

00322

212



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESPECIES DE *Candida* CAUSANTES DE INFECCION DE VIAS URINARIAS EN PACIENTES DIABETICOS Y SU SENSIBILIDAD ANTIFUNGICA *in vitro*

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

NANCY GUADALUPE VELAZQUEZ ZAVALA

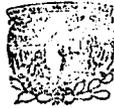
DIRECTORA DE TESIS: M. en C. PATRICIA MANZANO GAYOSSO



FACULTAD DE CIENCIAS UNAM

MEXICO, D. F.

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES



2003

FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

A



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**TESIS CON  
FALLA DE  
ORIGEN**



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

Autorizo a la Dirección General de Estudios de la UNAM a difundir en formato electrónico el contenido de mi trabajo académico.  
 NOMBRE: Nancy Guadalupe Velázquez Zavala  
 FECHA: 05 - Noviembre - 2003  
 FIRMA: [Firma]

**DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA**  
 Jefa de la División de Estudios Profesionales de la  
 Facultad de Ciencias  
 Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

Especies de Candida causantes de infección de vías urinarias en pacientes diabéticos y su sensibilidad antifúngica in vitro.

realizado por: Pas. De Biol. : Nancy Guadalupe Velázquez Zavala

con número de cuenta 9617710-1, quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de tesis

Propietario M. en C. Patricia Manzano Gayosso [Firma]

Propietario Dr. Rubén López Martínez [Firma]

Propietario Dra. María de los Ángeles Martínez Rivera [Firma]

Suplente M. en C. Guadalupe Vidal Gaona [Firma]

Suplente Biol. Rosario Vázquez Bravo [Firma]

Consejo Departamental de Biología

[Firma]  
 M. EN C. JUAN MANUEL RODRIGUEZ CHAVEZ

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA  
DE BIOLOGÍA

B

Este trabajo fue financiado por el apoyo al proyecto DGAPA-PAPIIT-UNAM, IN215302-2, cuyo responsable es el Dr. Rubén López Martínez y corresponsable M. en C. Patricia Manzano Gayosso.

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Micología Médica del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM. Jefe Dr. Rubén López Martínez.

Colaboraron las siguientes instituciones:

- Servicio de Endocrinología del Hospital General Dr. Darío Fernández, ISSSTE. Dr. J. Miguel Naquid Narváez
- Unidad de Investigación Médica en dermatología y Micología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS. Jefe Dr. Luis Javier Méndez Tovar.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco mi directora de tesis a la M. En C. Patricia Manzano Gayosso por su dedicación, apoyo y por estar siempre al pendiente de la realización de esta investigación y al Dr. Luis Javier Méndez por su colaboración para concluir este trabajo.

Gracias a la Dra. Ma. de los Angeles Martínez Rivera, M. En C. Guadalupe Vidal y a la Biol. Rosario Vázquez por sus aportaciones a este trabajo, por aceptar ser parte de jurado, por sus correcciones y aportaciones que ayudaron a enriquecer este trabajo.

Al Dr. Rubén López Martínez por permitirme realizar este trabajo en su laboratorio y por aceptar ser parte de mi jurado, y a sus colaboradores: Dra Francisca Hernández por sus observaciones para el mejoramiento de este trabajo, a la M. En Med. Trop. Rocío Castañon por ser una de mis maestras y enseñarme que bello es el mundo de los hongos, Biol. Elva Bazán por su disposición y paciencia para ayudarme aclarar mis dudas y a la QFB Erika Córdova por su amistad y apoyo.

Gracias al Sr. Alfredo Carmona Castañon por su ayuda para la identificación de los aislamientos de *Candida*.

Mi más sincero y profundo agradecimiento a un hombre que ha sido el principal guía de mi vida, que me ha brindado su amor, comprensión, cariño, paciencia, apoyo incondicional y por impulsarme cada día a ser mejor y hacer de mi una mujer de bien ¡Papá, muchísimas gracias, te quiero mucho!

Especialmente agradezco a una gran mujer a la cual admiro y respeto mucho que siempre ha estado conmigo, por su inmenso amor, dedicación y paciencia. ¡Mamá, muchas gracias!

Gracias a mi hermano Luis por enseñarme cual es el costo de la superación y que con un poco de esfuerzo todos los sueños pueden realizarse. ¡Hermanito, gracias!

Agradezco a una persona muy especial que ha estado conmigo a lo largo de la realización de este trabajo por aguantarme, escucharme, apoyarme, porque además de ser mi novio es mi mejor amigo ¡Pedro: Gracias mi amor por estos dos años juntos!

Mi muy especial agradecimiento a la M. en C. Edith Sánchez y la Biol. Adriana Valera por su gran amistad, apoyo, paciencia y por no dejarme caer aún en los momentos más críticos.

Gracias a mis amigos: Adi, Editha, Erika, Elvis, Carlos, Claus, Quika, Blanca, Karen, Ivan, Jorge, Roberto, Rosario, Gabby, Marisela, Hugo y Mariela por su apoyo y brindarme su amistad incondicional.

Agradezco a mis tíos y sobrinos en especial a las Familias Vázquez-Velázquez y De Paz-Vázquez por su comprensión, cariño, apoyo y por estar siempre al pendiente de mí.

Finalmente quiero agradecer a la vida por permitir encontrar en mi camino a estos maravillosos organismos que son la inspiración de grandes trabajos: **LOS HONGOS.**

*A MIS PADRES: HILARIO Y GUADALUPE  
POR SU DEDICACIÓN Y APOYO INCONDICIONAL.*

*A MI HERMANO LUIS: POR  
ENSEÑARME QUE CON ESFUERZO  
SE PUEDEN ALCANZAR LAS METAS.*

## ÍNDICE

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1 Antecedentes históricos	1
1.2 Género <i>Candida</i>	2
1.2.1 Características fenotípicas	3
1.2.2 Pruebas para la identificación de <i>Candida</i>	5
1.2.3 Hábitat	8
1.2.4 Factores predisponentes	9
1.2.5 Candidosis	9
1.2.6 Diabetes mellitus	10
1.2.7 Infección en vías urinarias	11
1.2.7.1 Diabetes mellitus e infección de vías urinarias	12
1.2.7.2 Infección fúngica de vías urinarias y agentes etiológicos	13
1.2.8 Sensibilidad antifúngica	16
1.2.8.1 Mecanismos de resistencia a drogas antifúngicas	18
1.2.8.2 Pruebas de sensibilidad antifúngica "in vitro"	18
<b>2. Planteamiento del problema</b>	<b>22</b>
<b>3. Objetivos</b>	<b>24</b>
<b>4. Hipótesis</b>	<b>25</b>
<b>5. Material y Método</b>	<b>26</b>
5.1 Población estudiada	26
5.2 Criterios de exclusión	26
5.3 Espécimen biológico	27
5.4 Procesamiento de muestras	27

5.5	Pruebas de identificación para <i>Candida</i>	28
5.5.1	Formación de tubo germinativo	28
5.5.2	Producción de clamidoconidios	28
5.5.3	Morfología macroscópica y microscópica en Agar Staib	29
5.5.4	Prueba de opacidad	29
5.5.5	CHROMagar <i>Candida</i>	30
5.5.6	Crecimiento a 45°C en APD y ADPEL	30
5.5.7	Prueba de asimilación de carbohidratos (Vitek YCB)	31
5.5.8	Prueba de sensibilidad antifúngica: E-test	31
6.	<b>Resultados</b>	34
7.	<b>Discusión</b>	48
8.	<b>Conclusiones</b>	54
9.	<b>Bibliografía</b>	55
10.	<b>Apéndice</b>	66

## 1. Introducción

### 1.1. Antecedentes históricos

La descripción más antigua del término Candidosis se encuentran plasmada en el libro "*Epidemics*", obra escrita por Hipócrates cuatro siglos antes de Cristo, al observar en dos pacientes inmunosuprimidos la presencia de lesiones en boca, semejantes a "aftas". En años posteriores continuaron los reportes de diferentes manifestaciones clínicas de candidosis. En 1771 Rosen Von Rosenstein y en 1784 Underwood describieron una candidosis bucal y gastrointestinal en un recién nacido, respectivamente. En 1835 Véron describió un caso de candidosis esofágica y uno de pustulosis candidósica en un recién nacido que la adquirió durante el nacimiento. En 1839 Langerbeck, descubrió el agente etiológico causante de candidosis; en 1841 Berg y en 1844 Bennet confirmaron el hallazgo de Langerbeck, a cerca de la etiología fúngica del "algodoncillo". En 1842 Gruby, describió la morfología del hongo causal y lo ubicó en el género *Sporotrichum*. Dos años después Gruby reportó las características microscópicas de la levadura obtenida en el esputo de un paciente con tuberculosis pulmonar. En 1849, Wilkinson, demostró las manifestaciones clínicas de una vulvovaginitis por *Candida*. Robin en 1853, mostró que el agente etiológico de "algodoncillo" podía diseminarse y causar infección generalizada y llamó a este hongo *Oidium albicans*. En 1868 Quinquad propuso un nuevo nombre *Syngospora rodinii*, para denominar al hongo causante de candidosis bucal; y en 1877 Röss, cambia el nombre del microorganismo por *Saccharomyces albicans*; por otro lado en el mismo año Grawitz, demostró la naturaleza dimórfica del hongo y describió las formas de levadura, micelio y clamidoconidios, sin darles ninguna connotación.

Diez años después Audrey, reportó que las diversas morfologías que presenta la levadura son producidas dependiendo de las condiciones ambientales. En 1890 Zopt, llamó a este hongo *Monilia albicans*; nombre que se hizo popular en la literatura médica, aunque el género *Monilia* está más relacionado como patógeno de plantas. En el siglo XX se reportaron otras formas de infección causadas por *Candida*, como candidosis generalizada por Schmorl; onicomiosis por *Candida* descrita por Dubendorfer y enfermedad cutánea por Jacobi. Otro hecho importante durante esta época fue la descripción del género *Candida* incluyendo las especies que formaban pseudohifas. Finalmente el nombre de *Candida* fue aceptado en VIII Congreso Internacional de Botánica en París en 1954 (37) (58).

## 1.2 Género *Candida*

El género *Candida* pertenece al Phylum Ascomycota, a la familia Saccharomycetaceae del orden Saccharomycetales, que comprende un grupo heterogéneo de levaduras anamórficas (21) (24). En algunas especies se ha identificado su fase teleomórfica o estado sexual (Cuadro 1). El Género *Candida* incluye alrededor de 200 especies (5). De estas especies, nueve son las que se aíslan con mayor frecuencia: entre ellas *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. krusei* y *C. lusitanae*.

**Cuadro 1. Fases teleomórficas que se han identificado de algunas de las 200 especies de *Candida*.**

Fase anamorfa	Fase teleomorfa
<i>Candida lambica</i>	<i>Pichia fermentans</i>
<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Pichia guilliermondii</i>
<i>Candida kefyr</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>Marxianus</i>
<i>Candida krusei</i>	<i>Issatchenkia orientales</i>
<i>Candida lipolytica</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>
<i>Candida lusitaniae</i>	<i>Clavispora lusitaniae</i>
<i>Candida norvegensis</i>	<i>Pichia norvegensis</i>
<i>Candida pulcherrima</i>	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
<i>Candida utilis</i>	<i>Pichia jadinii</i>

Tomado y modificado de Bodey, 1993 (57)

### 1.2.1 Características fenotípicas

Las especies de *Candida* presentan diferentes morfologías en su fase anamorfa; pueden ser redondas, ovales-elongadas y de varios tamaños (1.5 a 15µm), con una gema polar. Las células levaduriformes pueden tener tres diferentes procesos morfológicos: formación de blastoconidios, pseudohifas e hifas. Existen determinados factores que influyen en la forma que adoptan las diferentes especies como el pH, la fuente de carbono y nitrógeno. Las pseudohifas pueden ser células alargadas, dicotómicas y se diferencian de las hifas en que estas últimas no presentan continuación a nivel de los septos que delimitan las células (37) (58).

En 1995 Sullivan DJ y cols. (71) (72) describieron una nueva especie llamada *Candida dubliniensis* aislada a partir de la mucosa bucal de pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) y manifestaciones de candidosis bucal. El nombre de esta especie se atribuye a que el primer caso fue descrito en Dublín, Irlanda. En ese año se realizó un estudio epidemiológico de candidosis

bucal en individuos irlandeses infectados con VIH y pacientes con SIDA. A principios de los 1990's observaron mayor producción de clamidoconidios en los aislamientos, fue considerada como característica morfológica específica de especie. El análisis profundo de la morfología de estos aislamientos reveló que constituían dos especies distintas claramente separadas, pero que compartían algunas características fenotípicas. *Candida albicans* y *C. dubliniensis* crecen en agar dextrosa Sabouraud con cloranfenicol y cicloheximida, producen tubo germinativo, características previamente consideradas como específicas para la identificación de *C. albicans* (39). En la literatura existen algunas descripciones como la de Sullivan DJ en 1995 (71), Jabra-Rizk MA en 1998 (30) y Koehler AP (34) en 1999 quienes confirmaron que las cepas de *C. dubliniensis* pueden diferenciarse de *C. albicans* por la formación rápida y abundante de clamidoconidios en agar Staib. El análisis comparativo del crecimiento a 45°C, es otra prueba para diferenciar estas dos especies, en la cual *C. dubliniensis* presenta crecimiento escaso o nulo a esta temperatura (17) (55). El CHROMagar *Candida*® también puede ayudar a la diferenciación de *C. albicans* y *C. dubliniensis* desde el primer aislamiento; las colonias de *C. albicans* son de color verde claro y las de *C. dubliniensis* de color verde oscuro, aunque esta coloración puede cambiar dependiendo del tiempo de incubación (19) (50). Gales AC y cols (17) y Salkin IF y cols (60) reportaron que *C. dubliniensis* a diferencia de la gran mayoría de los aislamientos de *C. albicans* no asimila el  $\alpha$ - D- metil glucosido y D- Xilosa. Por otro lado, *C. dubliniensis* crece mucho mas lento que *C. albicans* en presencia de trealosa como única fuente de carbono (73).

