

UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Trabajo de Fin de Máster Titulado:

**Primer reporte de fungemia por *Fusarium oxysporum* en
un caso fatal de paciente por COVID-19 en Ecuador,
mediante identificación filogenética molecular**

Realizado por:

FRANCO ALEXANDER JIMBO ZAPATA

Director del proyecto:

Dr. Juan Carlos Navarro C., Ph.D.

Como requisito para la obtención del título de:

MAGISTER EN BIOMEDICINA

Quito, 13 de marzo de 2023

ANEXO B

DECLARACION JURAMENTADA

Yo, **Alexander Jimbo**, con cédula de identidad 1722229679 declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado a calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.



FIRMA Y CÉDULA

1722229679

ANEXO C

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

Primer reporte de fungemia por *Fusarium oxysporum* en un caso fatal de paciente por COVID-19 en Ecuador, mediante identificación filogenética molecular

Realizado por:

Franco Alexander Jimbo Zapata

como Requisito para la Obtención del Título de:

MAGISTER EN BIOMEDICINA

ha sido dirigido por el profesor

JUAN CARLOS NAVARRO C.

quien considera que constituye un trabajo original de su autor



FIRMA

ANEXO D

LOS PROFESORES INFORMANTES

Los Profesores Informantes:

WILSON DAVID DÁVILA

JOSE RUBEN RAMÍREZ

Después de revisar el trabajo presentado,
lo han calificado como apto para su defensa oral ante
el tribunal examinador

FIRMA



FIRMA

Quito, 13 de marzo de 2023

ANEXO F

DEDICATORIA

*A mi familia,
y a mi prima Sara Jácome
de quien su recuerdo estará siempre conmigo.*

AGRADECIMIENTO

A mi familia y amigos, por todo su apoyo.

A mis profesores del programa de Maestría, por compartir sus conocimientos.

ANEXO F

Este trabajo de tesis fue realizado bajo el Programa de Investigación:

SALUD GLOBAL

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Proyecto DII-P011617_2 (JCN)

Artículo de tesis

Primer reporte de fungemia por *Fusarium oxysporum* en un caso fatal de paciente por COVID-19 en Ecuador, mediante identificación filogenética molecular

Alexander Jimbo^{1,2,3}, Gabriela Sevillano¹, Pilar Rodríguez², José Rubén Ramírez², Juan Carlos Navarro^{2*}

¹ Maestría en Biomedicina, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Internacional SEK, Quito, Ecuador.

² Grupo de Investigación en Enfermedades Emergentes, Desatendidas, Ecoepidemiología y Biodiversidad; Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Internacional SEK, Quito, Ecuador.

³ Unidad de Patología Clínica, Hospital de Especialidades Carlos Andrade Marín, Quito, Ecuador.

* Autor de Correspondencia: juancarlos.navarro@uisek.edu.ec

Resumen: La mayoría de fusariosis invasivas en humanos son causadas por los complejos de especies *Fusarium solani* (FSSC) y *Fusarium oxysporum* (FOSC). El primer complejo es más resistente a la terapia de elección que el segundo, por lo que la identificación rápida y precisa de género y especie es importante debido al contexto clínico del microorganismo. La OMS categorizó a este patógeno dentro del grupo de alta prioridad, debido a limitadas opciones terapéuticas y a su multirresistencia antifúngica. Las técnicas convencionales solo permiten identificar el género; el uso de técnicas moleculares permite una correcta identificación a nivel de género y especie. Describimos el primer reporte de caso en Ecuador de fungemia asociado a SARS-CoV-2 en un paciente varón de 70 años con COVID-19, hipertensión arterial crónica controlada y sin otras comorbilidades. Durante la estancia hospitalaria, el paciente desarrolló fungemia por *Fusarium oxysporum*, la cual terminó en su deceso. Se realizó la identificación del género con técnicas convencionales y la especie con técnicas moleculares y filogenéticas, mediante secuenciación del espaciador intergénico ribosomal ITS. En Ecuador, no existen registros de secuencias de *Fusarium* spp aisladas de muestras clínicas, contando solo con aislados ambientales. No se conoce la incidencia de la fungemia en nuestro medio, debido a la falta de reportes o estudios epidemiológicos. El virus SARS-CoV-2 causa daño al epitelio respiratorio, produce una desregulación inmunológica, por lo cual los pacientes son más susceptibles a desarrollar infecciones fúngicas; únicamente las candidiasis y aspergilosis han sido documentadas ampliamente en pacientes críticos con COVID-19, mientras que otras que otras infecciones fúngicas invasivas han sido menos reportadas. Las técnicas moleculares son un apoyo para la identificación y diagnóstico específico de enfermedades micóticas poco frecuentes que tienen altas tasas de mortalidad y constituyen una herramienta potente de identificación inequívoca, para una estrategia de tratamiento y, para el seguimiento epidemiológico de casos.

Palabras clave: fungemia; SARS-Cov-2, identificación molecular; filogenética, epidemiología

Abstract: Most invasive *Fusarium* wilts in humans are caused by the *Fusarium solani* (FSSC) and *Fusarium oxysporum* (FOSC) species complexes. The first complex is more resistant to the therapy of choice than the second, so rapid and accurate identification of genus and species is important due to the clinical context of the microorganism. The WHO categorized this pathogen within the high priority group, due to limited therapeutic options and its antifungal multiresistance. Conventional techniques only allow gender identification; the use of molecular techniques allows a correct identification at the genus and species level. We describe the first case report in Ecuador of fungemia associated with SARS-CoV-2 in a 70-year-old male patient with COVID-19, controlled chronic arterial hypertension and no other comorbidities. During the hospital stay, the patient developed fungemia due to *Fusarium oxysporum*, which ended in his death.

The identification of the genus was carried out with conventional techniques and the species with molecular and phylogenetic techniques, through sequencing of the ribosomal intergenic spacer ITS. In Ecuador, there are no records of *Fusarium* spp sequences isolated from clinical samples, with only environmental isolates. The incidence of fungemia in our environment is unknown, due to the lack of reports or epidemiological studies. The SARS-CoV-2 virus causes damage to the respiratory epithelium, produces immune dysregulation, which makes patients more susceptible to developing fungal infections; Only candidiasis and aspergillosis have been widely documented in critically ill patients with COVID-19, while other than other invasive fungal infections have been less reported. Molecular techniques are a support for the identification and specific diagnosis of rare fungal diseases that have high mortality rates and constitute a powerful tool for unequivocal identification, for a treatment strategy and for the epidemiological follow-up of cases.

