAATTA AAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAG  
AACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC  
GCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACAACCCTCAG  
GCCCCGGGCCTGGCGTTGGGGATCGGCGGAAGCCCCCTGCGGGCACAACGCCGTCCCCC  
AAATACAGTGGCGGTCCCGCCGCGAGTTCCATTGCGTAGTAGCTAACACCTCGCAACTGGAGA  
GCGGCGCGGCCACGCCGTAAAACACCCA ACTTCTGAA

### 4.2 IOM 325369 ITS(MW652637)

>Seq2

TGCGGTGCTATCACTCATCACCTGTGACATACCTATAACGTTGCCTCGGCGGGAACAGACGG  
CCCCGTAACACGGGCCGCCCGCCAGAGGACCCCTAACTCTGTTTCTATAATGTTTCTTCT  
GAGTAAACAAGCAAATAAATTA AAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAG  
AACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC  
GCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACAACCCTCAG  
GCCCCGGGCCTGGCGTTGGGGATCGGCGGAAGCCCCCTGCGGGCACAACGCCGTCCCCC  
AAATACAGTGGCGGTCCCGCCGCGAGTTCCATTGCGTAGTAGCTAACACCTCGCAACTGGAGA  
GCGGCGCGGCCACGCCGTAAAACACCCA ACTTCTGAA

### 4.3 IOM 325369 LSU(MW652644)

>Seq1

CAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTC  
TCGGGCCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTTTGGTGAAGTGCCTTCCGAGTTCCTGGAA  
CGGGACGCCATAGAGGGTGAGAGCCCCGTCTGGTTGGACACCGATCCTCTGTAAAGCTCCTT  
CGACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCTCTAAATGGGAGGTATATGTCTTCTAAAGCTAAAT

ACCGGCCAGAGACCGATAGCGCACAAGTAGAGTGATCGAAAAGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGA  
GAGTTAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGTGACCAGACTTTGGGCTTGTTG  
ATCATCCGGGGTTCTCCCCGGTGCACCTCTCCGGCTCAGGCCAGCATCAGTTCCGCCCTGGGG  
GATAAAGGCTTCGGGAATGTGGCTCTCTCCGGGGAGTGTTAT

#### 4.4 IOM 325369 LSU(MW652645)

>Seq2

CAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTC  
TCGGGCCCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTTTTGGTGAGGTGCCTTCCGAGTTCCCTGGAA  
CGGGACGCCATAGAGGGTGAGAGCCCCGTCTGGTTGGACACCGATCCTCTGTAAAGCTCCTT  
CGACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCTCTAAATGGGAGGTATATGTCTTCTAAAGCTAAAT  
ACCGGCCAGAGACCGATAGCGCACAAGTAGAGTGATCGAAAAGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGA  
GAGTTAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGTGACCAGACTTTGGGCTTGTTG  
ATCATCCGGGGTTCTCCCCGGTGCACCTCTCCGGCTCAGGCCAGCATCAGTTCCGCCCTGGGG  
GATAAAGGCTTCGGGAATGTGGCTCTCTCCGGGGAGTGTTAT

#### 4.5 IOM 325369 EF1 $\alpha$

>Seq1

AGATAAAAAGTCTCCCAGTAGACTCTGAGACCTCTTTTAGTTCCCAAGCATCTCGAGATCTGC  
TTATTACATTTCTCGGATCCCGCCTGGCTAGCTGTGAGGAATTCATAAACAAGCTTACGCTAA  
CAATCTTATAACCGACCGGAAACTTCTTCTCCTTTTGTCTTTTCTATTGTAGATGAAATATCGAGA  
AGTTAAAGAAGGTTGGAGACATCTCATGCAATCGCGACTTGTAAATCCACTACTTACACGCTCC  
CTCTAGATCCGCTATGAGCCCGCTTCTCTTTTCCCTCCAAAATCTTTGCGGTCTCACCAGAAAATC  
TTTTTTGGTGGCTTTTTTCTTTTTCCGCTCGGGCGACATTGGAAAAAACCTTGACCCCTGCATT  
CCAATTTCTCAAACCCTATTGGCGCGCATCACCACGATTTCCACAACAGATCTTTATCGGTCAA  
ACAATAGGAAACCGCTGAGCTCGGTAAGGGTTCCTTCAAGTACGCCTGGGTCTTGACAAGCT  
CAAGGCCGAACGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTTCGAGACTCCCC  
GCTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTGCTGTCACCTCTGTCACACATGTCTCACCCTAACA  
ATCAACAGACGCCCCCGGCCACCG