### **1.2.2 Pruebas para la identificación de *Candida***

Las colonias de *Candida* se desarrollan en medios aerobios con pH que va de 2.5 - 7.5 a una temperatura de 20 a 38°C; la coloración de la colonia varía de blanco a amarillento, crecen rápidamente en tres días. Las colonias pueden ser lisas, opacas, brillantes o secas, rugosas o planas (5) (49).

Para identificar las diferentes especies de *Candida* se deben realizar las siguientes pruebas: la producción de clamidoconidios en agar Harina de Maíz (AHM), la formación de tubo germinativo en suero, las características morfológicas en CHROMagar *Candida*®, morfología macroscópica y microscópica en agar Staib, la producción de opacidad en agar Tween 80 y pruebas de asimilación y fermentación de carbohidratos .

#### **Clamidoconidios en Agar Harina de Maíz (AHM)**

Los aislamientos de *C. albicans* y *C. dubliniensis* producen clamidoconidios cuando se siembran en AHM adicionado con Tween 80 al 1%, utilizando la técnica de Dalmau, cuyo principio se basa en realizar dos trazos lineales de 3.5 cm. de longitud con 1.2 cm. de separación sobre la placa de AHM, colocar un cubreobjeto con la finalidad de estabilizar el gradiente de la tensión de oxígeno, de tal manera que la levadura obtenga la cantidad de gas requerida para la formación de clamidoconidios que son estructuras globosas, de 6 a 12  $\mu\text{m}$  de diámetro, de pared gruesa, que se desarrollan en el ápice de la hifa sobre el cuerpo suspensor (43).

### **Tubo germinativo**

El tubo germinativo representa la iniciación del crecimiento de la hifa directamente de la célula levaduriforme; se considera una prolongación de la pared celular de la levadura, desde su punto de origen y no presenta constricciones. Esta prueba es un procedimiento simple, económico y fácil de realizar en un tubo que contenga 0.5 ml de suero humano o bovino, se incuba a 37°C durante 2 horas. La formación de esta estructura esta determinada por el medio utilizado, tamaño del inóculo, temperatura de incubación, concentración de carbohidratos y condiciones microaerobias (43).

### **CHROMagar *Candida*®**

Este método fue descrito en 1994 por Odds y cols (50), es un medio cromogénico que ayuda a la diferenciación e identificación presuntiva de algunas levaduras con base en la coloración de las colonias, producidas por reacciones de enzimas especie-específicas con el sustrato cromogénico. La ventaja de este medio es facilitar la identificación presuntiva desde el primer aislamiento, así como identificar la mezcla de colonias (6) (19). Las colonias de *C. albicans* son de color verde claro; *C. tropicales* azules; *C. krusei* rosa pálido y *C. dubliniensis* colonias verde oscuro.

### **Agar Staib**

Este medio fue descrito por Staib P. en 1999 (68) y confirmado en el 2000 por Staib F. (67) para diferenciar entre *C. albicans* y *C. dubliniensis* basándose en

la morfología macro y microscópica. Las colonias de *C. dubliniensis* son de superficie rugosa con crecimiento filamentoso alrededor de las colonias y microscópicamente forma clamidoconidios en racimo en el ápice de las hifas, sobre el cuerpo suspensor. Por el contrario las colonias de *C. albicans* son de superficie lisa con crecimiento micelial que es la formación de blastoconidios sobre la hifa.

Este medio es económico, útil, de alta sensibilidad y se considera que el sobrecrecimiento micelial y la formación abundante de clamidoconidios son características fenotípicas para la especie *C. dubliniensis* (44).

### **Agar Tween 80**

Este medio fue descrito por Slifkin (61) en 2000, como prueba diferencial de especies de *Candida*, principalmente entre *C. albicans* y *C. dubliniensis*. El principio se basa en la acción de enzimas lipolíticas (esterasas y fosfolipasas), liberando ácidos grasos, los cuales se unen al calcio incorporado al medio de cultivo. El resultado es la formación de una opacidad alrededor de las colonias de *C. albicans* debido al depósito de cristales insolubles.

### **Asimilación de carbohidratos**

Los diferentes métodos que nos permiten valorar el patrón de asimilación de carbohidratos específico de las especies de levaduras para su identificación como el método tradicional de Wickerhman y Burton (85), las pruebas comerciales como API 20C, AUX, ID 32C y el Vitek YBC (Yeast Biochemical Card).

## **VITEK YCB (Yeast Biochemical Card).**

Este es un sistema computarizado compuesto de 30 pozos; cada uno de los pozos contiene diferentes carbohidratos y un indicador de pH. Las placas se llenan por capilaridad con una suspensión de la levadura problema, cuya transmitancia requerida es  $50 \pm 3$  medida con un espectrofotómetro portátil; estas se incuban a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. La lectura se realiza en un espectrofotómetro computarizado, el cual mide la transmitancia y absorbancia, evidenciada por la presencia de color, el resultado lo da el aparato por porcentaje de similitud de la especie de levadura.

### **Interpretación de Resultados**

La identificación de seguridad es cuando el porcentaje es mayor de 95%; dudoso entre 80-95% y no identificable menor de 80%. Cuando las levaduras no son identificadas puede deberse a las siguientes razones:

- 1) Porque la especie dada no este considerada dentro de la identificación del programa.
- 2) Que el cultivo este contaminado.
- 3) Que se trate de una especie nueva.

### **1.2.3 Hábitat**

*Candida* forma parte de la biota normal del organismo y se localiza normalmente en la mucosa de la faringe, anorectal, vaginal; oído externo y piel (57).

#### 1.2.4 Factores predisponentes

En el cuadro 2 se muestran los factores de oportunismo que con mayor frecuencia contribuyen en el cambio de la levadura, de un estado comensal a parásito.

De todos los factores de oportunismo, en este trabajo nos enfocamos a pacientes que cursaban con diabetes mellitus (49) (58) (80).

#### Cuadro 2. Factores de riesgo que contribuyen en una Candidosis

Factores predisponentes
Cambios fisiológicos: Embarazo, cambio en el pH de la vagina. Prematuros y ancianos Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida Enfermedades endocrinológicas: Diabetes mellitus Neoplasias: Linfomas, leucemias. Administración de corticoesteroides y citotóxicos, el uso prolongado de antibióticos. Uso de catéter urinario Diálisis peritoneal

#### 1.2.5. Candidosis

La Candidosis es una infección ocasionada por levaduras del género *Candida*, las manifestaciones clínicas de la enfermedad son muy variadas y dependiendo del órgano afectado y la infección puede localizarse en boca, faringe, piel (principalmente en pliegues), vagina, uñas, bronquios, pulmones, sistema genitourinario, tubo gastrointestinal, corazón, meninges y causar incluso septicemia (37) (57).

### 1.2.6 Diabetes mellitus (DM)

La DM es una enfermedad del metabolismo de los carbohidratos como consecuencia de la secreción deficiente de insulina, por lo que lleva a un aumento en la concentración plasmática de la glucosa. Debido a estas alteraciones metabólicas, el individuo presenta diferentes manifestaciones clínicas como: aumento en la frecuencia de micciones (poliuria), polidipsia, polifagia, pérdida de peso, debilidad, fatiga e infecciones (23) (30).

En la clasificación de la DM se incluyen dos grupos generales que son los individuos insulín dependientes y no insulín dependientes. Los primeros o DM tipo 1, es la forma más grave, es menos frecuente en México, se considera una frecuencia de 1-2% de la población diabética. En cambio, los individuos no insulín dependientes o DM tipo 2 es la forma más frecuente. En México, se calcula que el 98-99% de los casos de DM, generalmente se inicia en la edad adulta, tiene un curso asintomático y se diagnostica con la determinación en varias ocasiones, de un aumento en la concentración de la glucosa en sangre venosa, mayor de 120 mg / dl; o por una curva de tolerancia a la glucosa, donde el valor es igual o mayor de 180 mg / dl dos horas después de la administración de la carga de glucosa por vía bucal (2) (30).

En los pacientes diabéticos deben considerarse algunos aspectos particulares, ya que se trata de una enfermedad crónica que presenta complicaciones agudas y tardías; por lo tanto es esencial mantener un buen control metabólico con la determinación de niveles de glucosa en sangre y la hemoglobina glucosilada, colesterol y triglicéridos.

Existen algunos parámetros para determinar el control de la diabetes mellitus de acuerdo con la Asociación Americana de la Diabetes (52) (Cuadro 3).

**Cuadro 3. Índice bioquímico de control metabólico en la diabetes mellitus**

Índice	Normal	Aceptable	Pobre
Glucosa en sangre en ayunas (mg/dl)	<115	<140	>200
Glucosa en sangre posprandial, 2h (mg/dl)	<140	<200	>235
HbA1c (%)	<6	<8	>10
Colesterol en sangre en ayunas (mg/dl)	<200	200-239	>240
Triglicéridos en sangre en ayunas (mg/dl)	<150	150-249	>250

Tomada de Islas 1993 (30) Pauvilai 1999 (52).

### 1.2.7 Infección de vías urinarias

Las infecciones en vías urinarias (IVU) engloban diversas entidades clínicas (uretritis, cistitis, pielonefritis, abscesos renales y bolas fúngicas), caracterizadas por la colonización y/o invasión del sistema urinario por microorganismos patógenos (65) (66). Estas infecciones constituyen uno de los padecimientos más frecuentes y son causa común de la consulta médica; se calculan en 7 millones de las consultas anuales. De acuerdo con las diferentes publicaciones internacionales, la incidencia en mujeres varía de 0.5-0.7 % por año. Las infecciones recurrentes se presentan en 25-30% de las mujeres, quienes han experimentado una infección previa, mientras que en el hombre es menos frecuente y es de 15 infecciones por 10,000 (3) (18) (47) (87). Puede afectar a

individuos de cualquier edad, con un predominio en las mujeres sexualmente activas y en individuos de edad avanzada (18).

Por otro lado, la IVU es la causa de un millón de ingresos anuales a los hospitales generales y se considera el 50% de las infecciones hospitalarias (33) (46). En México, estas infecciones ocupan el primer lugar en hospitales dedicados a la atención de individuos de edad adulta (75). Diferentes factores o enfermedades predisponen a una mayor frecuencia, recurrencia y severidad de las IVU como alteraciones estructurales y funcionales del sistema excretor, embarazo, transplantes de órganos sólidos, granulocitopenia, enfermedad granulomatosa crónica, Síndrome de inmunodeficiencia adquirida, enfermedad renal poliquística, diabetes mellitus, administración prolongada de antimicrobianos y el uso continuo de catéter urinario (más del 70%) (2) (18) (35) (69).

#### **1.2.7.1 Diabetes mellitus e infección de vías urinarias.**

La frecuencia de infecciones en los pacientes diabéticos se relaciona directamente con los títulos altos de glucosa en sangre. La incidencia de IVU como causa de morbilidad, en estos pacientes ha aumentado y se reporta de 0.9 a 2.0 / 1000 pacientes (88).

En varios estudios epidemiológicos relacionados con IVU y DM describen la bacteriuria y la IVU como padecimientos más comunes en mujeres con DM, hasta dos veces más, que en mujeres sin DM. La frecuencia de bacteriuria en estas mujeres es de 26% y 6%, respectivamente. Por otro lado, la DM es la enfermedad más común relacionada con funguria, se calcula una frecuencia del 39% (69).

Existen varios factores en los pacientes con DM que aumentan el riesgo de presentar o desarrollar IVU, como un control deficiente de la glucosa en sangre, evolución de la enfermedad, complicaciones en la microcirculación, neuropatías; en mujeres: actividad sexual, el uso de anticonceptivos (diafragmas, espermicidas, preservativos) y vaginitis recurrente (70). Otros factores que se tienen que tomar en cuenta son la deficiente actividad leucocitaria secundaria a la hiperglucemia, debido a una disminución en la quimiotaxis, la fagocitosis y deficiente destrucción del microorganismo fagocitado por los polimorfonucleares (3). Algunos microorganismos tienden a aumentar su desarrollo en ambientes hiperglicémicos, como las levaduras del género *Candida*.

#### **1.2.7.2 Infección fúngica de vías urinarias y agentes etiológicos**

La principal causa responsable de la patología inflamatoria del sistema urinario es la infección de vías urinarias (82). Los organismos que colonizan con mayor frecuencia y poseen reconocida capacidad de invasión de estos órganos son las enterobacterias, aunque ocasionalmente los hongos y los virus pueden estar implicados. Hay ciertos microorganismos que con mayor frecuencia causan IVU, donde las bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* ocasionan más del 50% de los casos (36) (47) (64) (Cuadro 4).

**Cuadro 4. Frecuencia de microorganismos aislados en infección de vías urinarias.**

Bacterias Gram positivas	(%)	Bacterias Gram negativas	(%)	Hongos	(%)
<i>Enterococcus</i> spp.	6.1 – 23	<i>Escherichia coli</i>	21-54	<i>Candida albicans</i>	51.8-68
<i>Streptococcus</i> grupo B	1.2-3.5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1.9-17	<i>C. glabrata</i>	15.6
<i>Staphylococcus</i> coagulosa negativa	1.4-3.7	<i>Enterobacter</i> spp	1.9-9.6	<i>C. tropicalis</i>	7.9-17
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.9-2.0	<i>Citrobacter</i> spp.	4.7-6.1	<i>C. parapsilosis</i>	4.1
		<i>Proteus mirabilis</i>	0.9-9.6	<i>C. krusei</i>	1
		<i>Providencia</i> spp.	18	<i>Trichosporon inkii</i>	7.7
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2-19	<i>Trichosporon ovoides</i>	7.7

Tomada de Bachelier y cols 1997 (3) y de Oliveira RD y cols 2001(12)

En los últimos años las IVU causadas por hongos han tomado un papel importante y representan una incidencia de 9.0 a 20.5 por 10,000 pacientes hospitalizados (88). Se considera la causa más común de las infecciones adquiridas en el hospital relacionada hasta en el 70% con el uso de catéter urinario. Los hongos pueden tener acceso al sistema urinario por vía ascendente o diseminación hematógena (74). La IVU causada por hongos en general, es asintomática, aunque en algunas ocasiones los pacientes pueden presentar dolor al orinar (disuria), urgencia y frecuencia en la micción y ocasionalmente fiebre. Es importante tomar en cuenta que el hallazgo de *Candida* en la orina puede representar contaminación, colonización e infección (29).

La contaminación de la orina es común, especialmente si fue colectada a partir de un individuo del sexo femenino con o sin catéter urinario, ya que pudo haber tenido una colonización en el área genital, la cual se considera con un número de colonias de  $<10^3$  UFC/ml de orina. Se debe tomar en cuenta que las especies de *Candida* pueden colonizar el sistema urinario en pacientes portadores de catéteres urinarios; el significado clínico es poco relevante y el tratamiento es suficiente al retirar el mismo. La colonización es frecuente, pero de forma similar a las infecciones bacterianas su presencia no significa la existencia de IVU, en la mayor parte de las ocasiones se trata de candidurias no significativas. En la colonización se presenta adherencia de algunas levaduras sin que los individuos manifiesten sintomatología y se considera con número de colonias de  $10^3$  a  $10^4$  UFC/ml de orina. Finalmente el término IVU es la invasión al tejido ya sea superficial o profundo; y de acuerdo con varios autores, consideran que el conteo de colonias por mililitro de orina es de  $>10^4$  UFC/ml (10) (12), así como la observación microscópica de incontables levaduras y/o filamentos en el examen directo y frotis (26) (43). En los últimos años las especies diferentes de *Candida albicans* han tomado gran importancia, ya que la han reemplazado. De éstas tenemos a *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr* (22) (49) principalmente *C. glabrata* y *C. tropicalis* son las especies que se aíslan cada vez con mayor frecuencia en casos de candiduria, especialmente en los pacientes diabéticos, en quienes reciben múltiples antibióticos o son portadores de sonda urinaria (76). En pacientes hospitalizados *C. albicans* y *C. glabrata* son las especies más frecuentemente aisladas (32). En un estudio multicéntrico se encontró a *C. albicans* en 446 (51.8%) de 861 pacientes, seguida

de *C. glabrata* que se presentó en 134 pacientes (15.6%). En aproximadamente el 10% de los pacientes, se han descrito asociación de especies de levaduras, así como la coexistencia con bacterias. *C. tropicalis* y *C. glabrata* son las especies que comúnmente se aíslan en aquellos pacientes, a los cuales no se les ha aplicado catéter urinario. El riesgo de las infecciones causadas por *Candida* spp en pacientes hospitalizados es la diseminación a otros órganos, causando candidemias (33).

#### **1.2.8. SENSIBILIDAD ANTIFÚNGICA**

La epidemiología de las infecciones por hongos ha presentado cambios importantes, como el incremento en la frecuencia como causa significativa en la morbilidad, principalmente en pacientes inmunocomprometidos. La mayoría de estas infecciones son causadas por *Candida* spp., considerada como el cuarto agente causal de micosis hospitalarias. En años recientes las especies mencionadas diferentes a *C. albicans* han aumentado en los casos de fungemia, hasta en el 60% (16).

El tratamiento de infecciones fúngicas ha cambiado en la última década debido a la introducción de nuevos agentes antifúngicos (4) (62). El descubrimiento de la actividad antifúngica de los componentes azólicos representa un desarrollo importante en el tratamiento de las micosis. Recientemente se han desarrollado triazoles como el itraconazol y fluconazol, caracterizados por su actividad de amplio espectro, aumento en la potencia, seguridad en la administración prolongada y disminución en la toxicidad (8). Sin embargo la disponibilidad y el aumento en el uso prolongado de drogas antifúngicas, ha

llevado a las diferentes especies de *Candida*, al desarrollo ó incremento en la resistencia a estas drogas.

La presencia cada vez más frecuente de especies resistentes al tratamiento antifúngico, hace necesario realizar pruebas de sensibilidad a todos los aislamientos causantes de candidemia o que proceden de pacientes inmunosuprimidos. Muchos de los hongos emergentes presentan resistencia a los antifúngicos clásicos y empiezan a aumentar significativamente la frecuencia de aislamientos resistentes pertenecientes a especies que eran sensibles, como en el caso de *Candida albicans* al fluconazol (15) (20) (41).

La resistencia a los antifúngicos puede dividirse en dos categorías: clínica e *in vitro* (primaria o secundaria). La resistencia clínica se presenta por el fracaso del tratamiento antifúngico y no necesariamente se asocia con una disminución en la sensibilidad *in vitro*. La resistencia *in vitro* primaria, (intrínseca o innata), es la que presenta el microorganismo de forma natural (sin exposición previa), es decir la ausencia de sensibilidad de un determinado hongo hacia los antifúngicos. La resistencia *in vitro* secundaria (adquirida), aparece cuando un microorganismo que inicialmente es sensible, al exponerlo a diferentes drogas antifúngicas adquiere resistencia (79). La resistencia mayor ha sido reportada frecuentemente en aislamientos bucofaríngeos de *C. albicans* de pacientes con SIDA. La resistencia observada en *C. glabrata* es más común (76) (84). En 1988 Warnock DW y cols (81) reportaron el primer caso de resistencia clínica "*in vitro*" de *C. glabrata* a fluconazol. En los siguientes tres años, nuevas descripciones de candidosis causadas por *C. glabrata* y *C. krusei* tratadas con fluconazol han presentado resistencia al tratamiento (51) (84) (86).

### **1.2.8.1 Mecanismos de resistencia a drogas antifúngicas.**

Dentro de los mecanismos celulares implicados en el desarrollo de resistencias a los antifúngicos se incluyen: alteraciones en la membrana plasmática, defectos enzimáticos, aumento en la síntesis de compuestos que compiten con el antifúngico y alteraciones en las células diana. La resistencia genética radica, en mutaciones cromosómicas aunque también se han descrito mutaciones extracromosómicas. Los mecanismos de resistencia al fluconazol, aparentemente son cambios microevolutivos que ocurren durante el tratamiento (39) (53) (78).

### **1.2.8.2 Pruebas de sensibilidad antifúngica "in vitro"**

El descubrimiento de la actividad antifúngica de los diferentes azoles representan un desarrollo importante en el tratamiento de las micosis, y es en 1983 cuando la comunidad científica se interesó por normalizar las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos, debido al impacto que representa el aumento de las infecciones fúngicas en enfermos con SIDA o inmunosuprimidos por otras causas y por la aparición de las primeras resistencias a los azoles observadas en diferentes especies de hongos. The National Committee for Clinic Laboratory Standards (NCCLS) se dio a la tarea de crear un comité para establecer las condiciones de trabajo normalizadas, medio de cultivo, inóculo, temperatura de incubación, pH, etc. (48). Los esfuerzos de este comité culminaron con la publicación del documento M27-A (1997), donde se estandarizan las técnicas de sensibilidad antifúngica de macro y microdilución para las levaduras. La lectura de las técnicas se basa en determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), la

cual significa obtener la concentración más baja del antifúngico para inhibir completamente el crecimiento del microorganismo, en caso de utilizar anfotericina B se cumple este objetivo. Por el contrario con los azoles la inhibición del crecimiento es parcial, dada por el crecimiento de microcolonias dentro del halo de inhibición ("*trailing zone*"), esto ha dificultado su lectura; de tal manera que la CMI es la concentración donde se observa una disminución del crecimiento al 80% respecto al testigo sin antifúngico. En la actualidad disponemos de diferentes métodos para valorar la sensibilidad de los antifúngicos, como difusión en disco, tira, placa y los métodos de dilución en tubo y microdilución (45).

### **Métodos comercializados de sensibilidad antifúngica**

En los últimos años se han desarrollado diferentes métodos para evaluar la sensibilidad antifúngica *in vitro*, entre ellos están el Neosensitab ® (42) Panel Antifúngico Colorimétrico ("*Sensitre*") ® (9), FUNGITEST® (89) y E-test.

### **Método de difusión en agar E-test ®**

Esta prueba de difusión se basa en un gradiente definido de antimicótico, el cual esta incorporado en tiras de plástico delgadas, inertes y no porosas, de 5 x 60 mm. La tira se divide en dos partes, la sigla superior muestra el código E que identifica al antimicótico. La parte inferior esta calibrada con las concentraciones de la CMI en  $\mu\text{g/ml}$  de la droga (1) (Fig. 1). El método es fácil de realizar y se usa para determinar la CMI del antimicótico necesaria para inhibir el crecimiento de levaduras en un medio estandarizado RPMI 1640 (Roswell Park Memorial

Institute) tiene buena concordancia con los métodos de referencia; sin embargo, su lectura presenta ciertas dificultades, en particular con *C. tropicalis* (28).

Es posible identificar 4 diferentes patrones de lectura para la CMI's:

- 1) Punto de intersección bien definido
- 2) Crecimiento de microcolonias dentro de la zona de inhibición.
- 3) Doble halo, ilustrado por el crecimiento de microcolonias justo en el borde de inhibición.
- 4) Resistencia con crecimiento homogéneo alrededor de la tira.

La reproducibilidad de una prueba depende de una buena estandarización del inóculo, la temperatura y el tiempo de incubación. La comparación entre el método E-test y el método de dilución en caldo de la NCCLS para valorar CMI de antifúngicos, determinaron que E-test es un método útil como opción alternativa para probar la sensibilidad antifúngica de levaduras patógenas. La principal desventaja de esta prueba es que en ocasiones se presenta dificultad para definir el borde preciso de la zona de inhibición, particularmente cuando se trata del fluconazol. Para evitar el error en la lectura de los puntos de intersección el resultado siempre debe ser leído por la misma persona (11) (13) (14).

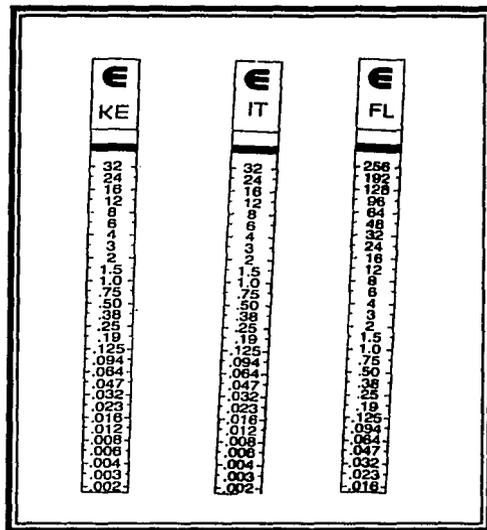


Fig. 1 Tiras reactivas utilizadas en pruebas de sensibilidad antifúngica por método de difusión en agar E-test

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los últimos años las infecciones de vías urinarias causadas por hongos han presentado gran relevancia, por el aumento significativo observado en pacientes hospitalizados. Estas infecciones están asociadas a diferentes factores de inmunosupresión, dentro de los cuales destacan diabetes mellitus, SIDA, neoplasias, el uso de catéter urinario, la administración prolongada de antimicrobianos y de drogas inmunosupresoras.

La DM es una enfermedad metabólica la cual favorece las IVU, que generalmente es de curso crónico y asintomático. Los pacientes diabéticos presentan un aumento en la colonización por hongos en vías urinarias, principalmente *Candida* spp. De acuerdo con algunas publicaciones se ha mostrado que el 25 % de los pacientes diabéticos cursaron con colonización de vías urinarias por *Candida* spp. y la infección de vías urinarias por estas levaduras se presentó en el 76% de los casos. No obstante en los avances en los estudios epidemiológicos, clínicos y de diagnóstico, aún la presencia de *Candida* spp. en la orina es una interrogante, ya que se desconoce el papel que puede jugar y el riesgo que presentan los pacientes diabéticos de diseminación hematógena a otros órganos.

Por otro lado, muchas levaduras causantes de IVU son resistentes a los tratamientos antifúngicos; este hecho ha limitado el establecimiento de un tratamiento oportuno y adecuado en los pacientes con DM.

En el Laboratorio de Micología Médica de la Facultad de Medicina, se han llevado a cabo estudios en pacientes con factores de inmunosupresión como SIDA, neoplasias y diabéticos. En este último padecimiento se ha estudiado el

riesgo que tienen de presentar infecciones por *Candida* spp. en la piel, uñas, vagina y como causa de septicemia y peritonitis. También se han realizado estudios de sensibilidad antifúngica por los métodos de Fungitest, ATB fungus. Recientemente a los aislamientos obtenidos de pacientes con peritonitis se les determinó la sensibilidad antifúngica por el método de E-test.

En México son pocos los estudios que se han realizado acerca de la frecuencia de IVU en pacientes diabéticos. No hay trabajos de investigación relacionados con la IVU causadas por levaduras y su patrón de sensibilidad antifúngica. Por lo tanto, es importante realizar más estudios para conocer el impacto de la IVU en los pacientes con DM, determinar el agente causal y detectar las cepas que presentan resistencia antifúngica, para poder establecer un tratamiento específico en este tipo de pacientes.

### 3. OBJETIVOS

- ❖ Aislar e identificar *Candida spp.* a partir de la orina de pacientes con diabetes mellitus compensados y descompensados.
- ❖ Determinar la frecuencia de levaduras del género *Candida spp.* como causa de infección en vías urinarias de pacientes diabéticos.
- ❖ Correlacionar los aislamientos de *Candida spp.* con el tipo de diabetes.
- ❖ Evaluar sensibilidad antifúngica de los aislamientos de las diferentes especies de *Candida*.

#### 4. HIPÓTESIS

De la orina de pacientes con DM se obtendrá un número significativamente mayor de aislamientos de *Candida* spp. con respecto a la orina de individuos sanos.

En la orina de pacientes con DM descompensada se encontrará un mayor número de aislamientos de *Candida* spp. asociados a infección de vías urinarias que en los pacientes con DM compensada.

*Candida albicans* será el principal agente causal de infección de vías urinarias en pacientes diabéticos.

*Candida glabrata* será altamente resistente a los diferentes azoles.

## **5. MATERIAL Y MÉTODO**

### **5.1 Población estudiada**

Se estudiaron 48 pacientes con diabetes mellitus tipo 2 que acudieron a la consulta externa de Endocrinología del Hospital General Dr. Darío Fernández Fierro, ISSSTE de enero a diciembre del 2002. Los pacientes se dividieron en dos grupos de acuerdo con los parámetros de glucosa en sangre y de Hb glucosilada, establecidos por el servicio de Endocrinología y basado en los parámetros de la Asociación Americana de Diabetes (cuadro 3):

- 27 pacientes con diabetes mellitus descompensada.
- 21 pacientes con diabetes mellitus compensada.

Se estudiaron 20 individuos sanos como grupo testigo, sin ningún factor de oportunismo ni manifestaciones de infección en vías urinarias.

### **5.2 Criterios de exclusión:**

- 1) Pacientes con catéter o sonda urinaria.
- 2) Pacientes en tratamiento con antimicrobianos de amplio espectro, esteroides o cualquier droga inmunosupresora.
- 3) Pacientes con manifestaciones clínicas ó alteraciones de laboratorio de insuficiencia renal.
- 4) Pacientes que presentaban cualquier otra enfermedad inmunosupresora.

### **5.3 Espécimen biológico**

De todos los pacientes se obtuvo en un frasco de boca ancha estéril la primera orina de la mañana por micción espontánea de la porción media del chorro.

### **5.4 Procesamiento de muestras**

De cada uno de los pacientes incluidos en el estudio se les interrogó para obtener los siguientes datos: edad, sexo, tiempo de evolución de DM, antecedentes de IVU, uso de antibióticos de amplio espectro y antifúngicos. Se solicitaron exámenes de laboratorio: Biometría hemática (BH), química sanguínea (Q.S) y examen general de orina (EGO), urocultivo y hemoglobina glucosilada (HbA<sub>1c</sub>).

La muestra obtenida de los pacientes se transportó al laboratorio de Micología Médica de la Facultad de Medicina, UNAM y se procesó de la siguiente manera.

En condiciones de esterilidad se depositaron 3 ml de orina en tubos de ensayo de 7x1 cm y se centrifugaron durante 15 minutos. El sobrenadante se decantó y con el sedimento se realizó: un examen microscópico directo y un frotis con tinción Gram.

Se cultivaron 200µl del sedimento en agar dextrosa Sabouraud (SS) (Apéndice) y 200µl en agar dextrosa Sabouraud con cicloheximida y cloramfenicol (SA) (Apéndice) y 200µl en CHROMagar Candida® (Apéndice). Las placas ya inoculadas se incubaron a 28°C y 37°C durante 48 horas.

Se realizó un conteo del número de colonias levaduriformes obtenidas para determinar IVU siguiendo con los parámetros descritos en la literatura: contaminación  $<10^3$  UFC/ml, colonización  $10^3$  a  $10^4$  UFC / ml e infección  $>10^4$  UFC/ml (10) (12).

A partir de todos los cultivos levaduriformes obtenidos se estudió la morfología macroscópica y microscópica para la identificación del género *Candida*.  
Morfología macroscópica: Forma, superficie, color, consistencia de las colonias, producción de pigmento.

Morfología microscópica: Forma de las levaduras, tamaño, formación de pseudohifas.

## **5.5 Pruebas de identificación para *Candida***

### **5.5.1. Formación de tubo germinativo**

Con una asa bacteriológica estéril se tocó ligeramente una colonia levaduriforme crecida en SS durante 48 horas a 30°C, el inóculo se suspendió en tubos que contenían 0.5 ml de suero, los se incubaron a 37°C durante 2 horas. Se colocó una gota del suero que contenía las levaduras, entre un porta y cubre objetos, y se examinó con el microscopio de luz, usando el objetivo 10X y 40X para confirmar la presencia de la formación de un tubo germinativo.

### **5.5.2. Producción de clamidoconidios**

En condiciones de esterilidad se tomó una colonia de 48 horas de crecimiento a 30°C y se sembró por la técnica de Dalmau en agar harina de maíz (AHM) (Apéndice), se incubó a 28°C durante 48 horas. La lectura se realizó

directamente de las colonias crecidas bajo el cubreobjetos en el microscopio a 10X y 40X en busca de la formación de clamidoconidios.

### **5.5.3. Morfología macroscópica y microscópica en agar Staib**

Con un palillo estéril se tomó una colonia de 48 horas de crecimiento en SS a 30°C y se sembró sobre la superficie del agar Staib (Apéndice) por la técnica de punteo. Se incubó a 30 °C durante 48 horas. Posteriormente se estudió la morfología macroscópica de la colonia, tomando en cuenta los siguientes parámetros: aspecto y la formación de una zona filamentosa alrededor de la colonia. El estudio microscópico se realizó por examen directo de la zona filamentosa, teñido con azul de algodón y se buscó la formación de clamidoconidios dispuestos en racimos de tres o más para la identificación de *C. dubliniensis* y de uno o dos para *C. albicans* (67) (68).

### **5.5.4. Prueba de opacidad**

Con un asa bacteriológica estéril se tomó una pequeña porción de la colonia crecida en SS a 30°C durante 48 horas y se suspendió en un tubo que contenía 2 ml de solución salina estéril al 0.85%, para obtener una concentración de  $1 \times 10^6$  colonias / ml; se introdujo un hisopo a la solución y se sembró presionando en círculos de 1cm de diámetro sobre el agar Tween 80 (Apéndice); el agar ya inoculado con la cepa problema se incubó a 30°C durante 10 días y se revisó cada 24 horas. La prueba fue positiva al observar un precipitado que se forma alrededor de la colonia por la acción lipolítica de *C. albicans* (61).

#### **5.5.5. CHROMagar Candida®**

En condiciones de esterilidad se tomó una colonia de 48 horas de crecimiento y con un palillo previamente esterilizado se sembró por punteo en CHROMagar Candida® (Apéndice) las placas se incubaron a 37°C durante 48 horas. Se valoró el coloración de las colonias crecidas. Los resultados se compararon con los parámetros establecidos por Odds en 1994 para auxiliarnos en la identificación de la especie de levadura (19) (50).

#### **5.5.6. Crecimiento a 45° C en agar papa dextrosa (APD) y agar dextrosa peptona extracto de levadura (ADPEL)**

Con un asa bacteriológica estéril se tomó una porción de la colonia sugestiva de *C. albicans* y *C. dubliniensis* crecida en SS a 30° C y se suspendió en un tubo que contenía solución salina estéril al 0.85%, hasta tener una concentración de  $10^5$  UFC / ml. De la suspensión se tomó 1µl y se colocó en la superficie de la caja de petri con APD y ADPEL (Apéndice) y se extendió sobre la superficie del agar por la técnica de estria cerrada. Los medios de cultivo ya inoculados se incubaron a 45° C durante 48 horas. Se realizó el conteo de las colonias crecidas de cada cepa problema. Esta prueba fue realizada por triplicado para obtener una mayor confiabilidad de los resultados.

### **5.5.7. Prueba de asimilación de carbohidratos**

Sistema automatizado Vitek Yeast Biochemical Card (Vitek YCB®)

De un aislamiento de 18 a 48 horas de crecimiento, se tomó una asada de la colonia y se depositó en un tubo con solución salina estéril al 0.85%; se hizo una suspensión equivalente de  $1 \times 10^5$  UFC / ml. En una placa de Vitek® se colocó un tubo de transferencia, para llenar los pozos de la YBC con la suspensión. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas. La interpretación de los resultados de la asimilación de carbohidratos se determinó mediante el lector de placas, en porcentaje de similitud para la identificación final de las especies (Fig 5).

### **5.5.8 Producción de ascosporas en Medio V8**

En condiciones de esterilidad se tomó una colonia de *Yarrowia lipolytica* de 48 h de crecimiento en SS previamente identificada por el método Vitek y se sembró en medio V8 (Apéndice) por la técnica de estría cerrada, se incubó en obscuridad a 28 °C durante un período de 15 a 30 días. Las placas incubadas se revisaron cada 5 días a partir del día 15 para la búsqueda de la formación de ascas con ascosporas mediante la tinción de verde de malaquita (Apéndice).

### **5.5.9 Prueba de sensibilidad antifúngica: E-test**

En condiciones de esterilidad, de cada uno de los aislamientos se tomó una colonia de 48 horas de crecimiento en SS. Se hizo una suspensión de  $1 \times 10^5$  UFC / ml. De la suspensión obtenida se tomaron 200µl y se depositaron en cajas de petri

de 150 mm de diámetro que contenían 25 ml de medio RPMI® 1640 (Apéndice). Con un hisopo se sembró en la superficie del agar por la técnica de estría cerrada y se dejó secar durante 15 min. Posteriormente se colocaron las tiras de plástico impregnadas con el antifúngico (ketoconazol, itraconazol y fluconazol) sobre el agar e inmediatamente se liberó el agente antifúngico dentro de la matriz del agar. Las cajas se incubaron a 35°C durante 48 horas. Finalmente la lectura de la concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó de la siguiente manera: es la línea límite que intercepta el valor de la concentración más baja de la tira antifúngica con el borde bajo de la zona elíptica inhibitoria.

El seguimiento metodológico se muestra en el diagrama de flujo (Fig. 2)

#### **CEPAS TESTIGO**

Se utilizaron dos cepas testigo para control de calidad *C. parapsilosis* ATCC 22079 y *C. krusei* ATCC 6258.

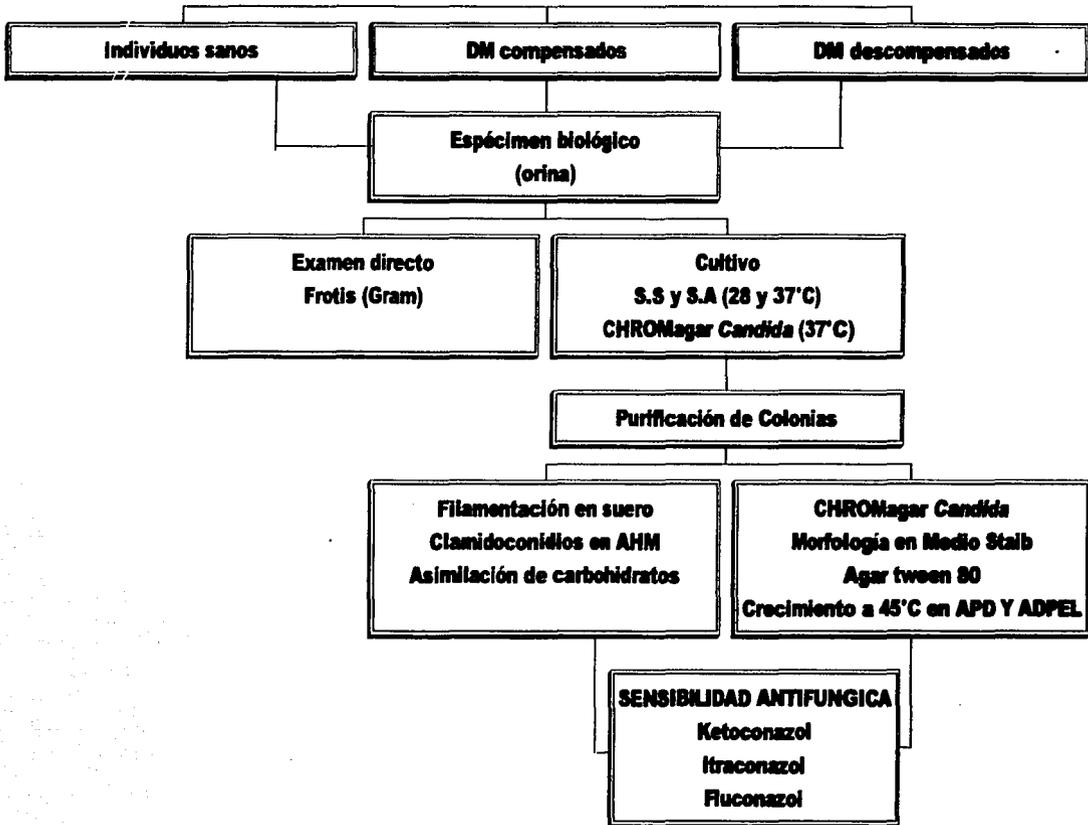
La prueba fue realizada por duplicado para evitar menor rango de error en la lectura.

#### **PRUEBA ESTADÍSTICA**

La prueba estadística empleada fue  $\chi^2$  de proporciones la cual se obtuvo por medio de un método computarizado EPI-info versión 6.4 que compara los porcentajes de los datos observados contra los esperados, para obtener el valor de significancia ( $p > 1$ ).

**Fig. 2 Diagrama de flujo**

## **METODOLOGIA**

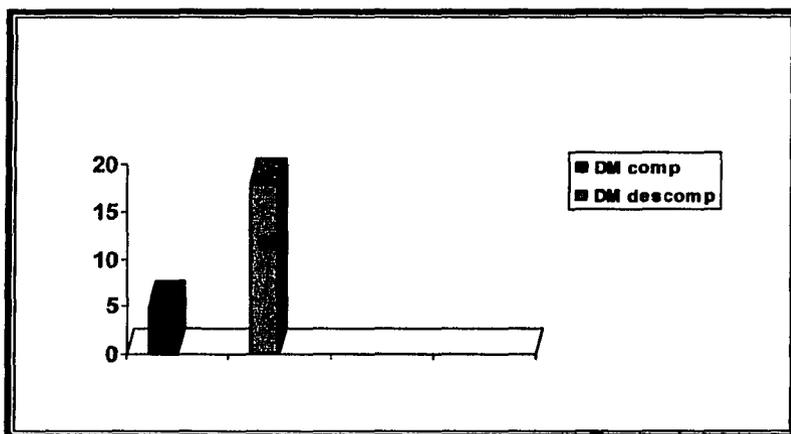


**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## 6. RESULTADOS

De los 48 pacientes con DM estudiados, 14 correspondieron a individuos del sexo masculino y 34 al sexo femenino. La edad fluctuó entre 22 y 74 años con un promedio de 51 años.

En la gráfica 1 se muestra el número de aislamientos de las 48 muestras procesadas, donde solo se obtuvieron 23 aislamientos, de los cuales 18 correspondieron al grupo de pacientes con DM descompensada. De los 20 individuos sanos estudiados en ninguna de las muestras de orina procesadas se obtuvieron aislamientos de *Candida*.



Gráfica 1. Número de aislamientos de *Candida* spp. en pacientes diabéticos

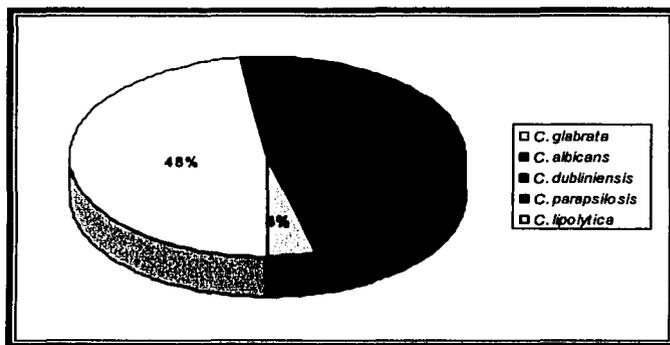
En la mayoría de los aislamientos hubo una correlación de información entre el estudio microscópico directo, frotis con Gram (levaduras incontables y/o filamentos) (Fig 3a) y cultivo positivo (Fig 3b). De acuerdo con los parámetros establecidos los aislamientos se clasificaron como contaminación, colonización e

TELIS CON  
FALLA DE ORIGEN

IVU causada por *Candida* spp. (Cuadro 5) en la cual se encontró que 13 (27%) de 23 aislamientos ( $P= 0.057$ ) fueron causantes de IVU en los pacientes con DM descompensada.

Por otro lado, el crecimiento colonial de levaduras observadas en CHROMagar *Candida*® permitió determinar mezclas de especies de *Candida* en cinco de 23 aislamientos (Fig. 3c). Así mismo fue evidente que cuatro de cinco mezclas observadas se aislaron de pacientes con DM descompensada (cuadro 6).

En la gráfica 2 se muestra el porcentaje de los aislamientos levaduriformes del género *Candida*. De los 23 aislamientos hubo un predominio de las especies diferentes a *C. albicans*. *C. glabrata* fue la especie que se aisló más frecuentemente (48%) seguida de *Candida albicans* (35%).



Gráfica 2. Porcentaje de aislamientos de *Candida* spp. de la orina de pacientes diabéticos

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

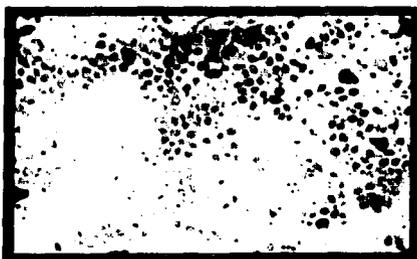


Fig 3a. Frotis de orina teñido con Gram en donde se observa un número incontable de levaduras (100x).

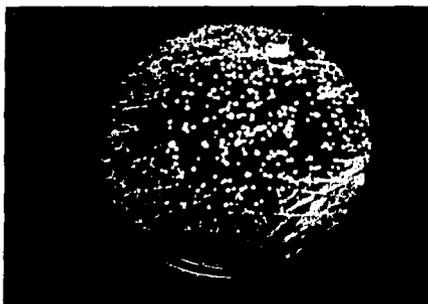
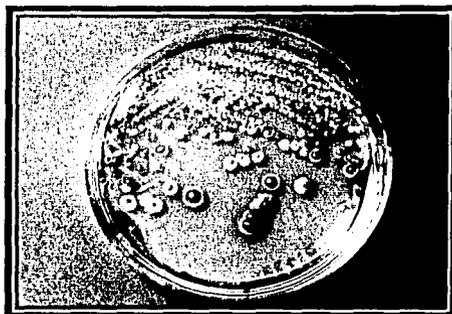


Fig 3b. Cultivo del primer aislamiento positivo para infección por *Candida* spp. ( $> 10^4$  UFC / ml)



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Fig 3c. Mezcla de especies de *Candida* en el primer aislamiento en CHROMagar *Candida*®. *C. albicans* colonias verde claro y *C. glabrata* colonias púrpura.

**Cuadro 5. Correlación entre el tipo de DM y los aislamientos de levaduras.**

Pac. DM	Contaminación (< 10 <sup>3</sup> UFC/ml)	Colonización (10 <sup>3</sup> a 10 <sup>4</sup> UFC/ml)	Infección (>10 <sup>4</sup> UFC/ml)	Total de aislamientos
48	4	6	13	23
Compensados 21	2	1	2	5
Descompensados 27	2	5	11	18

**Cuadro 6. Mezclas obtenidas en los aislamientos levaduriformes**

No. de aislamientos	Contaminación		Colonización		Infección	
23	4		6		13	
Compensados	Mezclas	Únicas	Mezclas	Únicas	Mezclas	Únicas
	0	2	0	1	1	0
Descompensados	0	2	1	3	3	5

En el cuadro 7 se muestran los resultados obtenidos de la identificación de cada una de las especies de *Candida* y las pruebas diferenciales entre *C. albicans* y *C. dubliniensis*. De los 23 aislamientos solo las especies de *C. albicans* y *C. dubliniensis* crecieron en SA, presentaron formación de tubo germinativo en suero humano (Fig 4a) y producción de clamidoconidios en AHM (Fig 4b). En los dos aislamientos de *C. dubliniensis* se observaron colonias de color verde oscuro en CHROMagar *Candida*®, (Fig 6a) y la morfología macroscópica en agar Staib mostró colonias rodeadas por una zona filamentosa (Fig 7a) y microscópicamente se observó la producción de clamidoconidios en racimo (Fig 7b); así también no

presentó actividad lipolítica en agar Tween 80 (Fig 8) y crecimiento mínimo a 45° C en APD Y ADPEL (Fig 9a). Mientras que las colonias de *C. albicans* presentaron una coloración verde claro en CHROMagar Candida® (Fig 6b), y microscópicamente se observaron clamidoconidios únicos en agar Staib (Fig 7c) y abundante crecimiento a 45 °C en APD y ADPEL (Fig 9b).

De las cinco especies de *Candida* identificadas solo tres de ellas (*C. albicans*, *C. glabrata* y *C. lipolytica*) fueron causantes de IVU en los pacientes diabéticos. Por otra parte fue evidente el predominio de los aislamientos de *Candida* 11/13 en los pacientes con DM descompensada (Cuadro 8).

Las especies que se identificaron en las mezclas de levaduras fueron *C. albicans* - *C. glabrata* (Fig 3c) en tres casos de pacientes DM descompensados y *C. albicans* - *C. lipolytica* de un paciente con DM compensada.

**Cuadro 7. Pruebas de identificación y diferenciales de las diferentes especies aisladas en los pacientes diabéticos**

Especie	SS	SA	Fil. en suero	Producción de clamidoconidios en AHM	CHROMagar Candida®	Agar Staib	Agar Tween 80 (*)
<i>C. albicans</i> (8)	+	+	+	+	Verde claro	Colonias con zona filamentosa con/sin clamidoconidios	+
<i>C. glabrata</i> (11)	+	-	-	-	Colonias rosa púrpura	-	-
<i>C. parapsilosis</i> (1)	+	-	-	-	Colonias rosa pálido	-	-
<i>C. dubliniensis</i> (2)	+	+	+	+	Colonias verde oscuro	Colonias con zona filamentosa y racimos de clamidoconidios	-
<i>C. lipolytica</i> (1)	+	-	-	-	Colonias púrpura	-	+

+ Crecimiento colonial

- Ausencia de crecimiento colonial

(\*) + Precipitado alrededor de la colonia

- Ausencia de precipitado alrededor de la colonia



Fig 4a. Formación de tubo germinativo en suero humano

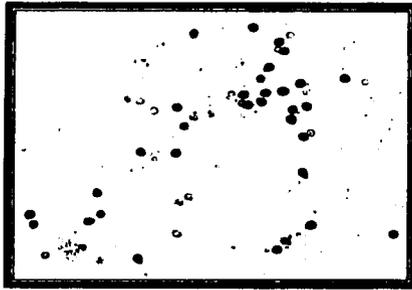
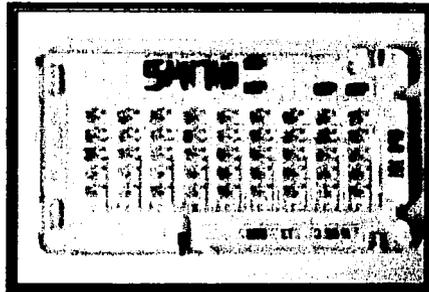


Fig 4b Producción de clamidoconidios en AHM 40X.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Fig 5. Placa de Vitek YCB utilizada para la prueba de asimilación de carbohidratos



Fig 6a. Coloración en CHROMagar Candida® verde claro características de *C. albicans*.

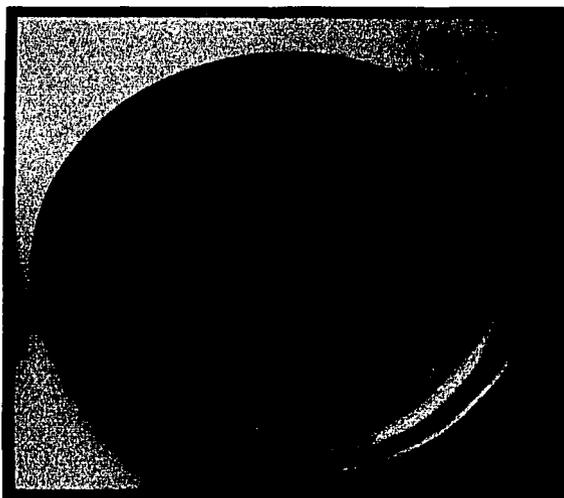


Fig 6b. Cultivo en CHROMagar Candida® de *C. dubliniensis*, colonias verde oscuro.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

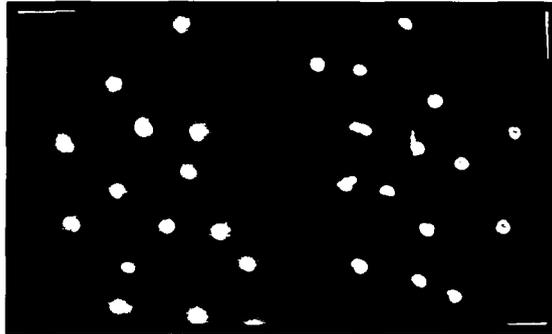


Fig 7a. Morfología microscópica de las colonias de *C. dubliniensis* (izquierda) y *Candida albicans* (derecha) en agar Staib.

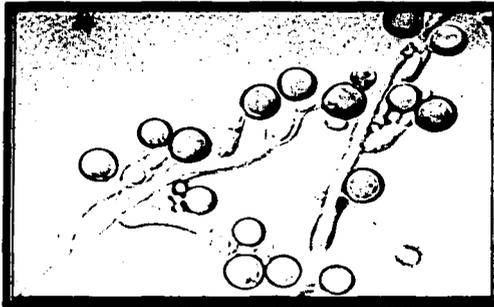


Fig 7b. Examen microscópico directo de la zona filamentosa con azul de algodón (100X). Observación de clamidoconidios en racimo de *C. dubliniensis*.

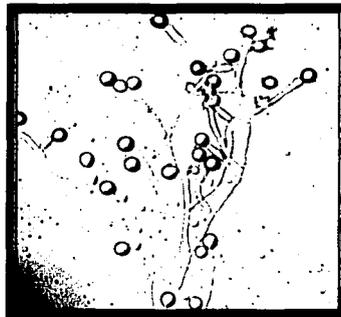


Fig 7c. Examen microscópico directo teñido con azul de algodón (40X) de las colonias de *C. albicans*. Observación de clamidoconidios en pares.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

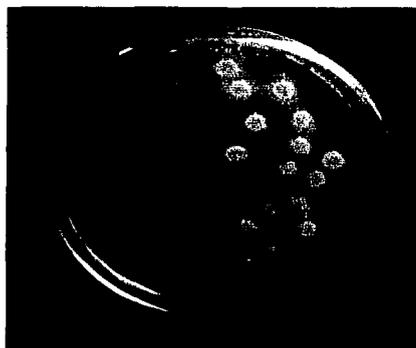


Fig 8. Actividad lipolítica de *Candida albicans* en agar Tween 80.



Fig 9a. Escaso crecimiento de *C. dubliniensis* a 45 °C en ADPEL.



Fig 9b. Abundantes colonias de *C. albicans* crecidas a 45 °C en ADPEL.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Tabla 8. Especies de *Candida* aisladas relacionadas con IVU en pacientes con D.M.**

Especie	Pacientes compensados	Pacientes descompensados
<i>Candida albicans</i>	1	5
<i>C. glabrata</i>	-	6
<i>Yarrowia lipolytica</i>	1	-

En el cuadro 9 se muestran los valores de la CMI determinada por el método E-Test de las tres drogas antifúngicas probadas, en los 23 aislamientos de *Candida* spp. se presentaron 4 diferentes patrones de lectura (Fig 10a, b, c, d). La lectura de E-Test de 22 de los 23 aislamientos estuvieron en el rango de sensibilidad a ketoconazol (CMI= 0.006 - 0.064 µg / ml); para itraconazol siete presentaron resistencia (CMI= >32 µg / ml) y a fluconazol solo en dos de los aislamientos (CMI= >64-256 µg / ml). Solamente un aislamiento de *C. glabrata* mostró resistencia a las tres drogas azólicas (Fig 11).

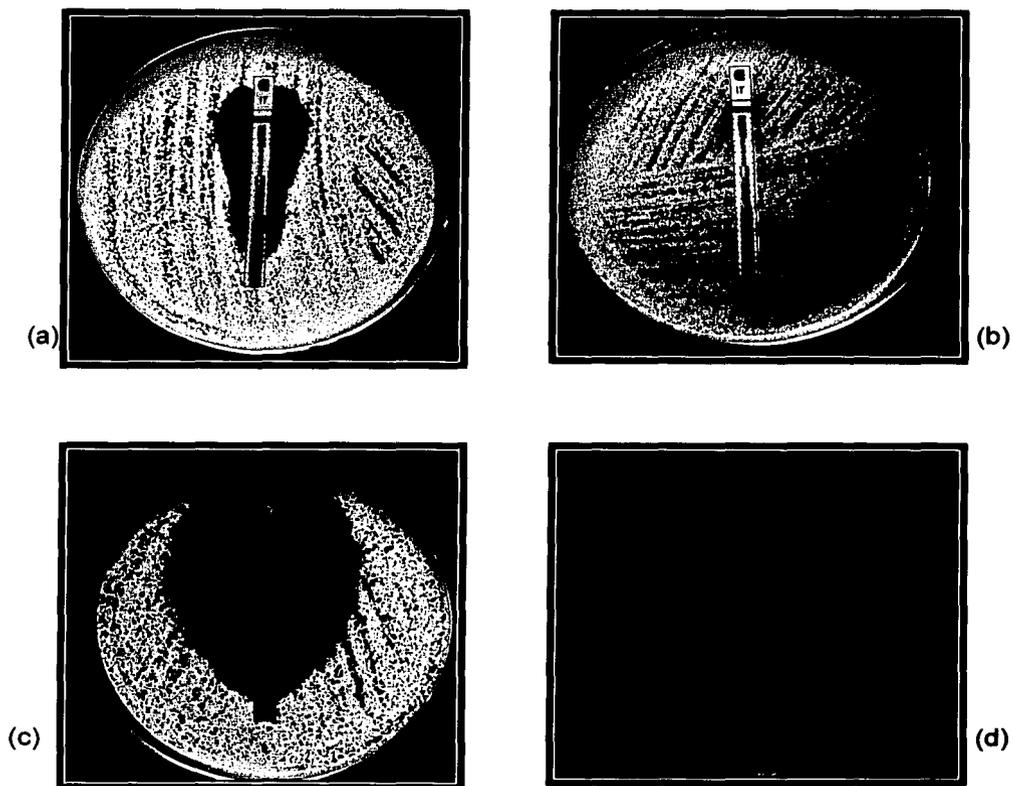


Fig 10. Patrones de lecturas E-Test

- a) Forma y punto adecuado de lectura
- b) Crecimiento homogéneo. Levaduras resistentes
- c) Microcolonias dentro de toda la zona de inhibición.
- d) Doble halo, por el crecimiento de microcolonias de la zona de inhibición

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

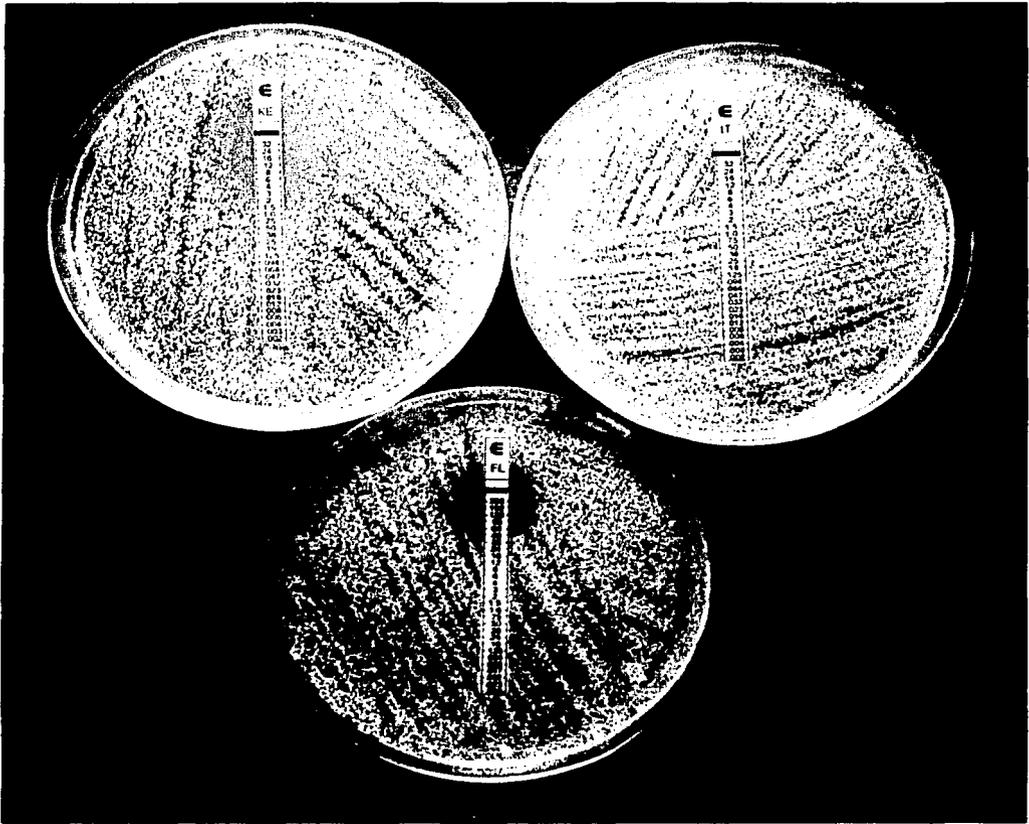


Fig 11. Cepa de *Candida glabrata* resistente a las tres drogas azólicas probadas

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Cuadro 9. Concentración mínima inhibitoria de los aislamientos de *Candida* obtenidos de la orina de pacientes diabéticos.**

CLAVE	KETOCONAZOL CMI (µg/ml)	ITRACONAZOL CMI (µg/ml)	FLUCONAZOL CMI (µg/ml)
C.g 1DM	0.19	1.0	6
C.g 2DM <sub>1</sub>	.094	.047	.75
C.a 2DM <sub>2</sub>	.006	.012	.50
C.d 4DM	.012	.016	.125
C.g 5DM	.012	1.5	2
C.a 14DM <sub>1</sub>	.004	1.5	1.5
C.g 14DM <sub>2</sub>	.012	.016	.125
C.a 19DM <sub>1</sub>	.004	.008	.19
C.I 19DM <sub>2</sub>	.125	2	12
C.a 21DM	.012	.023	.094
C.a 22DM	.006	.016	.125
C.g 24DM	.25	>32	8
C.a 26DM <sub>1</sub>	.012	.032	.125
C.g 26DM <sub>2</sub>	>32	>32	>256
C.a 27DM <sub>1</sub>	.006	.016	.19
C.p 27DM <sub>2</sub>	.094	.064	64
C.d 30DM	.003	.006	.064
C.g 32DM	.032	.38	1.0
C.a 35DM	.003	.008	.125
C.g 36DM	1.0	.006	.50
C.g 38DM	.047	.75	.38
C.g 39DM	.032	.023	.38
C.g 42DM	.125	3	1.5
<b>Cepas testigo</b>			
C.p ATCC 22079	.032	.032	1.0
C.k ATCC 6258	.38	.75	>32

**TESIS CON  
FALSA DE ORIGEN**

## 7. DISCUSIÓN

En las dos últimas décadas se ha reportado un incremento en las infecciones causadas por levaduras, principalmente por *Candida spp.*, este hallazgo esta asociado al incremento en lo factores de oportunidad y a la mayor sobrevida de los pacientes que presentan estos factores (22).

La DM es una enfermedad frecuente de la población mexicana. Los pacientes diabéticos presentan un mayor riesgo de desarrollar infecciones, principalmente de vías urinarias relacionadas hasta en el 70% con la aplicación de catéteres urinarios (2) (4) (18) (36). En el presente estudio a pesar de que se excluyeron los pacientes con este factor de riesgo se obtuvo un porcentaje significativo de aislamientos de levaduras (27%) asociados a infección de vías urinarias.

Todos los pacientes incluidos en este estudio recibieron tratamiento con hipoglucemiantes por vía bucal y se encontró una asociación importante entre DM e IVU a diferencia de la que reporta Beylot MD y cols (7) donde demostró que la infección de vías urinarias predominaba principalmente en pacientes diabéticos tratados con insulina.

Es importante tomar en cuenta que los hongos frecuentemente son causa de IVU, principalmente *C. albicans*, sin olvidar que esta levadura es parte de la biota normal del humano y su aislamiento cualitativo en los cultivos urinarios no necesariamente son evidencia de infección, no así los cuantitativos que puede ser interpretados como contaminación ( $< 10^3$  UFC /ml) ó colonización ( $10^3$  a  $10^4$  UFC / ml), dependiendo del número de UFC / ml.

TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN

De acuerdo con los reportes De Oliveira RDR y cols (12) y Chabasse D, (10) infección de vías urinarias es considerada cuando se obtuvieron cultivos de orina con un número mayor de  $10^4$  UFC/ml; también se han descrito la presencia de abundantes levaduras, pseudohifas o hifas en un frotis teñido con Gram (26); estos son los parámetros que deben ser utilizados para determinar IVU en los pacientes diabéticos (87) (88). Kauffman y cols (32) reportaron que el 25% de los diabéticos presentaron colonización urinaria por *Candida* spp. Febré y cols (16) encontraron que el 75% de los aislamientos de orina de los pacientes estudiados estuvieron relacionados con IVU. En el presente trabajo el 14.6% de los aislamientos de *Candida* correspondieron a colonización de vías urinarias mientras que el 27% a IVU. La mayoría de los aislamientos causantes de infección provienen de los pacientes que cursaban con DM descompensada (11 aislamientos) y solo dos aislamientos (mezcla de colonias) de un mismo paciente con DM compensada. Posiblemente la diferencia en los resultados obtenidos en este estudio y los reportados por otros autores radica en la diferencia en los factores de inmunosupresión adicionales a la DM como el uso de sonda o catéter urinario y tratamientos inmunosupresores.

De las especies de *Candida* obtenidas en este trabajo, *C. glabrata* (48%) y *C. albicans* (35%) fueron las más frecuentes aunque otras especies como *C. dubliniensis* (9%), *C. parasilosis* (4%) y *C. lipolitica* (4%) se aislaron en menor proporción. Los hallazgos obtenidos en el presente estudio confirmaron el aumento en el número de las especies diferentes a *C. albicans* como ya ha sido descrito en la literatura (18) (24) (31). De los trabajos antes mencionados *C. tropicalis* fue la especie que se aisló con mayor frecuencia; por el contrario en este

estudio no se encontró, posiblemente este relacionado con uno de los factores de riesgo que no se incluyeron en los pacientes estudiados que fue el uso de sonda o catéter urinario.

En la literatura internacional se ha descrito a *C. albicans* como principal agente patógeno causante de infección de vías urinarias no asociada al uso de catéter (19). Sin embargo en este estudio se aisló con la misma frecuencia a *C. albicans* y *C. glabrata*; probablemente porque la mayoría de los pacientes estudiados correspondieron a individuos del sexo femenino. En las mujeres este tipo de infecciones son más comunes debido a la anatomía del sistema genitourinario ya que *C. glabrata* se encuentra como comensal en la vagina y por arrastre puede llegar a colonizar la uretra y posteriormente causar IVU.

*Yarrowia lipolytica* solo fue obtenida en un aislamiento identificada por el método Vitek (Fig 5). Esta especie es la fase sexual de *C. lipolytica*, la cual ya ha sido descrita como causa de fungemia en dos casos (27) (83). Se realizaron pruebas para la obtención de ascas con ascosporas para verificar que realmente se trataba de la fase sexual, y solo se encontraron levaduras alargadas con pseudomicelio lo cual indicó que se trataba de la fase asexual.

Las pruebas utilizadas (crecimiento de SA, producción de clamidoconidios en AHM, formación de tubo germinativo y asimilación de carbohidratos), no fueron suficientes para la identificación de *C. dubliniensis* especie fenotípicamente semejante a *C. albicans*, descrita en 1995 por Sullivan y cols (71). Por lo tanto Staib P y cols (68) propusieron el uso de agar Staib para diferenciar las dos especies; Pinjon E y cols. (56) reportaron el crecimiento a 45 °C en APD y ADPEL que es otra prueba simple y accesible para cualquier laboratorio para la

diferenciación entre *C. albicans* y *C. dubliniensis*. Finalmente el estudio fenotípico en CHROMagar Candida® descrito por Odds (50) y Pfaller (54) que además de ser orientador para identificar a *C. dubliniensis* fue de gran ayuda para evidenciar mezclas coloniales de levaduras. En este estudio se identificaron dos aislamientos de *C. dubliniensis* con número de  $10^3$  y  $10^4$  UFC / ml, lo que indicó colonización de vías urinarias y en un momento dado debido a el factor de inmunosupresión esta especie puede ser potencialmente patógena.

Por otro lado Slifkin M en el 2000 (61) describió la prueba de opacidad en agar Tween 80 para la diferenciación entre las dos especies. Los resultados obtenidos en el presente estudio demostraron que esta prueba no es confiable, ya que da falsos negativos y no se correlacionó con los resultados descritos en la literatura.

La presencia cada vez mas frecuente de especies resistentes al tratamiento antifúngico, hace necesaria la realización rutinaria de pruebas de sensibilidad a todo aislamientos obtenidos de orina en los pacientes diabéticos, ya que pueden pasar de contaminantes o colonizantes a ser causa de infección (63).

En la actualidad, muchos de los hongos emergentes originan problemas de resistencia a los antifúngicos clásicos mientras que simultáneamente aparecen aislamientos clínicos resistentes pertenecientes a especies que eran sensibles, como en el caso de *C. albicans* frente al fluconazol (9) (38) y resistencia intrínseca al itraconazol en *C. glabrata* y *C. krusei* (76) (77). Con el advenimiento de una metodología estandarizada y las pruebas alternativas comercializadas, cada vez son más numerosas las publicaciones sobre sensibilidad a los antifúngicos, lo que

permite conocer mejor la situación actual de las resistencias a los fármacos, tanto de las levaduras como de los hongos filamentosos, por lo cual es importante la correcta identificación de estos organismos. Una de las ventajas prácticas que aportan los sistemas comercializados de estudio de sensibilidad a los antifúngicos, es la facilidad con la que pueden introducirse como pruebas de rutina diaria en el laboratorio. De los métodos comercializados, en el presente trabajo se valoró la sensibilidad antifúngica por el método E-test (1) es una prueba de difusión en agar que ha sido considerado por algunos investigadores como un método que promete dar resultados consistentes y con una elevada concordancia hasta en el 90% de los casos (11) (14). E-test proporciona datos cuantitativos de CMI, y constituye un método novedoso y original de eficacia demostrada en bacteriología (59). La incorporación de cepas de referencia asegura un adecuado control de calidad y deben ser incluidas siempre que se efectúen este tipo de estudios para validar los resultados. En este trabajo se encontraron los cuatro patrones de lectura descritos por otros autores (8) (11). Sin embargo el patrón más común fue el de "trailing zone" ya que ha sido observado en especial cuando se prueban compuestos azólicos.

En un estudio de sensibilidad antifúngica, por el método E-test realizado por Candido y cols. en 1999 (8) encontraron que de los 24 aislamientos de *C. albicans* estudiados el 21% presentó resistencia a ketoconazol, el 54% resistentes a itraconazol y 100% sensibles a fluconazol. Datos muy similares a los encontrados por Colombo y cols (11) a diferencia de estos datos, en el presente estudio solo un aislamiento de *C. glabrata* presentó resistencia a ketoconazol el resto de las

lecturas de CMI estuvieron dentro del rango de sensibilidad; el 30.4% presentaron resistencia a itraconazol y sólo el 8.6% a fluconazol.

La infección de vías urinarias causada por levaduras en pacientes con DM es un padecimiento que va en aumento aunque el significado es incierto, y generalmente subestimada por los médicos por ser considerada únicamente como contaminación, en algunos pacientes el resultado del urocultivo tiene un significado patológico claro, siendo una señal de alarma o síntoma inicial de una enfermedad subyacente que debe ser estudiada y tratada, para evitar la diseminación de la levadura a otros órganos. Por lo tanto los estudios de sensibilidad antifúngica *in vitro* deben ser de utilidad para orientar al médico clínico en el establecimiento del tratamiento y para valorar la resistencia de las cepas a los diferentes antifúngicos. Por lo que en estudios posteriores es importantes correlacionar la sensibilidad *in vitro* con el tratamiento antifúngico establecido por el médico al paciente diabético con IVU.

## 8. CONCLUSIONES

- ❖ De un total de 48 muestras procesadas se obtuvieron 23 aislamientos de levaduras (47.9%).
- ❖ Once (23 %) aislamientos causantes de infección se obtuvieron de pacientes con DM descompensada y dos (4%) de un paciente con DM compensada
- ❖ Trece (27 %) aislamientos de *Candida* spp: se consideraron asociados a infección de vías urinarias, seis de los cuales correspondieron a *C. glabrata* y seis a *C. albicans*.
- ❖ Cinco de los seis aislamientos de *C. glabrata* estuvieron asociados a infección de vías urinarias en pacientes con DM descompensada.
- ❖ Cinco de los 11 aislamientos de *C. glabrata* presentaron resistencia a Itraconazol y se obtuvieron de pacientes DM descompensada, solamente uno de estos aislamientos presentó resistencia a los tres azoles probados.

## BIBLIOGRAFÍA

1. AB Biodisk E-test technical guide No. 4: antifungal susceptibility testing of yeast. 1993 AB Biodisk, Solna Sweden.
2. Arteaga A, et. al. Manual de Diabetes Mellitus y Enfermedades Metabólicas. Edición 1999. Departamento de nutrición, Diabetes y Metabolismo. Facultad de Medicina. PUC.
3. Bacheller CD, Bernstein JM. Infecciones en vías urinarias. Clin Med Norteam 1997; 3: 705-714.
4. Baran J, Klauber E, Barczak, Riederer K, Khatib R. Trends in antifungal Susceptibility among *Candida* sp urinary isolates from 1994 and 1998. J Clin Microbiol 2000; 38:870-871.
5. Barnett JA. Payne RW. Yarrow D. Yeast-characteristics and identification. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Cambrige University Press; 1991.
6. Beighton D, Ludford R, Clark DT, Brailsford SR, Pankhurst CL, Tinsley GF, Fiske J, Lewis D, Daly B, Khalifa N, Marren V, Lynch E. Use of CHROMagar *Candida* medium for isolation of yeasts from dental samples. J Clin Microbiol 1995;33:3025-3027.
7. Beylot MD, Noel G. Ultrasonographic determination of residual urine in diabetic subjects relationship to neurophaty and urinary tract infection. Diabetes care 1982;5:501-505.
8. Candido RC, Torqueti MR, Franceschini SA, Ramos F, Manini EC. *In vitro* activity of antimycotic agents determined by E-Test method against vaginal *Candida* species. Mycopathologia 1999 ;144 :15-20.

9. Carrillo-Muñoz AJ, Abarca L, Quindós G. Métodos colorimétricos para la determinación de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos. Rev Iberoam Micol 2001;18:150-155.
10. Chabasse D. Intérêt de la numération des levaduras dans les urinaires. Revue de la littérature et résultats préliminaires d'une enquête multicentrique réalisée dans 15 centres hospitaliers universitaires. Ann Fran Anes Réanim 2001;20:400-406.
11. Colombo AL, Barchiesi F, McGough DA, Rinaldi MG. Comparison of E-test and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method for azole antifungal susceptibility testing. J Clin Microbiol 1995; 33: 535-540.
12. De Oliveira RD, Maffei CM, Martinez R. Infecção urinária hospitalar por levaduras do gênero *Candida*. Rev Assoc Med Brs 2001;47:231-235.
13. Espinel-Ingroff A. E-test for antifungal susceptibility testing of yeast. Diag Microbiol Infect Dis 1994;19: 217-220.
14. Espinel-Ingroff A, Pfaller M, Erwin ME, Jones RN. Interlaboratory evaluation of E-test method for testing antifungal susceptibilities of pathogenic yeast to five antifungal agents by using casitone agar and solidified RPMI 1640 medium with 2% glucose. J Clin Microbiol 1996;34:848-852.
15. Espinel-Ingroff A. Clinical utility of *in vitro* antifungal susceptibility testing. Rev Esp Quimioter 2000;13:161-166.
16. Febré N, Silva V, Mendeiro EAS, Way SB, Colombo AL, Fischman O. Microbiological characteristics of yeast isolated from urinary tract of

- intensive care units patients undergoing urinary catheterization. J Clin Microbiol 1999;37:1584-1586.
17. Gales AC, Pfaller MA, Houston AK, Joly S, Sullivan DJ, Coleman DC, Soll DR. Identification of *Candida dubliniensis* Based on temperature and utilization of Xylose and  $\alpha$ -methyl-D-glucoside as determined with the API 20C AUX and Vitek YCB systems. J Clin Microbiol 1999;37:3804-3808.
  18. Geerlings SE, Stolk RP, Camps MJ, Netten PM, Collet TJ. Risk factors for symptomatic urinary tract infection in woman with diabetes. Diabetes care 2000;23:1737-1741.
  19. Giusiano GE, Mangiaterra ML. Diferenciación e Identificación presuntiva rápida de levaduras con el medio CHROM-agar *Candida*. Rev Argent Microbiol 1998;30:100-103.
  20. Graybill JR, Montalvo E, Kirkpatrick WR, Luther MF, Sanjay GR, Patterns TF. Fluconazole versus *Candida albicans*: A complex relationship. Antimicrob Agents Chemother 1998;42:2938-2942.
  21. Guarro J, Gené J, Stchigel A. Developments in fungal taxonomy. Clin Microbiol Rev 1999;12:454-500
  22. Harris DA, Castro J, Sheppard DC, Carmeli Y, Samore MH. Risk factors for nosocomial candiduria due to *Candida glabrata* and *Candida albicans*. Clin Infect Dis 1999;29:926-928.
  23. Harrison's Principles of Internal Medicine 14th edition. Fauci A et.al. Editorial McGraw-Hill.

24. Hawksworth DL. Kingdom fungi: Fungal phylogeny and systematics. En Topley & Wilson's. Microbiology and microbial infections. Ninth edition. Ajello L, Hay RJ. Medical mycology Vol 4. Arnold 1998;43-65.
25. Hazen, K. Theirz GW, Howell SA. Chronic urinary infection due to *Candida utilis* J Clin Microbiol 1999;37: 824-827.
26. Hernández-Hernández F, Córdova-Martínez E, Manzano-Gayosso P, López-Álvarez R, Bazán-Mora E, López-Martínez R. Frecuencia de micosis en pacientes inmunosuprimidos de un hospital regional d la ciudad de México. Salud Pub Mex 2003;en prensa.
27. Hernández-Molina JM. García-Mateos P. Aislamiento de teleomorfos de muestras clínicas. Rev Iberoam Micol 1998;15: 235-242.
28. Hoffman HL, Pfaller MA. In vitro Antifungal susceptibility testing. Pharmacotherapy 2001;21:111-123.
29. Hooton TM, Stamm WE. The vaginal flora and urinary tract infections. En: Harry LT, Mobley and Warren JW. Urinary tract infections. Molecular pathogenesis and clinical management. Washington DC: ASM press, 1996; 67-94.
30. Islas S, Litshitz A. Diabetes mellitus. Interamericana McGraw-Hill México 1993.
31. Jabra- Rizk MA, Baqui AA, Kelley JI, Falkler WA, Merz WG, Meiller TF. Identification of *Candida dubliniensis* in a prospective study of patients in the Unites States. J Clin Microbiol 1998; 37:321-326.
32. Jacobs, L. G. 1996. Fungal urinary tract infections in the elderly: treatment guidelines, Drugs aging 8:89-96.

33. Kauffman CA, Vazquez JA, Sobel JD, Gallis HA, McKinsey DS, et al. Prospective multicenter surveillance study of funguria in hospitalized patients. *Clin Infect Dis* 2000;30:14-18.
34. Koehler AP, Chu KC, Houang ETS, Cheng AFB. Simple, reliable, and cost-effective yeast identification scheme for the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 1999; 37:422-426.
35. Korzeniowski OM. Urinary Tract Infection in the impaired host. *Med Clin North Am* 1991; 75: 391-404.
36. Kreger, BE, Craven DE, Carling PC, McCabe WR. Gram-negative bacteriemia. III. Reassessment of etiology, epidemiology and ecology in 612 patients. *Am. J. Med.* 1980; 68: 332-355.
37. Kwon-Chung KJ, Bennet JE. *Candidiasis. Medical Mycology.* Lea & Febiger. Philadelphia, London, 1992;280-336.
38. Maki DG, Tambyah P. Engineering out the risk of infection with urinary catheters. 2001;7:1-6
39. Manzano-Gayosso P, Hernández-Hernández F, Bazán-Mora E, Méndez-Tovar LJ, González-Monroy J, López-Martínez R. Identificación y tipificación de levaduras aisladas de pacientes de un hospital de la ciudad de México. *Rev Argen Microbiol* 2000;32:1-6.
40. Martin MV. The use of fluconazole and itraconazole in the treatment of *Candida albicans* infections: a review. *J Antimicrobiol Chemother* 1999;44:429-437.

41. Martínez-Suárez JV, Rodríguez-Tudela JL. La resistencia a los antifúngicos en los hongos patógenos oportunistas. Imidazoles y triazoles. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1996; 14:490-500.
42. Mazuelos ME. Métodos de estudio de sensibilidad in vitro en levaduras. *Rev Esp Quim* 2000;13:99-103.
43. McGinnis MR. *Laboratory Handbook of Medical Mycology. Yeast identification.* Academic Press, New York, 1980:pp337-410.
44. Mosaid AA, Sullivan D, Salfin IF, Stanley D, Coleman D. Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on Staib agar and caffeic acid-ferric citrate agar. *J Clin Microbiol* 2001;39:323-327.
45. National Comitté for Clinical Laboratory Standards. Referent method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. *Approved Standard M27-A*, Villanova, Pa 1997.
46. Ng KP, Saw TL, Na SL, Soo-Hoo TS. Systemic *Candida* infection in University Hospital 1997-1999: the distribution of *Candida* biotypes and antifungal susceptibility patterns. *Mycophatologia* 2000;149.141-146.
47. Nicolle LE. Urinary tract pathogens in complicated infection and in elderly individuals. *J Infect Dis* 2001;183 (Suppl 1):55-58.
48. Nyuger MH, Yu CY. Influence of incubation time, inoculum size, and glucose concentrations on spectrophotometric and point determinations for amphotericin B, fluconazole and itraconazole. *J Clin Microbiol* 1999;37: 141-145.
49. Odds FC. *Candida and Candidosis*, 2<sup>nd</sup> ed. London; Bailliere Tindall;1998

50. Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. J Clin Microbiol 1994; 32: 1923-1929.
51. Odds FC. Resistance of yeast to azole-derivate antifungals. J Antimicrob Chemother. 1993;31:463-471.
52. Pauvilai G, et.al. World Health Organization. Diagnostic criteria for diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance: 1997 criteria by the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus (ADA), 1998 WHO consultation criteria, and 1985 WHO criteria. Diabetes Res Clin Pract, 1999;44:21-26.
53. Pfaller MA, Diekema DJ. Role of sentinel surveillance of candidemia: Trends in species distribution and antifungal susceptibility. J Clin Microbiol 2002;40:3551-3557.
54. Pfaller MA, Houston A, Coffman S. Application of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. J Clin Microbiol 1996;34:58-61.
55. Pincus DH, Coleman DC, Pruitt WR, Padhye A, Salkin F, Geimer M, Bassel A, Sullivan DJ, Clarke M, Hearn V. Rapid identification of *Candida dubliniensis* with commercial test identification systems. J Clin Microbiol 1999;37:3533-3539.
56. Pinjon E, Sullivan D, Salkin I, Shanley D, Coleman D. Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. J Clin Microbiol 1998;36:2093-2095.

57. Rinaldi MG. Biology and pathogenicity of *Candida* species. En Bodey GP. *Candidiasis: Pathogenesis, Diagnosis, and treatment*. Raven Press, New York, 1993:pp1-20.
58. Rippon JW. *Candidiasis y levaduras patogenas*. Tratado de Micología Médica. México: McGraw-Hill, 1990: 574-628.
59. Sanchez MJ. E-test, an antimicrobial susceptibility testing method with broad clinical and epidemiological application *Antimicrob Mewslett* 1993;81-87.
60. Salkin IF, Pruitt WR, Padhye AA, Sullivan D, Coleman D, Pincus DH. Distinctive carbohydrate assimilation profiles used to identify the first clinical isolates of *Candida dubliniensis* recovered from the United States. *J Clin Microbiol* 1998;36:1467.
61. Slifkin M. Tween 80 Opacity test responses of various *Candida* Species. *J Clin Microbiol* 2000;38:4626-4628.
62. Sobel JD, Kauffman CA, McKinsey D, Zervor M, Vazquez JA, et.al. *Candiduria: a randomizol, double-blind study of treatment with fluconazole and placebo*. *Clin Infect Dis* 2000;30:19-24
63. Sobel J. Pathogenesis of urinary tract infections. *Infect Dis Clin North Am* 1987; 1: 751.
64. Stamey TA, Wehner N, Milhara G, Condy M. The immunologic basis of recurrent bacteriuria: role of the cervicovaginal antibody in enterobacterial colonization of the introital mucosa. *Medicine* 1978; 57: 47-56.

65. Sobel JD, Kaye D. Urinary tract infections. En: Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE, eds. Principles and practice of infectious disease. 2nd ed. New York: John Willey and Sons, 1990: 582-610.
66. Sodeman TM. A practical strategy for diagnosis urinary tract infections. Clinics in Laboratory Medicine 1995; 15 (2): 235-250
67. Staib F, Arasteh K. Chlamydospore formation on Staib agar observations made before *Candida dubliniensis* was described. Mycoses 2000;44:23-27.
68. Staib P. Chlamydospore formation on staib agar as a species-specific characteristic of *Candida dubliniensis*. Mycoses 1999;42:521-524
69. Stamm WE, Norby SR. Urinary tract infections: disease panorama and challenges. J Inect Dis 2001;183 (Suppl 1):51-54.
70. Stapleton A. urinary tract infections in patient with diabetes. Am J Med 2002;113(Supp 1):80-84.
71. Sullivan DJ, Westernpeng tj, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC. *Candida dubliniensis* sp. nov: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. Microbiology 1995;141:1507-1521.
72. Sullivan DJ, Coleman D. *Candida dubliniensis*: Characteristics and identification. J Clin Microbiol 1998;36:329-334.
73. Sullivan DJ, Moran G, Donnelly M, et.al. *Candida dubliniensis*: An update. Rev Iberoam Mycol 1999;46:72-76.
74. Sultana SR, McNeill SA, Phillips G, Byrne DJ. Candidal urinary tract infection as a cause of pneumaturia. Jr Coll Surh Edinb 1998;43:198-199.

75. Tinoco JC, Hernández-Ruiz E, Salvador- Moysen J, Rivera-Morales I. Infecciones de vías urinarias en un hospital de segundo nivel. *Salud Pública Mex* 1994;36:17-21.
76. Torres-Rodríguez MJ, Morera Y, López O. *Candida glabrata*: Un patógeno emergente. *Boletín de Control de Calidad SEIMC* 2000;12:39-43.
77. Torres-Rodríguez MJ, Madrenys N, Jiménez T, Saballs P. Concentraciones mínimas inhibitorias de levaduras a cinco antifúngicos utilizando un micrométodo de dilución estandarizado y el E-Test. *Rev Iberoam Micol* 1997; 14:115-118.
78. Vanden H. Mechanisms of antifungal resistance. *Rev Iberoam Micol* 1997;14:44-49.
79. Viudes A, Canton E, Pemán J, Lopez-Ribot JL, Gobernado M: Correlación entre la susceptibilidad *in vitro* a drogas antifúngicas y la evolución clínica de los pacientes con candidosis y criptococosis. *Rev Esp Quimioter* 2002;15:32-42.
80. Wainstein MA, Graham RC, Resnick MI. Predisposing factors of systemic fungal infections of the genitourinary tract. *J Urol* 1995;154:160-163
81. Warnock DW, Burke J, Cope NJ, Johnson EM, Von Fraunhofer NA, Williams EW. Fluconazole resistance in *Candida glabrata*. *Lancet* 1988;2:1310.
82. Warren JW. Clinical Presentations and Epidemiology of Urinary Tract Infections. En: Harry LT, Mobley and Warren JW, eds. *Urinary Tract*

- Infections. Molecular Pathogenesis and Clinical Management. Washington, DC: ASM Press, 1996: 3-29.
83. Wherspannn P, Fullbrandt U. *Yarrowia lipolytica* (Wickerman et. al.) van der Walt and von Arx isolated from a blood culture. Mykosen 1985;28:217-222.
84. White DJ, Johnson EM; Warnock DW. Management of persistent vulvovaginal candidosis due to azole resistant *Candida glabrata*. Genitourin Med 1993;69:112-114.
85. Wickerham LJ, Burton KA. Carbohydrate assimilation test for the classification of yeasts. J. Bacteriol 1948;56:363-371.
86. Wingard JR. Infections due resistant *Candida* species in patients with cancer who are receiveing chemotherapy. Clin Infect Dis 1994;9:49-53.
87. Wise GJ, Silver DA. "Fungal Infections of the Genitourinary System. J Urol 1993; 149:1337-1388.
88. Wise GJ, Talluri GS, Marella VK. Fungal Infections of the Genitourinary System: Manifestations, Diagnosis and Treatment" Infections in Urology 1999; 26:701-718.
89. Witthuhn FD, Toubas I, Beguinot D, Aubert, Rouger C Remy G, Pinon JM. Evaluation of the Fungitest kit by using strains from human immunodeficiency virus-infected patients: study of azole drug susceptibility. J Clinic Microbiol. 1999; 37:865-866.



## 10. APÉNDICE A

### **Agar Dextrosa Sabouraud (BD Bioxon®)**

Agar	15.0g
Dextrosa	40.0 g
Peptona de Carne	55.0 g
Peptona de Caseína	5.0 g

PH final  $5.6 \pm 0.2$

Suspender 65 g del polvo en un litro de agua purificada. Mezclar perfectamente, calentar con agitación frecuente y llevar a ebullición durante un minuto hasta disolución. Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

### **Agar para la selección de hongos (agar micobiótico, AD Bioxon®)**

Fórmula para 1000 ml de agua destilada

Peptona de soya	10.0 g
Dextrosa	10.0 g
Agar	15.5 g
Cicloheximida	0.40 g
Cloranfenicol	0.05 g

Disolver 36 g de polvo en un litro de agua destilada. Mezclar bien. Cuando la suspensión sea uniforme, dejar en reposo de 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente y llevar a ebullición. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

## **Agar Harina de Maiz para la producción de clamidoconidios**

### **Corn Meal Agar (BBL®)**

Fórmula para 1000 ml de agua destilada

Infusión de harina de Maíz, a partir de sólidos	2.0 g
Tween 80	10 ml
Agar	15.0 g

Suspender 17 gramos del polvo en un litro de agua purificada. Agregar Tween 80 al 1%. Mezclar bien. Calentar agitando frecuentemente y llevar a ebullición durante 1 minuto hasta disolver completamente el polvo.

Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

### **Medio Staib para.**

Fórmula para 1000 ml de agua destilada

<i>Guizotia abyssinica</i>	50 g
Dextrosa	1 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
Creatinina	1 g
Agar	15 g

Pulverizar la semilla y ebullicir durante 25 a 30 minutos. Filtrar agregar el resto de los componentes de la fórmula y llevar a ebullición por un minuto; esterilizar a 121°C por 15 minutos.

### **Agar Tween 80**

Tween 80	5 ml
Bactopeptona	10 g
NaCl	5 g
CaCl <sub>2</sub>	0.1 g
Agar bacteriológico	15 g
Agua destilada	1000 ml

Mezclar todos los componentes excepto el Tween 80. Se deja ebulir durante 1 minuto. Posteriormente se esteriliza a 121 °C durante 15 minutos. Se deja enfriar y se agrega el Tween 80 previamente esterilizado.

### **CHROMagar Candida ®**

Agar	15 gr
Peptona	10.2 g
Mezcla cromógena	22 G
Cloranfenicol	0.5 g
Agua destilada	1000 ml

Mezclar 47 g en un litro de agua y se esteriliza a 95°C durante 2 minutos.

### **Agar ADPEL**

Fórmula para preparar 1000 ml

Extracto de levadura	10 g
Bacto-peptona	20 g
Dextrosa	20 g
Agar	15 g

Mezclar todos los componentes de la fórmula se deja ebulir durante 1 minuto y se esteriliza a 121°C durante 15 minutos.

### **Agar Dextrosa Papa (Acumedia®)**

Infusión Papa ( deshidratada)	4.0 g
Dextrosa	20.0 g
Agar	15 g

Suspender 39 g del polvo en un litro de agua destilada. Mezclar bien. Calentar agitando frecuentemente y ebulir durante 1 minuto para disolver el polvo completamente. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

### **Agar RPMI 1640® para sensibilidad antifúngica.**

Fórmula para preparar 1000 ml

RPMI	46.19 g
Bacto-agar	18 g
Glucosa	20 g
MOPS	34.54 g

- a) Disolver el polvo RPMI en 250 ml de agua desionizada.
- b) Disolver el polvo del MOPS en 250 ml de agua desionizada.
- c) Mezclar (a) y (b) y esterilizar por filtración. Con unidades filtro estériles de 0.2  $\mu\text{m}$  de diámetro del poro.

Disolver la glucosa y el bactoagar en 500 ml de agua desionizada. Esterilizar durante 15 minutos a 121 °C, se deja enfriar a 50 °C.

Calentar ligeramente la mezcla (c) a 45°C.

Mezclar el agar con la mezcla (c) medir pH 7.

### **Medio para la producción de ascosporas**

Formula para preparar 1000 ml

Jugo V8	500 ml
Agar	20 g
Extracto de malta	5 g
Acetato de sodio (pH 6-5 a 7.0)	0.5 g
Agua destilada	500 ml

Disolver los componentes de la fórmula excepto el jugo V8 que se esteriliza por filtración. Calentar y esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Dejar enfriar y mezclar con el filtrado del jugo V8.

### Tinción de Gram

#### ♦ Cristal violeta

a) Cristal violeta	2.0 g
Alcohol etílico 95%	20 ml
b) Oxalato de amonio	.08 g
Agua destilada	80 ml

Mezclar soluciones a y b, dejar reposar 24 h y filtrar.

#### ♦ Lugol

Yodo	1.0 g
Yoduro de potasio	2.0 g
Agua destilada	300 ml

Triturar el yodo y el yoduro de potasio en un mortero, añadir unos mililitros de agua y triturara vigorosamente. Ir añadiendo poco a poco el agua restante.

Conservar en un frasco ámbar.

#### ♦ Alcohol acetona

Alcohol 95%	50 ml
Acetona	50 ml

• Solución madre de safranina

Safranina O	2.5 g
Alcohol 95%	100 ml

• Solución de trabajo

Solución madre	10 ml
Agua destilada	90 ml

Procedimiento

Preparar un frotis y fijarlo al calor

Cubrir con cristal violeta 1 minuto

Lavar con agua corriente.

Cubrir con lugol 1 minuto

Lavar con agua corriente

Decolorar con alcohol-acetona

Lavar con agua corriente

Cubrir con safranina 10 segundos

Lavar con agua corriente, escurrir y dejar secar

**Coloración con Azul de Algodón**

A) Solución de lactofenol:

Fenol líquido*	20 ml
Ácido láctico	20 ml
Glicerol	40 ml
Agua destilada	20 ml

B) Azul de anilina

0.05 g

Mezclar A y B filtrar. \*Si el fenol se encuentra en cristales, fundirlo en baño María; tomar los 20 ml necesarios y agregar los reactivos restantes.

### **Tinción de ascosporas con Verde de Malaquita**

En un examen directo con agua se pueden observar las ascas con sus cuatro ascosporas dentro en la disposición de tétradas, al realizar la tinción se puede perder la visión de las cuatro esporas pero se gana la tinción de las paredes.

- Verde de Malaquita.

Verde de malaquita

7.6 g

Agua destilada

100 ml

Disolver completamente, filtrar y guardar en un frasco ambár.

- Safranina

Safranina O

0.25 g

Agua destilada

100 ml

Disolver completamente, filtrar y guardar en frasco ambár.

Procedimiento:

Hacer un frotis del cultivo

Fijar al calor (de preferencia con mechero de alcohol).

Cubrir con verde de malaquita y calentar hasta emisión de vapores por 2-4 minutos.

Lavar con agua corriente

Cubrir con safranina por 30 segundos

Dejar secar

**Observar al microscópio**

**Interpretación de resultados:**

**Las ascosporas se tiñen de color verde y el resto de las estructuras de color rojo.**