

# Identificación fenotípica y molecular de aislamientos clínicos y ambientales de *Fusarium* spp.

Alexandra M. Montoya, Joan Grimaldo y Gloria M. González\*

Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México

## Resumen

**Antecedentes:** *Fusarium* es un género de hongos cuya identificación se basa principalmente en características fenotípicas. Los procedimientos de biología molecular han superado a los convencionales. En México, no existe información de las especies o complejos de los miembros de este hongo. **Objetivo:** Identificar las especies de 116 cepas *Fusarium* spp. obtenidas de muestras clínicas y ambientales. **Material y métodos:** La identificación fenotípica se llevó a cabo en agar dextrosa de Sabouraud, agar papa dextrosa, agar avena, agar Spezzler Nährstoffarmer y agar agua. La identificación molecular se realizó por amplificación y secuenciación de las regiones ITS, factor de elongación 1-alfa, región de RNA polimerasa II subunidad B, y calmodulina. **Resultados:** Solo se identificaron 39 cepas de *Fusarium* spp. mediante características fenotípicas, las cuales fueron confirmadas. Las restantes 77 se reconocieron mediante procedimientos de biología molecular. La secuenciación de ITS fue suficiente para las especies de los complejos *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*. Para la identificación de otras especies, se requirió la secuenciación del factor de elongación 1-alfa, región de ARN polimerasa II subunidad B y/o calmodulina. **Conclusiones:** La identificación fenotípica estuvo limitada frecuentemente por la nula producción de estructuras fúngicas en los cultivos. Son indispensables los procedimientos moleculares para lograr la distinción precisa de las especies de este género.

**PALABRAS CLAVE:** Calmodulina. Factor elongación. *Fusarium*. Identificación fenotípica. ITS. Región de ARN polimerasa II subunidad B.

## Phenotypic and molecular identification of *Fusarium* spp. clinical and environmental isolates

## Abstract

**Background:** *Fusarium* is a genus of fungi whose identification is based primarily on phenotypic characteristics, although molecular identification procedures have outperformed conventional procedures. In Mexico, there is no information on the species or complexes of the members of this genus. **Objective:** To identify the species of a collection of 116 *Fusarium* spp. strains obtained from clinical and environmental samples. **Material and methods:** Phenotypic identification was carried out by morphology analysis of cultures on the following media: Sabouraud dextrose agar, dextrose potato agar, oat agar, Spezzler Nährstoffarmer agar and water agar. Molecular identification was performed by amplification and sequencing of the ITS, TEF1, RPB2 and CL regions. **Results:** Only 39 *Fusarium* strains could be identified at the complex level using phenotypic characteristics. The remaining 77 strains were identified using molecular procedures. In addition, molecular confirmation of identification was sought for the 39 strains already mentioned. ITS sequencing was sufficient for the identification of *F. oxysporum* and *F. solani* complex species. For the identification of other species, the sequencing of TEF1, RPB2 and/or CL was required.

### \*Correspondencia

Gloria M. González

E-mail: gloria.gonzalezgn@uanl.edu.mx

Fecha de recepción: 25-07-2024

Fecha de aceptación: 03-10-2024

DOI: 10.24875/GMM.24000256

Gac Med Mex. 2024;160:554-561

Disponible en PubMed

www.gacetamedicademexico.com

0016-3813/© 2024 Academia Nacional de Medicina de México, A.C. Publicado por Permanyer. Este es un artículo open access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

**Conclusions:** Phenotypic identification was often limited by the lack of fungal structure production when cultured on conventional and some minimal media. Molecular procedures are essential to achieve the precise identification of the species of this genus.

**KEYWORDS:** *Fusarium*, phenotypic identification, ITS, calmodulin, elongation factor, RPB2.

## Introducción

*Fusarium* spp. es un hongo filamentoso que produce hifas hialinas y septadas. Las diversas especies están ampliamente distribuidas en la naturaleza, son saprófitas del suelo y material en descomposición. Este hongo está fuertemente asociado como agente causal de enfermedades en plantas, tanto silvestres como de agricultura. No obstante, algunas especies pueden ocasionar una variedad de manifestaciones clínicas en los seres humanos inmunocompetentes o inmunocomprometidos; estas enfermedades son llamadas hialohifomicosis, por las características del hongo.<sup>1-4</sup> Fusariosis o fusariomicosis son otros términos con los que se le conoce a las infecciones producidas por *Fusarium* spp. Actualmente, se conocen alrededor de 300 especies de este género de microorganismos.<sup>5</sup> Se han descrito 10 complejos de importancia clínica, en los cuales se agrupan alrededor de 70 especies, algunas de ellas aún sin nombre asignado debido a que no se pueden distinguir fenotípicamente (Tabla 1).<sup>6-8</sup> Es precisamente en este género que se empezó a usar la denominación de complejo de especies, integrado por microorganismos crípticos tan cercanos entre sí que aún falta por definir si se trata de nuevas especies.<sup>9</sup>

Las muestras biológicas donde puede aislarse *Fusarium* spp. son muy diversas e incluyen tejidos obtenidos por biopsia, líquido pleural, abdominal, sinovial y peritoneal, ojos, sangre, líquido cefalorraquídeo, especímenes respiratorios, lesiones ulcerativas, etcétera. La obtención de una muestra apropiada es esencial, así como en cantidad suficiente para realizar diversas pruebas (exámenes directos mediante microscopio y cultivos); además, el procesamiento de las muestras dentro de dos a cuatro horas después de recibirse en el laboratorio es crucial para la recuperación de los microorganismos. Estos criterios están establecidos para el procesamiento de estudios microbiológicos en general.