#### 4.6 IOM 325369 EF1 $\alpha$

>Seq2

AGATAAAAAGTCTCCCAGTAGACTCTGAGACCTCTTTTAGTTCCCAAGCATCTCGAGATCTGC  
TTATTACATTTCTCGGATCCCGCCTGGCTAGCTGTGAGGAATTCATAAACAAGCTTACGCTAA  
CAATCTTATAACCGACCGGAAACTTCTTCTCCTTTTGTCTTTTCTATTGTAGATGAAATATCGAGA  
AGTTAAAGAAGGTTGGAGACATCTCATGCAATCGCGACTTGTAAATCCACTACTTACACGCTCC  
CTCTAGATCCGCTATGAGCCCGCTTCTCTTTTCCCTCCAAAATCTTTGCGGTCTCACCAGAAAATC  
TTTTTTGGTGGCTTTTTTCTTTTTCCGCTCGGGCGACATTGGAAAAAACCTTGACCCCTGCATT  
CCAATTTCTCAAACCCTATTGGCGCGCATCACCACGATTTCCACAACAGATCTTTATCGGTCAA  
ACAATAGGAAACCGCTGAGCTCGGTAAGGGTTCCTTCAAGTACGCCTGGGTCTTGACAAGCT  
CAAGGCCGAACGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTTCGAGACTCCCC  
GCTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTGCTGTCACCTCTGTCACACATGTCTCACCCTAACA  
ATCAACAGACGCCCCCGGCCACCGTG

## Apéndice 2 Carta del comité de ética en investigación.



### Instituto de Oftalmología "Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana IAP"®

Ciudad de México, a 10 de enero del 2018.

Dr. Victor Manuel Bautista de Lucio  
Departamento de Microbiología y Proteómica Ocular  
Presente

Mediante este conducto me permito informarle que el protocolo sometido por Ustedes a revisión por el Comité de Ética en Investigación de esta Institución titulado: "Identificación y caracterización de aislados fúngicos oculares en humanos, pertenecientes al género *Fusarium* sp." (CEI-2018/01/05), se APROBÓ.

De acuerdo a los lineamientos establecidos por este comité le notifico que la vigencia de esta carta es por un año. Asimismo, se le solicita que realice y entregue un reporte a los seis meses y así mismo informar cuando sea concluido.

(Subir información en la liga <http://www.unidaddeinvestigacion.org/comites/reporte-de-avances/>).

Aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente,

  
Dr. Yonathan O. Garfias Becerra  
Presidente, Comité de Ética en Investigación  
Instituto de Oftalmología  
"Fundación de Asistencia Privada  
Conde Valenciana IAP".

**COMITÉ DE ÉTICA EN  
INVESTIGACIÓN**

Número de Registro

**CONBIOÉTICA-09-CEI-023-20160830**



Chimalpopoca 14 Colonia Obrera, Delegación Cuauhtemoc. C.P. 06800. Ciudad de México. Teléfono: 5442 - 1700.  
Web: [www.institutodeoftalmologia.org](http://www.institutodeoftalmologia.org) Correo: [buzon@elconde.org](mailto:buzon@elconde.org)

FCV-053-031018

### **Apéndice 3 Consentimiento informado para participar en un estudio de investigación médica.**

Título del protocolo: "Identificación y caracterización de aislados fúngicos oculares en humanos, pertenecientes al género *Fusarium sp.*"

Investigadores principales: Dr. Víctor Manuel Bautista de Lucio

Lugar donde se realizará el estudio: Departamento de Microbiología y Proteínica Ocular,

Unidad de Investigación, Instituto de Oftalmología "Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana IAP"

Nombre del paciente: \_\_\_\_\_

A usted se le está invitando a participar en este estudio de investigación médica. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad de preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto. Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento informado, del cual se le entregará una copia firmada y fechada.

#### **1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.**

En México, la queratitis desarrollada por hongos esta pobremente documentada y entendida, misma que se presenta con alta frecuencia en hospitales de especialidad. Existen pocos trabajos en donde se trate a la queratitis fúngica como un problema importante de salud. La prevalencia de esta enfermedad en un hospital de la Ciudad de México fue del 12% en el periodo de 2002-2012. Las levaduras, principalmente *Candida spp*, es el hongo más frecuentemente encontrado en infecciones oculares en México, seguido de otros géneros como *Fusarium* y *Aspergillus*, también se han descrito otros géneros, pero en una menor frecuencia.