Keywords: fungemia; SARS-Cov2; molecular identification; phylogenetic, epidemiology

1. Introducción

Las enfermedades infecciosas se encuentran entre las principales causas de mortalidad y una de las principales causas de discapacidad en todo el mundo, en este contexto las enfermedades fúngicas invasivas (IFD, por sus siglas en inglés) están aumentando en general y en particular entre las poblaciones inmunocomprometidas. Las IFD están aumentando a medida que la población en riesgo continúa expandiéndose, y la accesibilidad a terapias e intervenciones que dañan el sistema inmunitario, como la quimioterapia y la inmunoterapia para el cáncer y el trasplante de órganos sólidos (World Health Organization, 2022).

Las infecciones por hongos filamentosos son las principales causas de infecciones sistémicas en pacientes inmunodeprimidos (Lanternier et al., 2013). Entre estos agentes etiológicos se encuentran varios géneros de hongos filamentosos. Los hongos del género *Fusarium* pueden producir infecciones diseminadas, especialmente en pacientes con catéteres centrales, posiblemente debido a la capacidad de adherirse a estos dispositivos (Shariati et al., 2020). Ciertas especies como *Fusarium solani* (representa aproximadamente el 50% de todas las infecciones), seguida por *Fusarium oxysporum*, *Fusarium proliferatum* y *Fusarium verticillioides*, que son principalmente patógenos de plantas ampliamente distribuidos en el suelo, causan infecciones invasivas en humanos (Normand et al., 2021).

La mayoría de las fusariosis invasivas en humanos son causadas por el complejo de especies *Fusarium solani* (FSSC) y por el complejo de especies *Fusarium oxysporum* (FOSC), por lo que la identificación rápida y precisa a nivel de especie o al menos a nivel de complejo de especies de vital importancia tomando en cuenta el contexto clínico del microorganismo, siendo este un requisito previo para la toma de decisiones terapéuticas, ya que esto garantiza un inicio oportuno y apropiado de medicamentos antimicóticos, con lo cual puede mejorar el pronóstico del paciente (Normand et al., 2021). Los miembros clínicamente relevantes de *Fusarium* son resistentes a casi todos los antifúngicos utilizados actualmente, no solo azoles, sino también equinocandinas y polienos. Esto plantea un gran desafío para la medicina y la agricultura, en particular con los hongos emergentes y de expansión mundial como el *Fusarium* (Al-Hatmi et al., 2016).

Los complejos de *Fusarium* tienen características macroscópicas y microscópicas bastante similares, lo que dificulta la identificación precisa de complejos de especies con métodos fenotípicos, por lo cual es necesario utilizar métodos de biología molecular para la correcta identificación de complejos de especies (Thomas et al., 2019). Con los avances en secuenciación molecular, se reconocen más de 200 especies en 22 complejos de especies, que se diferencian por morfología, asociación de huéspedes y parámetros moleculares. Actualmente, se ha sugerido que 74 especies taxonómicas causan infecciones humanas, a juzgar por su aislamiento de muestras clínicas, y este número se está expandiendo. Hasta la fecha, alrededor de 36 de los presuntos oportunistas en humanos tienen nombre, mientras que 38 aún no y solo pueden identificarse mediante análisis de secuencia multilocus (MLSA) (Al-Hatmi et al., 2016).

La infección fúngica ocurre por transmisión aérea, cortes en la piel provocado por traumatismos, quemaduras o colocación de catéteres vasculares (Carlesse et al., 2017). Uno de los principales factores de riesgo para los pacientes inmunocomprometidos es la inhalación de aire contaminado, se ha establecido un vínculo entre la presencia de *Fusarium* en el aire y en la sangre de pacientes infectados, además se sugirió que el aire hospitalario sin filtrar puede ser problemático para estos pacientes (Al-Hatmi et al., 2016). Los pacientes con fusariosis diseminada suelen tener hemocultivos positivos, siendo el pronóstico reservado ya que la mortalidad de la forma diseminada ronda el 80%. Sin embargo, en la mayor parte de casos clínicos no se reporta la especie, ya que este género es muy heterogéneo y difícil de clasificar con las técnicas convencionales (Gaviria-Rivera et al., 2018).

La fusariosis diseminada se incluye dentro de las hialohifomicosis, un término utilizado para denominar las infecciones causadas por hongos que tienen hifas hialinas tabicadas, como son *Fusarium spp.*, *Scedosporium spp.*, *Acremonium spp.* y *Paecilomyces spp.* (Giraldo et al., 2010). Las micosis invasivas por *Scedosporium*, *Fusarium* o mucorales (*Rhizopus*, *Mucor* o *Lichtheimia*) han aumentado en frecuencia y gravedad en los últimos años, principalmente en pacientes inmunocomprometidos. Estas micosis profundas son menos frecuentes que las causadas por el género *Aspergillus*, sin embargo, suelen ser más virulentas y difíciles de tratar debido a su resistencia a la mayoría de los antifúngicos disponibles, además junto con el cambio de ciertos nichos ecológicos explicaría el mayor número de aislamientos de estos hongos en pacientes inmunocomprometidos. La buena evolución de los pacientes se relaciona con un diagnóstico rápido, tratamiento antifúngico oportuno y la recuperación del estado inmunitario del paciente, sobre todo de su neutropenia (Pemán & Salavert, 2014).

La pandemia de la enfermedad por coronavirus (COVID-19) se ha asociado con un aumento en la incidencia de infecciones fúngicas invasivas comórbidas. En el contexto epidemiológico actual, el virus SARS-CoV-2 causa daño directo al epitelio respiratorio y produce una desregulación del sistema inmune, lo que provoca que los pacientes sean más susceptibles a desarrollar infecciones fúngicas, entre ellas, la candidiasis invasiva y la aspergilosis pulmonar han sido documentadas ampliamente en pacientes críticos con enfermedad por Coronavirus 2019 (COVID-19) (Roudbary et al., 2021). En el Ecuador no existen registros de secuencias de especies de *Fusarium* provenientes de aislados clínicos, solo aislados de muestras ambientales, por lo que no se conoce la incidencia de la fungemia en nuestro medio, debido a la falta de reportes o estudios epidemiológicos en el país (López et al., 2018). En el presente reporte de caso describimos un caso de fungemia asociada a colonización del catéter orotraqueal por *Fusarium oxysporum*, mediante la identificación morfológica, filogenética y molecular, en un paciente masculino de 70 años con COVID-19, residente en Quito, Ecuador.

2. Materiales and Métodos

2.1. Aislamiento de cultivo microbiano

Fusarium spp. se aisló de una muestra de sangre de un paciente con síntomas de COVID-19. La muestra de sangre fue inoculada en tres botellas de hemocultivo e incubadas a $35^{\circ}\text{C} \pm 1,5^{\circ}\text{C}$ en el sistema Bactec (BD Difco, USA). Una vez que el hemocultivo del paciente resultó positivo, se tomó una alícuota de la botella y se centrifugó para obtener un sedimento del cultivo, al cual se le realizó una tinción de Gram, para visualizar el tipo de microorganismo que se desarrolló.

2.2 Caracterización morfológica convencional

Para la caracterización morfológica, el hemocultivo se inoculó en el medio sólido agar dextrosa de Saboraud a temperatura ambiente (20°C - 25°C) y a 37°C para facilitar su crecimiento. A los 5 días de crecimiento se observó desarrollo de colonias y se procedió a realizar la caracterización morfológica. Se observaron las características microscópicas del microorganismo, como primer nivel de identificación. Se realizó una alícuota del cultivo puro y se almacenó a temperatura ambiente (20°C - 25°C) en tubos Eppendorf con solución salina estéril. La caracterización morfológica convencional se llevó a cabo en la Unidad Técnica de Patología Clínica del Hospital de Especialidades Carlos Andrade Marín.

2.3 Extracción de ADN y amplificación vía PCR

Se realizó la extracción de ADN con el kit QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, Hilden, Alemania), directamente de medio agar dextrosa de Saboraud una vez que el hongo formó colonias visibles y maduras, siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se procedió a realizar un ensayo PCR usando la región genómica ITS (Internal Transcribed Spacer); las cantidades utilizadas en la master mix para ejecutar la PCR se detallan en la Tabla 1. La región ITS del ADN_r se amplificó con los cebadores universales ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), descritos por White et al. (1990). Las condiciones del termociclado fueron: desnaturalización inicial de 4 min a 95 °C; 35 ciclos de 30s a 95°C, 1 min a 57°C, 1 min a 72°C; y una extensión final de 10 min a 72°C. El producto, se visualizó por electroforesis en gel de agarosa a 1,2% bajo luz ultravioleta, para obtener un fragmento de 490 pares de bases (pb). La caracterización molecular se ejecutó en las instalaciones de Facultad de Ciencias de la Salud, Laboratorio de Investigación, de la Universidad Internacional SEK.

Tabla 1. Concentraciones de los componentes de la Master Mix para los primers ITS1 e ITS4

Componente	Concentración inicial	Concentración final	Volumen para 1 tubo de 25 uL
DreamTaq PCR Master Mix	2x	1x	12.5
Primer F (ITS)	10 uM	0,1 uM	0.25
Primer R (ITS)	10 uM	0,1 uM	0.25
ADN	50 ng/uL	100 ng/uL	2
H ₂ O			10

El producto obtenido fue enviado a secuenciar a Macrogen Inc (Seoul, Corea del Sur). La secuencia generada se limpió y se ensambló usando el programa bioinformático Sequencher 5.4.6. La secuencia consenso se exportaron como archivos FASTA. Una vez se obtuvo la secuencia consenso, se comparó con la base de datos de GenBank NCBI, usando la herramienta BLASTn para obtener porcentaje de identidad del microorganismo en estudio.

2.4 Análisis filogenético

Se utilizaron secuencias de especies de *Fusarium* de diferentes países obtenidas del GenBank, y la secuencia consenso obtenida del aislado. Un total de 51 secuencias fueron muestreadas. Se incluyeron para el análisis secuencias de grupos hermanos de referencia y grupos externos como especies de *Scedosporium apiospermum*.

Se construyó una matriz de alineamiento del gen ITS mediante ClustalW usando el programa MEGA X con parámetros de Penalidad de Creación de Gap-GOP y Penalidad de Extensión de Gap-GEP de 30.0 y 10.0 respectivamente buscando el mayor grado de homología posicional.

Se utilizaron las respectivas matrices alineadas para la construcción del árbol filogenético como segundo nivel de identificación, utilizando el software MEGAX para Máxima Verosimilitud (ML) del gen ITS. El árbol se enraizó usando como grupos externos secuencias de la especie *Scedosporium apiospermum* de acuerdo a la taxonomía tradicional.

El modelo de sustitución nucleotídica de cada matriz para el análisis de ML fue calculado por Model Test bajo MEGAX calculado mediante el criterio de Akaike y Bayesian Inference Criteria (BIC). El árbol de ML fue construido con un árbol inicial de MP. La construcción de MP fue realizada con 1.000 réplicas de adición al azar de taxa y caracteres y barrido de ramas con TBR (Tree Bisection and Reconnection). Posteriormente

se realizó un repesado de caracteres homólogos mediante el índice de consistencia recalculado (RCI) y se obtuvo los valores (en %) de soporte de ramas mediante 1.000 pseudoréplicas de bootstrap de la matriz como apoyo estadístico a posteriori de clados o ramas (Felsenstein 1985). El árbol resultante se muestra en la **Fig 4**.

Como tercer nivel de verificación de identificación molecular y con fines de clasificación en complejos, grupos y verificación de especies filogenéticas (concepto de especie filogenética), se evaluó cada clado monofilético mediante la divergencia entre especies mediante la construcción de matrices de distancia (y % divergencia $\times 100$) mediante el modelo de p-distancia sin corregir, así como entre secuencias obtenidas del NCBI y las obtenidas en el laboratorio.

2.5 Consideraciones éticas

Se obtuvo el consentimiento informado del familiar del paciente. El trámite para la obtención de datos se realizó en el CEISH (Comité de Ética e Investigación en Seres Humanos) del Hospital del Especialidades Carlos Andrade Marín, Número de resolución en proceso.

3. Resultados

3.1 Descripción del reporte de caso

Describimos el primer reporte de caso en Ecuador de fungemia por *Fusarium oxysporum* asociado a SARS-CoV-2 en un paciente varón de 70 años con COVID-19, ecuatoriano residente de la ciudad de Quito. El paciente presenta un antecedente patológico de hipertensión arterial crónica controlada. En primera instancia, el paciente acude a revisión ambulatoria presentando síntomas respiratorios como cefalea, tos que moviliza secreciones, odinofagia, disfonía, artralgias, mialgias, rinorrea, alza térmica no cuantificada, sudoración profusa, disnea de medianos esfuerzos, decaimiento y fatiga, se le suministran corticoides y antibiótico.

A los 15 días al persistir los síntomas acude el a emergencias del Hospital de Especialidades Carlos Andrade Marín, el episodio fue confirmado como SARS CoV-2 positivo, que generó síndrome de dificultad respiratoria aguda, tipo Berlín severo, posteriormente es ingresado a la Unidad de Cuidados Intensivos, donde ameritó asistencia ventilatoria invasiva con 3 ciclos de pronación, traqueostomía fallida, con mala evolución, y se le suministra nuevamente corticoterapia para los síntomas, durante su estancia recibió antibioticoterapia dirigida con carbapenémicos, glucopéptido, aminoglucósido y quinolonas.

A los 8 días de su ingreso al hospital se envían cuatro frascos de hemocultivo para identificación microbiológica, posteriormente se reportó el crecimiento bacteriano de *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos tipo NDM XDR. A los 14 días de hospitalización se notificó el crecimiento de un hongo patógeno en un frasco de hemocultivo y 6 días después se reporta fungemia por hongo filamentoso el mismo que se confirma género siendo identificado como *Fusarium* spp., con este reporte el paciente recibió anfotericina b desoxicolato y voriconazol por choque séptico persistente. El paciente fallece 5 días después del diagnóstico de fungemia. Posteriormente, se pudo identificar mediante técnicas moleculares y filogenéticas al microorganismo *Fusarium oxysporum* como causante de la fungemia. La línea de tiempo de los hallazgos hospitalarios se describe en la **Figura 1**.



Figura 1. Línea de tiempo de los principales hallazgos diagnósticos

La tinción de Gram mostró realizada al hemocultivo mostró hifas septadas Gram negativas, microconidios Gram positivos (**Figura 2**). Se observaron las características macroscópicas de la colonia, tanto en el anverso como el reverso. Al anverso se observa una colonia vellosa, plana, blanca y con una coloración naranja central que se difunde en la colonia. Al reverso se observa una coloración crema anaranjada en el cultivo (**Figura 3**).

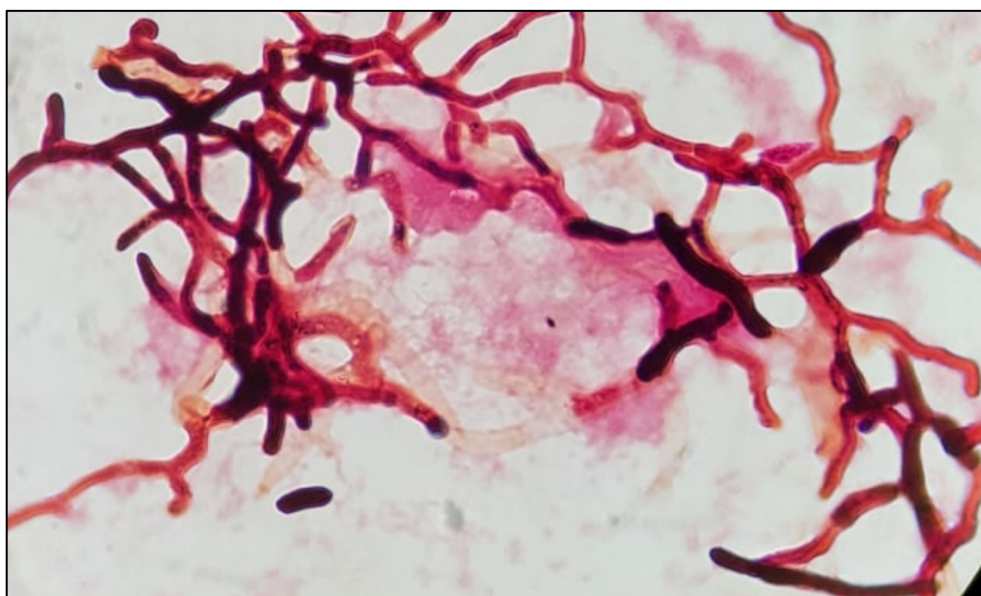


Figura 2. Tinción de Gram de hemocultivo positivo, se observan hifas septadas Gram negativas, microconidios Gram positivos.

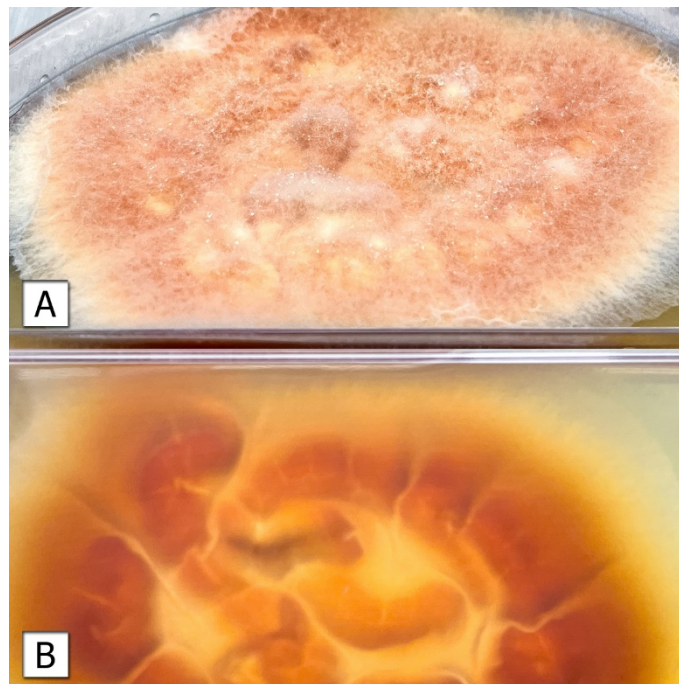


Figura 3. Macroscopía de colonia de *Fusarium oxysporum* en agar dextrosa de Saboraud. **A.** Anverso: colonia vellosa, plana, bordes blancos y con una coloración naranja central que difunde en la colonia. **B.** Reverso: se observa una coloración crema-anaranjada en el cultivo.

Con base a las estructuras microscópicas observadas: hifas hialinas septadas, conidióforos largos con monifiliades, macroconidias abundantes en forma de semiluna, hialinas y septadas, abundantes microconidias ovoides, se identificó como *Fusarium spp.* Basado en las características macroscópicas y microscópicas de la colonia obtenida a partir del cultivo de sangre positivo del paciente, se identificó al microorganismo como *Fusarium spp* (Figura 4).

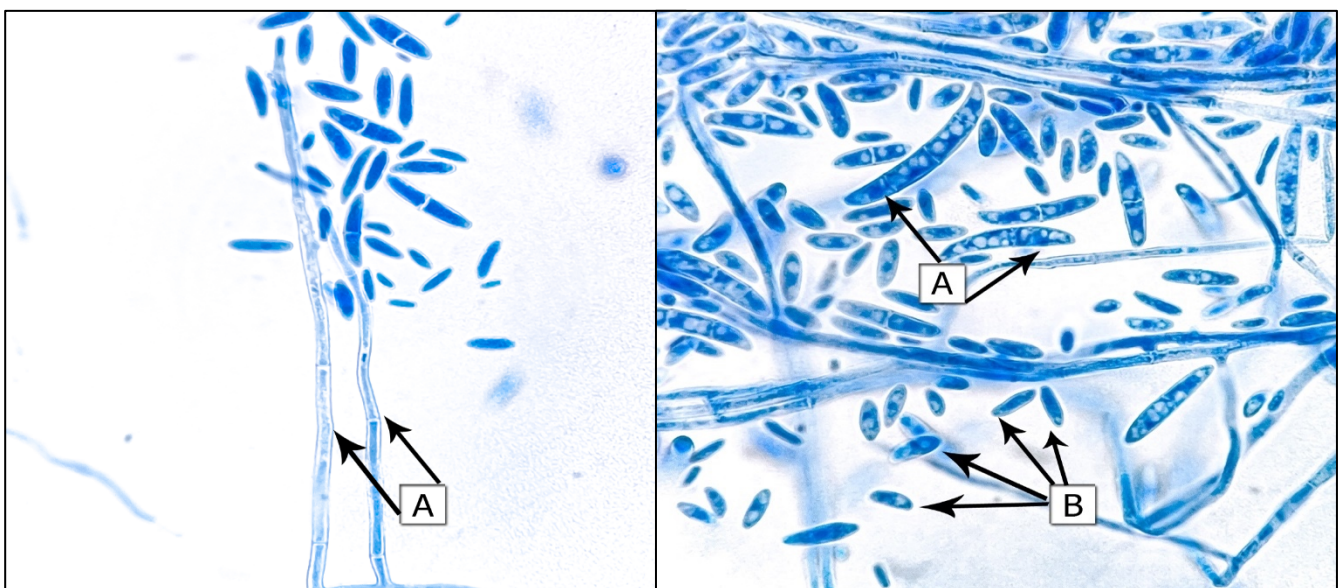


Figura 4. Colonia de *Fusarium oxysporum* observada al microscopio con azul de lactofenol. Izquierda: A. Hifas hialinas septadas, conidióforos largos con monofialides (40x). Derecha: A. Macroconidias hialinas y septadas en forma de semiluna. B. Abundantes microconidias ovoides (100x).

3.2. Identificación molecular y filogenética

Se obtuvo una secuencia de 490 bp, con un porcentaje de identidad del 100% para *Fusarium oxysporum* usando la base de datos GenBank NCBI. Para la construcción del árbol filogenético con base en el gen ITS se construyó una matriz de alineamiento resultante de 490 pares de base o caracteres posicionales por 52 secuencias o taxas.

En la **Fig. 5**, se muestra el cladograma resultante que en ambos análisis (ML y MP) mostraron la misma topología. En el mismo se puede observar la formación de 2 clados hermanos: el clado más basal formado por los subclados de las especies del complejo *Fusarium oxysporum* y *Fusarium proliferatum* (Complejo de especies *Fusarium fujikuroi*), y un segundo clado derivado formado por miembros del complejo de especies *Fusarium solani* y *Fusarium falciforme* en posición parafilética, colocando en duda del grupo *solani* asociado a *F. falciforme*, y mostrando a *solani* como un grupo de posibles especies distintas. El clado monofilético formado con las especies de *F. oxysporum* incluyó la secuencia del paciente (Código de Acceso por obtener de NCBI), mostró un porcentaje de apoyo por bootstrap del 99% y un porcentaje de divergencia dentro del subclado *oxysporum* entre el 0 y 1.8%. La secuencia del paciente de Ecuador resultó idéntica a las secuencias de Japón y Brasil (0% de divergencia) y la más distante la secuencia de India con 1,8%. La divergencia interespecífica versus *proliferatum*, el grupo hermano resultó de 7,2%, y con el clado de *solani* entre 17 y 20%. La divergencia intraespecífica en *proliferatum* varió entre 0% y 2%, similar a la intra de *oxysporum* corroborando el valor intra para una especie de *Fusarium*. La divergencia intra en el clado *solani* resultó entre 1,8 y 7%, sugiriendo como en la topología del árbol un complejo de especies distintas.

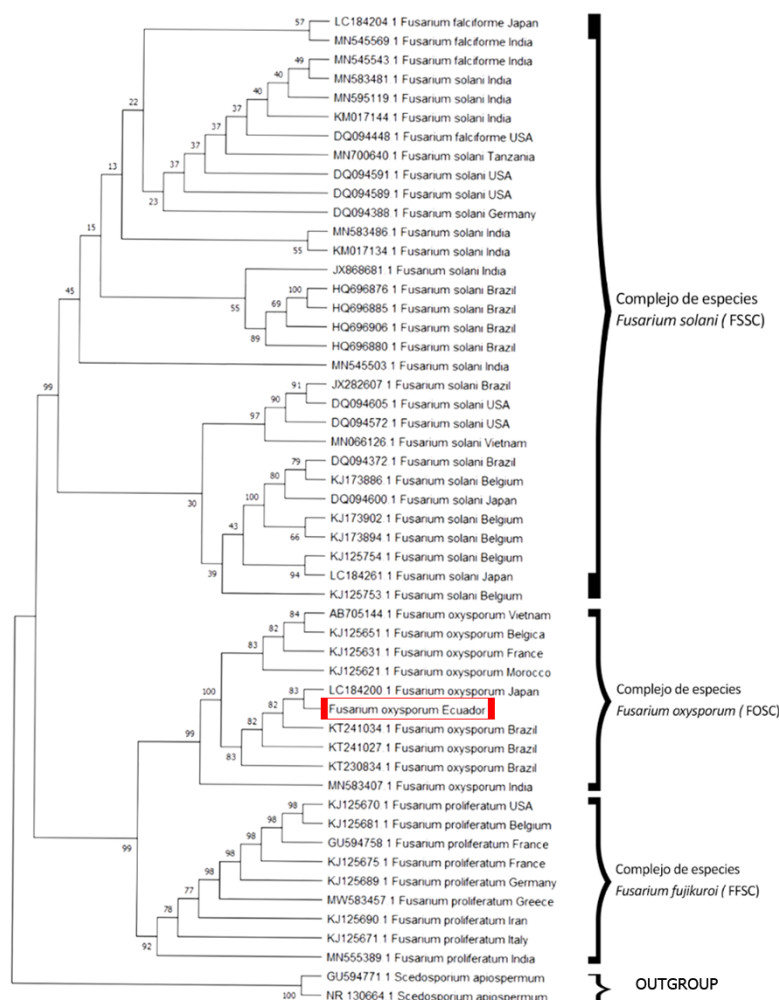


Figura 5. Árbol filogenético de máxima verosimilitud (ML) a partir de secuencias de la región ITS de especies del género *Fusarium*. Los números sobre los clados indican el valor del % Bootstrap con 1,000 pseudoreplicas. En rojo se resalta la secuencia obtenida del paciente COVID-19 de Ecuador

4. Discusión y conclusiones

El diagnóstico de infecciones fúngicas sigue siendo un problema a resolver a nivel de laboratorio clínico, las manifestaciones clínicas de las micosis invasivas no son específicas y las herramientas diagnósticas existentes a menudo carecen de sensibilidad. Las técnicas convencionales y las técnicas moleculares pueden ayudar a facilitar y acelerar el diagnóstico (Kiraz, 2015). Las técnicas tradicionales basadas en la morfología es decir en caracteres fenotípicos, para la identificación de especies de hongos es muy importante para comprender la evolución de los caracteres morfológicos. Sin embargo, los enfoques morfológicos de la sistemática fúngica, aunque se utilizan de forma rutinaria en estudios taxonómicos fúngicos para la clasificación de hongos a nivel ordinal o familiar, no siempre puede funcionar bien para las clasificaciones de nivel inferior o de especies (Raja et al., 2017).

El desarrollo de métodos moleculares para la detección e identificación de hongos presentes en muestras clínicas crece a un ritmo muy rápido, ya sea mediante técnicas de amplificación de ácidos nucleicos o mediante sondas específicas o secuenciación de ácidos nucleicos (Kiraz, 2015). En nuestro reporte se utilizaron técnicas moleculares para poder identificar al microorganismo a nivel de género y especie, utilizando la región ITS. La región ITS (espaciador intergénico ribosomal) es considerada como marcador estándar para la identificación de mayoría de las especies de hongos utilizada ampliamente para la sistemática, la filogenética y la identificación (Schoch et al., 2012).

El género *Fusarium* comprende más de 300 especies filogenéticamente distintas, agrupadas en más de 20 complejos de especies. Sin embargo, las especies de *Fusarium* que causan enfermedades en humanos se agrupan en siete complejos de especies: complejo de especies de *Fusarium solani* (FSSC), complejo de especies de *Fusarium oxysporum* (FOSC), complejo de especies de *Fusarium fujikuroi* (FFSC), complejo de especies de *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC), complejo de especies de *Fusarium chlamidosporum* (FCSC), complejo de especies de *Fusarium dimerum* (FDSC) y complejo de especies de *Fusarium sporotrichoides* (FSAMSC) (Bansal et al., 2019).

En el presente reporte de caso clínico de un paciente con COVID-19, la observación macroscópica y microscópica permitió la identificación a nivel de género de *Fusarium spp.*, mas no de especie; las estructuras microscópicas del género *Fusarium* son prácticamente similares y no se aprecian diferencias significativas a nivel de especies, sin embargo, con base a la identificación convencional, se empezó tratamiento antifúngico. Las diferencias a nivel genético entre especies pueden favorecer la aplicación de ciertos tratamientos terapéuticos sobre otros, y nos permite obtener datos epidemiológicos más precisos sobre estos hongos. Las herramientas diagnósticas existentes a menudo carecen de sensibilidad, por lo cual, la combinación de varias herramientas de diagnóstico es obligatoria para permitir un diagnóstico temprano de estas infecciones. Las técnicas convencionales y las técnicas moleculares pueden ayudar a facilitar y acelerar el diagnóstico en forma complementaria (Kiraz, 2015).

En el análisis, se utilizaron técnicas moleculares para poder identificar al microorganismo a nivel de género y especie, obteniendo un porcentaje de identidad de la secuencia obtenida del paciente de un 100% para *Fusarium oxysporum* mediante el Blast con NCBI en un primer nivel, la ubicación por homología en la topología del árbol filogenético en posición monofilética con otras secuencias de *oxysporum*, que apoya el % de identidad en un segundo nivel de identificación, y se culminó el proceso con el tercer nivel de identificación molecular calculando la divergencia intra secuencias de *oxysporum* entre 0 y 1,8%. Esta identificación específica y precisa del patógeno, ayudaría en casos futuros a viabilizar un tratamiento oportuno y específico, tomando en cuenta que los complejos presentan diferencias en cuanto a resistencia antifúngica.

Aproximadamente el 70% de los casos de enfermedad invasiva que ocurren en pacientes hematológicos son causados por FSSC y FOSC, pero existen diferencias geográficas en la distribución de especies (Nucci et al., 2021), siendo los complejos más grandes involucrados en infecciones en humanos del complejo de especies *Fusarium solani* (FSSC) y del complejo *Fusarium oxysporum* (FOSC) (Normand et al., 2021). El análisis filogenético, nos permitió visibilizar que el clado formado por las secuencias de *F. solani* y *F. falciforme* como grupos hermanos en el mismo complejo de especies *Fusarium solani* (FSSC) y, las secuencias de *Fusarium oxysporum*, incluida la del paciente de nuestro estudio, ubicada en el subclado monofilético del complejo de especies *Fusarium oxysporum* (FOSC) y como grupo hermano del suclado de *Fusarium proliferatum* que pertenecen al complejo de especies *Fusarium fujikuroi* FFSC.

La relación cercana entre secuencias de *Fusarium proliferatum* y *Fusarium oxysporum* sugiere que comparten características genotípicas, lo cual es apoyado con los resultados encontrados usando los genes TEF1 y RPB2, los cuales al igual que la región genómica ITS sirven para identificar especies de este hongo, y refieren esta misma relación filogenética cercana entre los complejos FOOSC y FFSC (Yassin et al., 2022).

En comparación con otros resultados, un reporte de caso realizado en 2022 (Jalal Damani, 2022) de un paciente inmunocompetente con COVID-19 que desarrolló una infección pulmonar por *Fusarium spp.*, se señala que se utilizó una prueba para detección de un antígeno (prueba convencional) producido por especies de *Fusarium*, sin embargo, no se alcanzó la identificación a nivel de especie.

En otros reportes de caso realizados (Poignon et al., 2020) y (Barberis et al., 2022) en pacientes con COVID-19 y que desarrollaron fusariosis invasiva, se utilizó una técnica proteómica denominada espectrometría de masas. En el primero se identificó a *Fusarium proliferatum* mientras que en el segundo a *Fusarium verticillioides*. Tanto las técnicas moleculares como las proteómicas utilizan información estructural de los microorganismos para poder identificarlos a nivel de género y especie, siendo un aporte valioso en la práctica rutinaria en los laboratorios donde se realiza la identificación de estos patógenos, además que los datos obtenidos fortalecen el seguimiento y control epidemiológico de especies de hongos patógenos para el ser humano.

La OMS categorizó al género *Fusarium* dentro del grupo de patógenos de alta prioridad debido a la resistencia antifúngica inherentemente ya que es resistente a la mayoría de antifúngicos y al uso masivo de algunos antifúngicos (azoles) en la agricultura. Los patógenos causales rara vez se confirman microbiológicamente, debido a la falta de personal calificado y a que, en la mayoría de los entornos, los datos de vigilancia son de baja calidad o no existen (World Health Organization, 2022).

En nuestro caso, para realizar el análisis filogenético del microorganismo, no se encontraron secuencias reportadas aisladas de muestras clínicas en el país, sino únicamente se encontraron en muestras ambientales, por lo que se utilizaron secuencias de especies de *Fusarium* extraídas a partir de aislados clínicos de diferentes países, esto hace difícil conocer la incidencia de la fungemia en nuestro medio. La vigilancia clínica mejorada dependerá del nivel de conocimiento y educación sobre la presentación clínica y los factores de riesgo de infecciones causadas por estos patógenos. El acceso a las herramientas de diagnóstico en el punto de atención es esencial para una atención óptima del paciente y para la generación de datos de vigilancia.

El presente reporte de caso permite visibilizar que en el Ecuador no existe información precisa de microorganismos del género *Fusarium* que afectan al ser humano y tomando en cuenta que es un patógeno de alta prioridad se deberían establecer protocolos de identificación diagnóstica que permitan reportar de manera oportuna estos patógenos. Las técnicas convencionales, moleculares y filogenéticas empleadas en este estudio brindan información valiosa para el manejo y vigilancia de pacientes infectados con este tipo de microorganismos, además que promueve el uso de técnicas basadas en la composición estructural (proteínas, ácidos nucleicos, genes) de los patógenos, haciendo la identificación más precisa, la posibilidad de untratamiento específico y, por ende obtener datos relevantes sobre estas enfermedades infecciosas.

5. Recomendaciones

Las pruebas convencionales para la identificación de hongos son una herramienta valiosa para la caracterización de las especies fúngicas, sin embargo, estas pruebas suelen ser limitadas en su capacidad para distinguir entre especies fúngicas similares, y pueden requerir un conocimiento experto, por lo que la elección de las pruebas dependerá del contexto clínico, epidemiológico y del tipo de muestra analizada, y el uso de múltiples técnicas puede ser necesario para una identificación precisa y confiable.

La secuenciación de ácidos nucleicos permite una identificación precisa y rápida a nivel de género y especie de microorganismo fúngicos, estas pruebas son menos subjetivas y no requieren experiencia previa en la identificación de especies fúngicas, lo cual sirve para mejorar la identificación de especies fúngicas, especialmente en casos de infecciones crónicas graves.

El análisis filogenético es una herramienta valiosa para la identificación y caracterización de hongos de importancia clínica, ya que analiza las relaciones evolutivas entre las diferentes especies de hongos, proporcionando información útil para la identificación precisa de especies y la comprensión de la

epidemiología y patogenia de las infecciones fúngicas, así como la comprensión de las relaciones entre especies fúngicas y sus hospedadores.

Contribución de los Autores:

AJ.; Conceptualización, Metodología, análisis formal, escritura—preparación, escritura—revisión y edición; **GS**: Metodología, Conceptualización, análisis formal, **PR**: Metodología, Conceptualización, análisis formal; **JRR**; análisis formal, recursos, revisión y edición; **JCN**; supervisión, metodología, revisión y edición, administración y gestión de proyecto, adquisición de fondos, visualización final.

Agradecimientos: A la familia del paciente del presente reporte de caso por su colaboración para la presentación del mismo. A la Unidad Técnica de Patología Clínica del Hospital Carlos Andrade Marín.

Conflictos de Interés: Los autores declaran no tener conflicto de interés.

Referencias citadas

- Al-Hatmi, A. M. S., Meis, J. F., & de Hoog, G. S. (2016). *Fusarium*: Molecular Diversity and Intrinsic Drug Resistance. *PLoS Pathogens*, 12(4), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005464>
- Bansal, Y., Singla, N., Kaistha, N., Sood, S., & Chander, J. (2019). Molecular identification of *Fusarium* species complex isolated from clinical samples and its antifungal susceptibility patterns. *Current Medical Mycology*, 5(4), 43–49. <https://doi.org/10.18502/cmm.5.4.2149>
- Barberis, F., Benedetti, M. F., de Abreu, M. S., Pola, S. J., Posse, G., Capece, P., Lausi, A. F., Nusblat, A., & Cuestas, M. L. (2022). Invasive fusariosis in a critically ill patient with severe COVID-19 pneumonia: A case report. *Medical Mycology Case Reports*, 35, 5–8. <https://doi.org/10.1016/j.mmcr.2021.12.003>
- Carlesse, F., Amaral, A. P. C., Gonçalves, S. S., Xafranski, H., Lee, M. L. M., Zecchin, V., Petrilli, A. S., Al-Hatmi, A. M., Hagen, F., Meis, J. F., & Colombo, A. L. (2017). Outbreak of *Fusarium oxysporum* infections in children with cancer: An experience with 7 episodes of catheter-related fungemia. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 6(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13756-017-0247-3>
- Gaviria-Rivera, A., Giraldo-López, A., Santa-Cardona, C., & Cano-Restrepo, L. (2018). Molecular identification of clinical isolates of *Fusarium* in Colombia. *Revista de Salud Pública*, 20(1), 94–102. <https://doi.org/10.15446/rsap.v20n1.51923>
- Giraldo, C., María Velásquez, M., & Correa, L. A. (2010). Infección diseminada por *Fusarium* spp. en un paciente con anemia aplásica Disseminated infection by *Fusarium* spp. in a patient with aplastic anemia. In *Rev Asoc Colomb Dermatol* (Vol. 18). www.revistasocolderma.com
- Jalal Damani. (2022). COVID-19-ASSOCIATED PULMONARY FUSARIUM INFECTION IN A NON-CRITICALLY ILL IMMUNOCOMPETANT PATIENT. *Chest Journal*, 160(4), 286A. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chest.2021.07.292>
- Kiraz, N. (2015). Molecular techniques for clinical diagnostic mycology. In *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi* (Vol. 72, Issue 3, pp. 263–272). Refik Saydam National Public Health Agency (RSNPHA). <https://doi.org/10.5505/TurkHijyen.2015.99705>
- Lanternier, F., Cypowyj, S., Picard, C., Bustamante, J., Lortholary, O., Casanova, J.-L., & Puel, A. (2013). Primary immunodeficiencies underlying fungal infections. *Curr Opin Pediatr*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1097/MOP.000000000000031>
- López¹, W. C., Carrera Sanchez¹, K., Lidcay, F., Isla², H., & Santana², R. C. (2018). Identificación de aislados de *Fusarium* spp. asociados a *Solanum quitoense* Lam en Pastaza, Ecuador. 45(4), 5–11. <http://cagricola.uclv.edu.cu>

- Normand, A. C., Imbert, S., Brun, S., Al-Hatmi, A. M. S., Chryssanthou, E., Cassaing, S., Schuttler, C., Hasseine, L., Mahinc, C., Costa, D., Bonnal, C., Ranque, S., Sautour, M., Rubio, E., Delhaes, L., Riat, A., Sendid, B., Kristensen, L., Brandenberger, M., ... Fekkar, A. (2021). Clinical origin and species distribution of fusarium spp. Isolates identified by molecular sequencing and mass spectrometry: A european multicenter hospital prospective study. *Journal of Fungi*, 7(4). <https://doi.org/10.3390/jof7040246>
- Nucci, M., Barreiros, G., Akiti, T., Anaissie, E., & Nouér, S. A. (2021). Invasive fusariosis in patients with hematologic diseases. In *Journal of Fungi* (Vol. 7, Issue 10). MDPI. <https://doi.org/10.3390/jof7100815>
- Pemán, J., & Salavert, M. (2014). Invasive fungal disease due to *Scedosporium*, *Fusarium* and mucorales. *Revista Iberoamericana de Micología*, 31(4), 242–248. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2014.05.002>
- Poignon, C., Blaize, M., Vezinet, C., Lampros, A., Monsel, A., & Fekkar, A. (2020). Invasive pulmonary fusariosis in an immunocompetent critically ill patient with severe COVID-19. In *Clinical Microbiology and Infection* (Vol. 26, Issue 11, pp. 1582–1584). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.06.026>
- Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J., & Oberlies, N. H. (2017). Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. In *Journal of Natural Products* (Vol. 80, Issue 3, pp. 756–770). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>
- Roudbary, M., Kumar, S., Kumar, A., Černáková, L., Nikoomanesh, F., & Rodrigues, C. F. (2021). Overview on the prevalence of fungal infections, immune response, and microbiome role in COVID-19 patients. In *Journal of Fungi* (Vol. 7, Issue 9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/jof7090720>
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., Bolchacova, E., Voigt, K., Crous, P. W., Miller, A. N., Wingfield, M. J., Aime, M. C., An, K. D., Bai, F. Y., Barreto, R. W., Begerow, D., Bergeron, M. J., Blackwell, M., ... Schindel, D. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16), 6241–6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Shariati, A., Moradabadi, A., Chegini, Z., Khoshbayan, A., & Didehdar, M. (2020). An overview of the management of the most important invasive fungal infections in patients with blood malignancies. *Infection and Drug Resistance*, 13, 2329–2354. <https://doi.org/10.2147/IDR.S254478>
- Thomas, B., Contet Audonneau, N., Machouart, M., & Debourgogne, A. (2019). Molecular identification of *Fusarium* species complexes: Which gene and which database to choose in clinical practice? *Journal de Mycologie Médicale*, 29(1), 56–58. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2019.01.003>
- World Health Organization. (2022). WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. *World Health Organization*.
- Yassin, Z., Salehi, Z., Soleimani, M., Lotfali, E., Fattahi, M., & Sharifynia, S. (2022). *Phylogenetic relationship of Fusarium species isolated from keratitis using TEF1 and RPB2 gene sequences* (Vol. 14, Issue 3). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>