Los cultivos de hongos por lo general se llevan a cabo en agar dextrosa de Sabouraud con o sin antibióticos y con una temperatura de incubación entre

**Tabla 1.** Complejo de especies del género *Fusarium* de importancia clínica

Complejo	Especies
Solani	<i>F. falciforme</i> <i>F. keratoplasticum</i> <i>F. lichenicola</i> <i>F. petrophilum</i> <i>F. pseudensiforme</i> <i>F. solani</i> 18 especies sin nombre
Oxysporum	<i>F. oxysporum</i> 3 especies sin nombre
Incarnatum-equiseti	<i>F. equiseti</i> <i>F. incarnatum</i> 18 especies sin nombre
Fujikuroi	<i>F. acutatum</i> <i>F. ananatum</i> <i>F. andyazi</i> <i>F. fujikuroi</i> <i>F. globosum</i> <i>F. guttiforme</i> <i>F. musae</i> <i>F. napiforme</i> <i>F. nygamai</i> <i>F. proliferatum</i> <i>F. ramigenum</i> <i>F. sacchari</i> <i>F. subglutinans</i> <i>F. temperatum</i> <i>F. thapsinum</i> <i>F. verticillioides</i>
Dimerum	<i>F. delphinoides</i> <i>F. dimerum</i> <i>F. penzigii</i> 2 especies sin nombre
Tricinctum	<i>F. acuminatum</i> <i>F. flocciferum</i> 2 especies sin nombre
Chlamydosporum	<i>F. chlamydosporum</i> 3 especies sin nombre
Concolor	<i>F. anguioides</i> <i>F. austroafricanum</i> <i>F. concolor</i>
Sambucinum	<i>F. armeniacum</i> <i>F. brachygibbosum</i> <i>F. langsethiae</i> <i>F. sporotrichioides</i>
Lateritium	<i>F. cassiae</i> <i>F. lateritium</i> <i>F. magnoliae-champaca</i> <i>F. sarcochromum</i> <i>F. stilboides</i>

25 y 30 °C. En este momento, los procedimientos considerados como el estándar de oro en la identificación de *Fusarium* spp. son los fenotípicos, que incluyen las características de las colonias en ciertos medios de cultivo y las características microscópicas de las estructuras producidas por este microorganismo en el cultivo: fiálides, macroconidios, microconidios, mesoconidios y clamidosporas, entre las más importantes.<sup>10</sup> El gran número de especies y la existencia de complejos de especies ha complicado la identificación de numerosos aislamientos, ya que se requiere personal con entrenamiento y experiencia en este campo de la microbiología, del cual con frecuencia se carece en los laboratorios convencionales; además, son necesarios microscopios más poderosos que los disponibles en la mayoría de los laboratorios clínicos. Por esta razón, una identificación precisa a nivel de especie debe involucrar procedimientos alternativos, los cuales raramente se llevan a cabo en forma rutinaria en los laboratorios de diagnóstico. Procedimientos como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la secuenciación de genes han resuelto obstáculos que presenta la identificación fenotípica de este hongo.<sup>11-13</sup> Existen varios genes y regiones que se han propuesto para la identificación o confirmación molecular de este microorganismo, tales como el ITS (*internal transcribed spacer*), el gen de TEF1- $\alpha$  (*translation elongation factor 1 $\alpha$* ), la región RPB2 (*RNA polymerase II subunit B*) y el gen de calmodulina.<sup>6,11-13</sup>

El Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio ha propuesto los métodos que rigen las pruebas de susceptibilidad con antifúngicos, tanto para levaduras como hongos filamentosos.<sup>14</sup> En el caso de *Fusarium* spp. no se han establecido puntos de corte que permitan categorizar a las cepas como susceptibles, intermedias o resistentes, aunque se han establecido valores de corte epidemiológico al menos para las especies de *Fusarium* más frecuentemente aisladas de patología humana: *F. solani*, *F. oxysporum* y *F. verticillioides*.<sup>15-17</sup>

En el mundo, son escasos los reportes de identificación con cepas clínicas o ambientales de *Fusarium* spp.,<sup>18-23</sup> razón por la cual en este trabajo se propuso llevar a cabo la caracterización fenotípica y molecular de una colección de 116 cepas de *Fusarium* spp. en el Laboratorio de Micología del Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.

## Material y métodos

### Cepas de *Fusarium* spp.

Se utilizaron 116 cepas clínicas y ambientales de *Fusarium* spp. recolectadas en el Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas, anexo al Departamento de Microbiología. Las cepas de origen clínico fueron 84 (ojos, uñas, esputo y otros especímenes respiratorios, sangre y piel) y se obtuvieron entre 1996 y 2022, en diferentes instituciones de salud en Nuevo León, Ciudad de México, San Luis Potosí y Jalisco; así como 32 de origen ambiental (muestras de suelo y raíces de plantas en los estados de Nuevo León, Ciudad de México, Guanajuato, San Luis Potosí y Jalisco). Se almacenaron por duplicado en crioviales de 2 mL con agua destilada estéril y glicerol a 10 %; se guardaron tanto a temperatura ambiente como a -20 °C hasta su uso.

### Identificación fenotípica

Las cepas almacenadas fueron subcultivadas en agar dextrosa de Sabouraud (BD Bioxon, México), agar papa dextrosa (BD Bioxon, México) y agar avena (agar papa dextrosa suplementado con 6 % peso/volumen [p/v] de avena) e incubadas a 30 °C por tres a cinco días, para después llevar a cabo la observación de las características de macro y micromorfología. La estimulación de la producción de conidios se llevó a cabo mediante crecimiento sobre agar Spezieller Nährstoffarmer (0.1 % p/v de fosfato monopotásico, 0.1 % p/v de nitrato de potasio, 0.05 % p/v de sulfato de magnesio heptahidrato, 0.05 % p/v de cloruro de potasio, 0.02 % p/v de glucosa, 0.02 % p/v de sacarosa y 2 % p/v de agar) y en agar agua (2 % de agar). Las placas Petri se incubaron a 30 °C durante siete a 14 días. Los medios de cultivo agar dextrosa de Sabouraud y agar papa dextrosa son comúnmente utilizados en laboratorios clínicos; el resto de los medios de cultivo, en investigación. Las observaciones al microscopio se llevaron a cabo mediante los procedimientos estándar de cinta adhesiva y microcultivo. La identificación de las características coloniales y microscópicas se llevaron a cabo conforme los lineamientos del Manual de Laboratorio de *Fusarium*.<sup>24</sup>

### Identificación molecular

Las cepas se subcultivaron en agar dextrosa de Sabouraud por cinco días a 30 °C, después de lo

cual su ADN genómico se extrajo conforme el método fenol-cloroformo,<sup>25</sup> con adición de 0.1 UI de quitinasa. El ADN se utilizó para la amplificación de la región ribosomal de ITS1-5.8S-ITS2 (ITS) con los cebadores (*primers*) ITS5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAGG-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'), mediante el siguiente proceso: exposición a 95 °C por cuatro minutos, después 30 ciclos de exposición a 94 °C por un minuto, 55 °C por 90 segundos y 72 °C por 90 segundos, con un período de extensión final de 72 °C por cinco minutos. Algunas cepas fueron posteriormente tipificadas por amplificación del gen de TEF1- $\alpha$ , RPB y/o el gen de la calmodulina. TEF1- $\alpha$  fue amplificado con los *primers* Fsp-EF1 (5'-ATG GGT AAG GAR GAC AAG AC-3') y Fsp-EF2 (5'- GGA RGT ACC AGT SAT CAT GTT-3') y conforme el siguiente programa: exposición por 95 °C por cuatro minutos, seguida por 35 ciclos de 94 °C por un minuto, 50.8 °C por 90 segundos y 72 °C por 90 segundos, con un período de extensión final de 72 °C por cinco minutos.<sup>26,27</sup>

La amplificación de la RPB se llevó a cabo con los *primers* RPB2-5f2 (5'-GGG GWG AYC AGA AGA AAG C-3') y RPB2-7cR (5'-CCC ATR GCT TGY TTR CCC AT-3'): exposición 94 °C por cinco minutos, seguida por 35 ciclos de 94 °C por un minuto, 58 °C por 30 segundos y 72 °C por dos minutos, con un período de extensión de 72 °C por cinco minutos.

El gen de la calmodulina se amplificó con los *primers* CL1 (5'-GAR TWC AAG GAG GCC TTC TC-3') y CL2a (5'-TTT TTG CAT CAT GAG TTG GAC-3'): exposición a 94 °C por cinco minutos, seguida por 35 ciclos de 94 °C por un minuto, 55 °C por 45 segundos, 72 °C por un minuto y un período de extensión final de 72 °C por 10 minutos.

Se añadieron soluciones-Q (Qiagen, Hilden, Alemania) en todas las reacciones de PCR.

La amplificación de los productos fue secuenciada con el método Sanger en un secuenciador automático 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California, Estados Unidos). Las lecturas de secuenciación fueron depuradas con la eliminación de los extremos del cromatograma de mala calidad mediante el programa BioEdit<sup>28</sup> y la identificación se llevó a cabo por comparación de secuencias de cepas previamente reportadas en ISHAM ITA Barcoding Database (<http://its.mycologylab.org/>) y MycoBank Database (<https://www.mycobank.org/>).

**Tabla 2. Identificación fenotípica y molecular de 116 cepas de *Fusarium* spp.**

Identificación fenotípica (n = 116)	Identificación molecular (n = 116)
<i>F. solani</i> complejo de especies (n = 15)	<i>F. falciforme</i> (n = 6) <i>F. solani</i> (n = 4) <i>F. keratoplasticum</i> (n = 3) <i>F. coffeatum</i> (n = 1)* <i>F. oxysporum</i> (n = 1)*
<i>F. oxysporum</i> complejo de especies (n = 6)	<i>F. oxysporum</i> (n = 5) <i>F. keratoplasticum</i> (n = 1)
<i>F. fujikuroi</i> complejo de especies (n = 11)	<i>F. verticillioide</i> s (n = 6) <i>F. proliferatum</i> (n = 1) <i>F. oxysporum</i> (n = 3)* <i>F. falciforme</i> (n = 1)*
<i>F. incarnatum-equiseti</i> complejo de especies (n = 3)	<i>F. laceratum</i> (n = 1) <i>F. longiundum</i> (n = 1) <i>F. flocciferum</i> (n = 1)*
<i>F. dimerum</i> complejo de especies (n = 4)	<i>F. delphinoides</i> (n = 2) <i>F. Penigar</i> (n = 2)
<i>Fusarium</i> spp. (n = 77)	<i>F. falciforme</i> (n = 32) <i>F. verticillioide</i> s (n = 7) <i>F. oxysporum</i> (n = 7) <i>F. keratoplasticum</i> (n = 6) <i>F. solani</i> (n = 6) <i>F. petrophilum</i> (n = 2) <i>F. proliferatum</i> (n = 4) <i>F. annulatum</i> (n = 1) <i>F. nelsonii</i> (n = 1) <i>F. nygamai</i> (n = 1) <i>F. adiyazi</i> (n = 1) <i>F. concolor</i> (n = 1) <i>F. dimerum</i> (n = 1) <i>F. nanum</i> (n = 1) <i>F. mirum</i> (n = 1) <i>F. mucidum</i> (n = 1) <i>F. terricola</i> (n = 1) <i>F. nirenbergiae</i> (n = 1) <i>F. equiseti</i> s. l. (n = 1) <i>F. fujikuroi</i> s. l. (n = 1)

\*No corresponde al complejo. s. l.: *sensu lato* ("en sentido amplio").

## Resultados

En la Tabla 2 se presentan los resultados de la identificación fenotípica y molecular de las 116 cepas de *Fusarium* spp. que se estudiaron. Con base en las características macroscópicas y microscópicas distintivas, solo 39 cepas pudieron agruparse en cinco complejos de especies de *Fusarium*; no se logró llegar al nivel de especie: *F. solani* complejo de especies (n = 15), *F. oxysporum* complejo de especies (n = 6), *F. fujikuroi* complejo de especies (n = 11), *F. incarnatum-equiseti* complejo de especies (n = 3) y *F. dimerum* complejo de especies (n = 4). Las restantes 77 cepas no pudieron ser



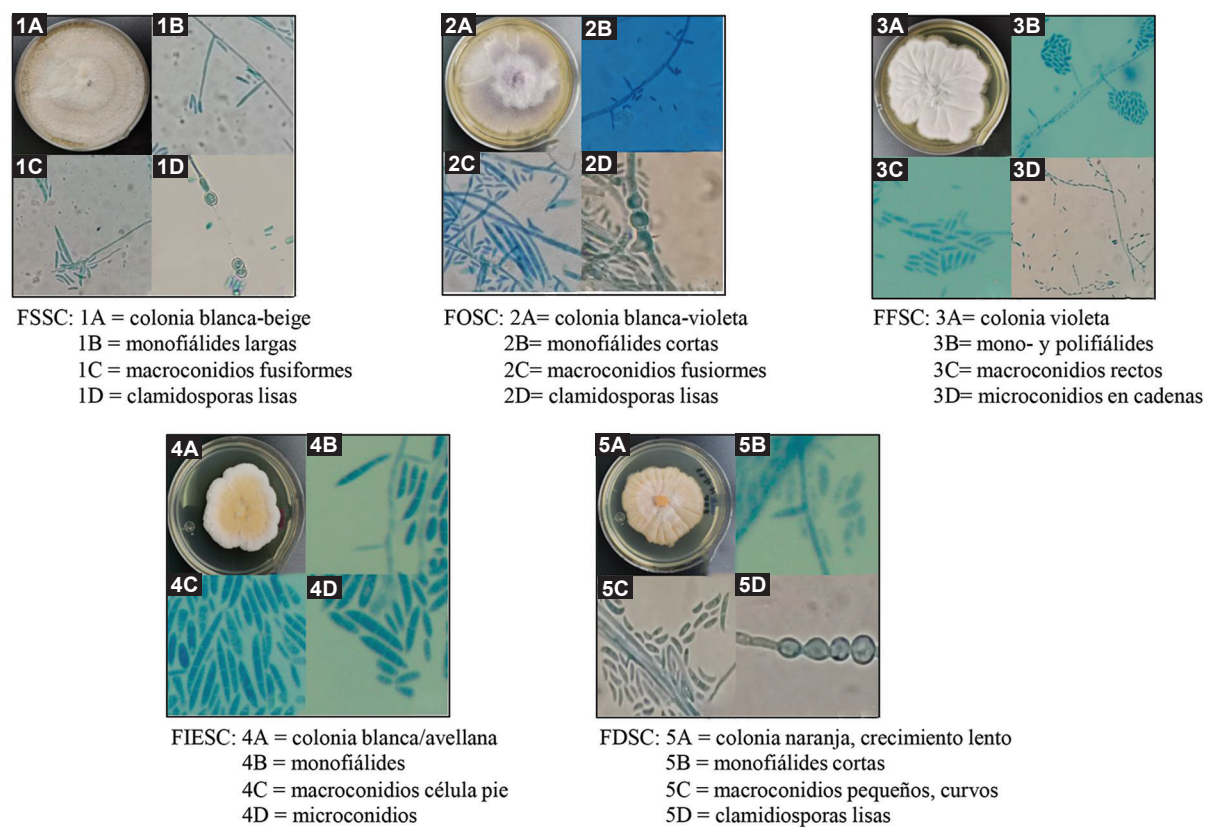


Figura 1. Características fenotípicas de los complejos de Fusarium identificadas en este estudio. Aumento de 400x.

Tabla 3. Características fenotípicas distintivas de los complejos identificados

Complejo	Colonia	Fiálides	Macroconidios	Clamidosporas	Caraterísticas extras
<i>Fusarium solani</i> complejo especies	Color blanco a crema, crecimiento rápido	Monofiálides largas	Fusiformes, cilíndricos, ligeramente curvos, 3-5 septos	Lisas, rugosas, se agrupan en pares o solas entre las hifas o laterales a ella. Abundantes	Microconidios abundantes con 0-2 septos, pigmentación marrón azulado cuando hay esporodoquios
<i>Fusarium oxysporum</i> complejo especies	Color blanco con el tiempo se vuelve morado, crecimiento rápido	Monofiálides cortas o medianas	Fusiformes, ligeramente curvos con célula apical y pie puntiaguda. Normalmente 3 septos	Lisas, rugosas, entre las hifas o terminales. Abundantes	Microconidios abundantes, curvos y en su mayoría no septados
<i>Fusarium fujikuroi</i> complejo especies	Color vino a violeta, crecimiento rápido	Monofiálides y polifiálides, longitud variable	Fusiformes, lanceolados, delgados, ligera curvatura, célula pie trunca o recta. Normalmente 3-5 septos	Ausentes	Microconidios abundantes, agrupados en cadenas o falsas cabezas
<i>Fusarium incarnatum-equiseti</i> complejo especies	Color blanco con el tiempo se vuelve avellana, café o melocotón, crecimiento rápido	Monofiálides cortas	Fusiformes a falcados, normalmente se producen en esporodoquio. Normalmente 3-7 septos	Lisas, rugosas, agrupadas en cadenas o solas entre las hifas. Escasas	Microconidios escasos o ausentes
<i>Fusarium dimerum</i> complejo especies	Color naranja o albaricoque, crecimiento lento	Monofiálides cortas, abultadas	Pequeños, muy curvos con célula apical puntiaguda. Normalmente 1-3 septos	Lisas, agrupadas en cadenas o solas entre hifas o terminales. Escasas	Microconidios, 0-2 septos

identificadas debido básicamente a la nula o escasa producción en los cultivos de estructuras como fiálides, conidios, clamidosporas y otras que son importantes para la tipificación fenotípica. En la figura 1 y en la tabla 3 se muestran algunas imágenes representativas y características fenotípicas de los complejos identificados. Mediante procedimientos moleculares se reconocieron las especies de las 77 cepas (y se buscó la confirmación de las 39 cepas mencionadas); no obstante, aun con los procedimientos de secuenciación en dos cepas solamente se llegó a la determinación como *sensu lato* (s. l.). En la tabla 2, ocho especies de *Fusarium* se indican con un asterisco, lo que significa que se agruparon en algún complejo en forma incorrecta cuando se utilizaron solamente los parámetros fenotípicos, lo que evidencia la poca precisión que brindan estos para la identificación de una especie de este género de hongo.

Mediante la distinción molecular de las 116 cepas (Tabla 2), se identificaron 26 especies de *Fusarium*, que se agruparon en nueve complejos: *F. solani* en 52.6 %, seguido por *F. oxysporum* y *F. fujikuroi*, en 14.6 y 20 %, respectivamente. Si bien la especie más reconocida fue *F. falciforme*, solo algunas como *F. falciforme* (6/39; 15 %) , *F. keratoplasticum* (3/10; 30 %) y *F. solani* s.s. (4/10; 40 %) fueron exitosamente agrupadas en *F. solani* complejo de especies mediante identificación fenotípica. Los resultados de identificación fenotípica fueron similares en otras especies; menos de la mitad de *F. oxysporum* s.s. (5/16; 31 %) y *F. verticillioides* (6/13, 46 %) fueron agrupadas en sus respectivos complejos. Cuatro especies fueron inconfundiblemente identificadas por las características morfológicas: *F. delphinoides* y *F. penzigii* (en *F. dimerum* complejo de especies) y *F. lacertarum* y *F. longifundum* (en *F. incarnatum-equiseti* complejo de especies).

En la tabla 4 se muestran los resultados de la identificación molecular según el origen clínico de las cepas. Se obtuvieron tipificaciones de las cepas en 22 especies agrupadas en siete complejos de especie, de los cuales *F. solani*, *F. oxysporum* y *F. fujikuroi* fueron los más frecuentes. Por su parte, en las cepas ambientales se observó un ligero cambio en la frecuencia en el orden de las caracterizaciones de los complejos de especie: *F. solani*, *F. oxysporum* y *F. fujikuroi*. En las cepas ambientales se identificaron nueve especies diferentes agrupadas en seis complejos (Tabla 5).

**Tabla 4. Identificación molecular de 84 cepas de *Fusarium* de origen clínico**

Complejo	Frecuencia (%)	Especie
Solani	51.2	<i>F. falciforme</i> (n = 29) <i>F. keratoplasticum</i> (n = 9) <i>F. solani</i> (n = 9) <i>F. petroliphilum</i> (n = 2)
Fujikuroi	22.6	<i>F. verticillioides</i> (n = 13) <i>F. proliferatum</i> (n = 2) <i>F. nygamai</i> (n = 1) <i>F. andiyazi</i> (n = 1) <i>F. mirum</i> (n = 1) <i>F. fujikuroi</i> s. l. (n = 1)
Oxysporum	12	<i>F. oxysporum</i> (n = 9) <i>F. nirenburgiae</i> (n = 1)
Dimerum	6	<i>F. delphinoides</i> (n = 2) <i>F. penzigii</i> (n = 2) <i>F. dimerum</i> (n = 1)
Incarnatum-equiseti	6	<i>F. coffeatum</i> (n = 1) <i>F. mucidum</i> (n = 1) <i>F. lacertarum</i> (n = 1) <i>F. longifundum</i> (n = 1) <i>F. equiseti</i> s. l. (n = 1)
Concolor	1.1	<i>F. concolor</i> (n = 1)
Tricinctum	1.1	<i>F. flocciferum</i> (n = 1)

s. l.: *sensu lato* ("en sentido amplio").

**Tabla 5. Identificación molecular de 32 cepas de *Fusarium* de origen ambiental**

Complejo	Frecuencia (%)	Especie
Solani	56.2	<i>F. falciforme</i> (n = 16) <i>F. keratoplasticum</i> (n = 1) <i>F. solani</i> (n = 1)
Oxysporum	22	<i>F. oxysporum</i> (n = 7)
Fujikuroi	12.4	<i>F. proliferatum</i> (n = 3) <i>F. annulatum</i> (n = 1)
Incarnatum-equiseti	3.1	<i>F. nanum</i> (n = 1)
Chlamidosporum	3.1	<i>F. nelsonii</i> (n = 1)
Staphyleae	3.1	<i>F. terricola</i> (n = 1)

## Discusión

Las especies que forman parte del género *Fusarium* son reconocidas como microorganismos fitopatógenos. Sin embargo, existen diversas especies que han sido documentadas como patógenos oportunistas en los seres humanos, siendo el principal grupo de riesgo las personas que presentan algún trastorno hematológico

maligno, que se han sometido a algún trasplante o que padecen síndrome de inmunodeficiencia adquirida.<sup>22</sup>

En el presente trabajo, se identificaron fenotípica y molecularmente 116 cepas de *Fusarium* spp., 84 clínicas y 32 ambientales, todas se agruparon en 26 del género *Fusarium* pertenecientes a nueve complejos: solani, oxysporum, fujikuroi, dimerum, incarnatum-equiseti, chlamydosporum, concolor, staphyleae y tricinctum. Solani fue el complejo más frecuente, tanto en cepas ambientales como clínicas, y dentro de ese complejo la especie más aislada fue *F. falci-forme*; le siguieron el complejo fujikuroi y oxysporum en las cepas clínicas y oxysporum y fujikuroi, en las ambientales.

Estos resultados concuerdan con lo reportado en la bibliografía, ya que las especies de *Fusarium* que se han reportado como patógenas oportunistas de humanos están agrupadas en los siguientes 10 complejos: solani, oxysporum, incarnatum-equiseti, fujikuroi, dimerum, tricinctum, chlamydosporum, concolor, sambucinum y lateritium. De todos ellos, se identificaron ocho (excepto sambucinum y lateritium). Las especies de *Fusarium* que se encuentran con mayor frecuencia en infecciones humanas son las que comprenden los complejos solani, oxysporum y la especie *F. verticillioides* del complejo fujikuroi.<sup>22,29,30</sup>

Este estudio es concluyente respecto a que las características morfológicas macroscópicas y microscópicas son de valor limitado para la identificación precisa de las especies *Fusarium*. Los cultivos han sido muy criticados y quedan claras sus desventajas: la lentitud del crecimiento fúngico, la falta de estandarización, las características morfológicas inestables, la dependencia de condiciones ambientales y el alto grado de subjetividad. Lo más que se puede lograr es la tipificación de un complejo y llegar a una especie con los parámetros fenotípicos es prácticamente imposible. Por lo anterior, en el escenario clínico, en los laboratorios de microbiología es imperante la implementación de procedimientos moleculares y el entrenamiento del personal para llegar a identificaciones precisas y en un tiempo más corto (uno o dos días), en particular en microorganismos en los cuales se han descrito complejos de especies. Solo recientemente se está logrado ese objetivo, pero desafortunadamente queda confinado prácticamente a laboratorios de referencia, ya que la infraestructura requerida y el personal con experiencia se reserva a esos sitios.

Por ahora, el cultivo sigue siendo muy importante porque a partir de conidios de *Fusarium* spp. se realizan las pruebas de susceptibilidad *in vitro* que

pueden ayudar en la selección de un antifúngico para el tratamiento de los pacientes. En la micología moderna, se enfrentan obstáculos para la caracterización precisa por procedimientos convencionales. La columna vertebral del diagnóstico de las enfermedades fúngicas invasivas es la microscopia, el cultivo y la histopatología. Un buen microscopio, una buena preparación y personal entrenado son esenciales, y aunque estos recursos constituyen una excelente propuesta para el trabajo en los laboratorios clínicos, la incorporación de métodos moleculares es imperante en los laboratorios de diagnóstico, ya que permitirá con mayor confianza la identificación precisa de numerosos hongos patógenos.

Se han descrito otros hongos que también están agrupados en secciones o complejos de especies: *Aspergillus*, en cuyas secciones están incluidas numerosas especies que son crípticas,<sup>31-33</sup> *Scedosporium*,<sup>34-36</sup> *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*,<sup>37</sup> *Sporothrix schenckii*,<sup>38-40</sup> por mencionar solo algunos, y en todos ellos solo las herramientas de biología molecular ayudan a una identificación a nivel de especie. El conocimiento y aplicación de dichos avances en el laboratorio clínico sin duda permitirán una sustancial mejora del tratamiento de numerosas enfermedades fúngicas, ya que fundamentalmente depende de la correcta identificación de las especies implicadas.

## Conclusiones

Mediante características fenotípicas solo se pudo llegar a la identificación de nivel complejo para las cepas de *Fusarium* spp. Fueron necesarias herramientas moleculares para la identificación de las especies.

## Financiamiento

Se recibió apoyo de CONAHCYT, Convocatoria Ciencia de Frontera 2020, proyecto 7364 “¿La exposición ambiental a antifúngicos contribuye al desarrollo de resistencia en *Fusarium* spp.?”

## Conflicto de intereses

Ninguno.

## Responsabilidades éticas

**Protección de personas y animales.** Los autores declaran que para esta investigación no realizaron experimentos en seres humanos ni en animales.

**Confidencialidad de los datos.** Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes. Además, los autores reconocieron y siguieron las recomendaciones según las guías SAGER dependiendo del tipo y naturaleza del estudio.

**Derecho a la privacidad y consentimiento informado.** Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

**Uso de inteligencia artificial para generar textos.** Los autores declaran que no utilizaron ningún tipo de inteligencia artificial generativa en la redacción de este manuscrito ni para la creación de figuras, gráficos, tablas o sus correspondientes pies o leyendas.

## Bibliografía

- Martino P, Gastaldi R, Gacchah R, Girmenia C. Clinical patterns of *Fusarium* infections in immunocompromised patient. *J Infect*. 1994;28 Suppl 1:7-15. DOI: 10.1016/s0163-4453(94)95911-0
- Naggie S, Perfect JR. Molds: hyalohyphomycosis, phaeohyphomycosis, and zygomycosis. *Clin Chest Med*. 2009;30(2):337-353.vii-viii. DOI: 10.1016/j.ccm.2009.02.009
- Ma LJ, Geiser DM, Proctor RH, Rooney AP, O'Donnell K, Trail F, et al. *Fusarium* pathogenomics. *Annu Rev Microbiol*. 2013;67:399-416. DOI: 10.1146/annurev-micro-092412-155650
- Tupaki-Sreepuma A, Kindo AJ. *Fusarium*: the versatile pathogen. *Indian J Med Microbiol*. 2018;36(1):8-17. DOI: 10.4103/ijmm.IJMM\_16\_24
- O'Donnell, Ward TJ, Robert VAR, Crous PW, Geiser D W, Kang S. DNA sequence-based identification of *Fusarium*: current status and future directions. *Phytoparasitica*. 2015;43:583-595. DOI: 10.1007/s12600-015-0484-z
- Guarro J. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enferm Infect Microbiol Clin*. 2012;30(1):33-39. DOI: 10.1016/j.eimc.2011.09.006
- Guarro J. Fusariosis, a complex infection caused by a high diversity of fungal species refractory to treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013; 32: 1491-1500.
- Al-Hatmi AMS, Meis JF, de Hoog GS. *Fusarium*: molecular diversity and intrinsic drug resistance. *PLoS Pathogens*. 2016;12(4):e1005464. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005464
- Herkert PF, Al-Hatmi AMS, de Oliveira Salvador GL, Muro MD, Pinheiro RL, Nucci M, et al. Molecular characterization and antifungal susceptibility of clinical *Fusarium* species from Brazil. *Front Microbiol*. 2019;10:737. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00737
- Guarro J, Gené J. *Fusarium* infections criteria for the identification of the responsible species. *Mycoses*. 1992;35(5-6):109-114. DOI: 10.1111/j.1439-0507.1992.tb00830.x
- Chandra NS, Wulff EG, Udayashankar AC, Nandini BP, Niranjana S R, Mortensen CN, Prakash HS. Prospects of molecular markers in *Fusarium* species diversity. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011;90(5):1625-1639. DOI: 10.1007/s00253-011-3209-3
- Thomas B, Contet Audouneau N, Machouart M, Debourgogne A. Molecular identification of *Fusarium* species complexes: Which gene and which database to choose in clinical practice? *J Mycol Med*. 2019;29(1):56-58. DOI: 10.1016/j.mycmed.2019.01.003
- Velarde-Félix S, Valdez-Rubio N, Zamora-Galván F, López-Molina R, Melgoza-Villagómez CM, Garzón-Tiznado JA. Identificación molecular de *Fusarium* spp. aislados de maíz en Sinaloa, México. *Rev Mexicana Ciencia Agric*. 2018;9:1675-1689. Disponible en: <https://cienciasagricolas.inifap.gob.mx/index.php/agricolas/article/view/756/1788>
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi M38. Tercera edición. Pensilvania, Estados Unidos: Wayne; 2017.
- Al-Hatmi A, Curfs-Breuker I, de Hoog GS, Meis JF, Verweij PE. Antifungal susceptibility testing of *Fusarium*: a practical approach. *J Fungi*. 2017;3(2):19. DOI: 10.3390/jof3020019
- Taj-Aldeen SJ, Salah H, Al-Hatmi AM, Hamed M, Theelen B, von Diepeningen AD, et al. In vitro resistance of clinical *Fusarium* species to amphotericin B and voriconazole using the EUCAST antifungal susceptibility method. *Diagn Micr Infect Dis*. 2016;85(4):438-443. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2016.05.006
- Espinel-Ingroff A, Colombo A, Córdoba S, Dufresne PJ, Fuller J, Ghanoun M, et al. International evaluation of MIC distributions and epidemiological cutoff value (ECV) definitions for *Fusarium* species identified by molecular methods for the CLSI broth microdilution method. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(2):1079-1084. DOI: 10.1128/AAC.02456-15
- Al-Hatmi A, Bonifaz A, de Hoog GS, Vazquez-Maya L, García-Carmona K, Meis JF, van Diepeningen AD. Keratitis by *Fusarium temperatum*, a novel opportunist. *BMC Infect Dis*. 2014;14:588. DOI: 10.1186/s12879-014-0588-y
- Maquera-Afaray J, Pérez-Lazo G, Rodríguez R, Illesca R, Rodríguez L, Hidalgo J, et al. Fusariosis invasiva: reporte de 3 casos en Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2018;35(3):523-526. DOI: 10.17843/rp-mesp.2018.353.3175
- Hoffman JJ, Burton MJ, Leck A. Mycotic keratitis- A global threat from the filamentous fungi. *J Fungi*. 2021;7(4):273. DOI: 10.3390/jof7040273
- Dananché C, Cassier P, Sautour M, Gautheron N, Węgrzyn J, Perraud M, et al. Fungaemia caused by *Fusarium proliferatum* in a patient without definite immunodeficiency. *Mycopathologia*. 2015;179(1-2):135-140. DOI: 10.1007/s11046-014-9817-6
- Dabas Y, Bakhshi S, Xess I. Fatal cases of bloodstream infection by *Fusarium solani* and review of published literature. *Mycopathologia*. 2026;181(3-4):291-296. DOI: 10.1007/s11046-015-9960-8
- Mellado E, Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL. Importancia clínica de los mecanismos de resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos. *Enferm Infect Microbiol Clin*. 2002;20(10):523-530. DOI: 10.1016/j.eimc.2020.02.031
- Leslie JF, Summerell BA. The *Fusarium* laboratory manual., Iowa, Estados Unidos: Blackwell Publishing; 2008. DOI: 10.1002/9780470278376
- Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual. New York, Estados Unidos: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
- White TJ, Bruns T, Lee SJWT, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: Innis MA, Gelfand DH, White TJ, editores. *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press; 1990. p. 315-322. DOI:10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1
- O'Donnell K, Kistler HC, Cigelnik E, Ploetz RC. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(5):2044-2049. DOI: 10.1073/pnas.95.5.2044
- Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 1999;41:95-98. DOI: 10.14601/Phytopathol\_Mediterr-14998u1.29
- Muhammed M, Anagnostou, Desalemos A, Kourkoumpetis TK, Carneiro HA, Glavis-Bloom J, et al. *Fusarium* infection: report 06 26 cases and review of 97 cases from the literature. *Medicine*. 2023;92(6):305-316. DOI: 10.1097/MD.0000000000000008
- Hudson O, Waliullah S, JiP, Ali ME. Molecular characterization of laboratory mutants of *Fusarium oxysporum* f. sp. niveum resistant to prothioconazole, a demethylation inhibitor (DMI) fungicide. *J Fungi*. 2021;7(9):704. DOI: 10.3390/jof7090704
- Sugui JA, Vinh DC, Nardone G, Shea YR, Chang YC, Zelazny AM, et al. Neosartorya udagawae (Aspergillus udagawae), an emerging agent of aspergillosis: how different is it from *Aspergillus fumigatus*? *J Clin Microbiol*. 2010;48(1):220-228. DOI: 10.1128/JCM.01556-09
- Balajee SA, Nickle D, Varga J, Marr KA. Molecular studies reveal frequent misidentification of *Aspergillus fumigatus* by morphotyping. *Eukaryot Cell*. 2006;5(10):1705-1712. DOI: 10.1128/EC.00162-06
- Alcázar-Fuoli L, Mellado E, Alastruay-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL. *Aspergillus* section *Fumigati*: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(4):1244-1251. DOI: 10.1128/AAC.00942-07
- Guarro J, Kantarcioglu AS, Horré R, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca Estrella M, Berenguer J, et al. *Scedosporium apiospermum*: changing clinical spectrum of a therapy-refractory opportunist. *Med Mycol*. 2006;44(4):295-327. DOI: 10.1080/13693780600752507
- Gilgado F, Cano J, Gené J, Sutton DA, Guarro J. Molecular and phenotypic data supporting distinct species statuses for *Scedosporium apiospermum* and *Pseudallescheria boydii* and the proposed new species *Scedosporium dehoogii*. *J Clin Microbiol*. 2008;46(2):766-771. DOI: 10.1128/JCM.01122-07
- Gilgado F, Serena C, Cano J, Gené J, Guarro J. Antifungal susceptibilities of the species of the *Pseudallescheria boydii* complex. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(12):4211-4213. DOI: 10.1128/AAC.00981-06
- Turner SA, Butler G. The *Candida* pathogenic species complex. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014;4(9):a019778. DOI: 10.1101/cshperspect.a019778
- Guarro J, de Hoog GS. *Bipolaris*, *Exophiala*, *Scedosporium*, *Sporothrix*, and other melanized fungi. En: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, editores. *Manual of clinical microbiology*. Décima edición. Washington DC, Estados Unidos: ASM Press; 2011. p. 1943-1961.
- Marimón R, Cano J, Gené J, Sutton DA, Kawasaki M, Guarro J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. *J Clin Microbiol*. 2007;45(10):3198-3206. DOI: 10.1128/JCM.00808-07
- Herkert PF, Al-Hatmi AMS, de Oliveira Salvador GL, Muro MD, Pinheiro RL, Nucci M, Queiroz-Telles F, de Hoog GS, Meis JF. Molecular characterization and antifungal susceptibility of clinical *Fusarium* species from Brazil. *Front Microbiol*. 2019;10:737. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00737