#### **2. OBJETIVO DEL ESTUDIO**

Identificar y caracterizar los aislados fúngicos oculares en humanos, pertenecientes al género *Fusarium sp.*

#### **3. PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO**

En caso de aceptar participar en el estudio se le realizará una exploración oftalmológica completa para posteriormente llevar a cabo la toma de muestra de la superficie ocular con un hisopo de rayón, para posteriormente hacer la siembra de

esta en medios de cultivo especializados para el crecimiento de hongos. Una vez se observe el desarrollo de crecimiento fúngico, este será identificado con base en su morfología colonial y microscópica, para esta última se utilizará la técnica de microcultivo que permitirá la observación del micelio aéreo que contiene las estructuras de reproducción característicos en la identificación a nivel de género y especie. Posteriormente se realizará un análisis molecular y de inferencia filogenética para determinar el género y en su caso la especie del hongo.

#### 4. MOLESTIAS O RIESGOS ASOCIADOS CON EL ESTUDIO

La revisión oftalmológica se llevará a cabo por un especialista, así como la toma de la muestra con el hisopo de rayón, estos procedimientos conllevan un riesgo mínimo para el paciente. La toma de muestra de la superficie ocular puede ocasionar una leve molestia que es transitoria.

#### 5. BENEFICIOS QUE PUEDE OBTENER DEL ESTUDIO

Con este estudio se conocerá con certeza la presencia de hongos del género *Fusarium* en las queratitis fúngicas, mismo que permitirá conocer de manera precisa al agente etiológico y sus características, lo que permitirá el desarrollo de nuevas estrategias de diagnóstico y terapéuticas para el tratamiento de esta enfermedad.

#### 6.- ACLARACIONES:

- Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria
- En el proceso del estudio usted podrá solicitar información sobre cualquier pregunta y/o aclaración de cualquier duda acerca de los procedimientos riesgos y beneficios. Si requiere ampliar información sobre su participación en el estudio puede comunicarse con el investigador responsable del estudio, Dr. Victor Manuel Bautista de Lucio al teléfono 54421700 ext. 3211.
- Si decide participar en el estudio usted puede retirarse en el momento que lo desee, aun cuando el investigador responsable no se lo solicite, pudiendo manifestar o no, las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad. Sin que esto cree perjuicios para continuar su cuidado y tratamiento. (14)
- La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.
- El investigador tiene la obligación de proporcionarle información actualizada sobre los avances del estudio.
- En caso de que usted desarrolle algún efecto adverso secundario no previsto, tiene derecho a una indemnización, siempre que estos efectos sean consecuencia de su participación en el estudio.
- No recibirá pago por su participación y tampoco tendrá un costo.

- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación a participar en este estudio.
- Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la carta de Consentimiento Informado que forma parte de este documento.
- La muestra fecal que usted proporcione será únicamente utilizada para fines de este protocolo y de ningún otro.

## 7. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Acuerdo en participar en este estudio de investigación, entiendo que tengo derecho a retirarme de la investigación, sin perder mis derechos como paciente de este hospital.

Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento. También he sido informado (a) que recibiré de forma gratuita el frasco para la recolección de la muestra fecal, o estudio (s) que se requieran para la investigación:

Nombre de participante: \_\_\_\_\_

Firma del participante \_\_\_\_\_ No. telefónico: \_\_\_\_\_

Domicilio: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

### Testigo 1

Nombre del testigo: \_\_\_\_\_

Parentesco: \_\_\_\_\_

Firma del testigo: \_\_\_\_\_ No. telefónico: \_\_\_\_\_

Domicilio: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

### Testigo 2

Nombre del testigo: \_\_\_\_\_

Parentesco: \_\_\_\_\_

Firma del testigo: \_\_\_\_\_ No. telefónico: \_\_\_\_\_

Domicilio: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

Esta parte debe ser completada por el Investigador (o su representante):

He explicado al Sr(a). \_\_\_\_\_ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he informado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella.

Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

**Nombre del investigador responsable:** \_\_\_\_\_

**Firma del investigador:** \_\_\_\_\_ **No. telefónico:** \_\_\_\_\_

**Domicilio:** \_\_\_\_\_

**Fecha:** \_\_\_\_\_

\* Este Consentimiento Informado ha sido aprobado por unanimidad en el Comité de Ética en Investigación de nuestro Instituto, con fundamento en los Artículos 20, 21, 22 del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud.