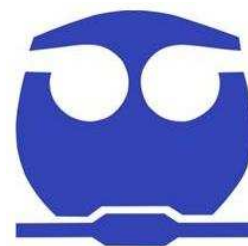


**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



FACULTAD DE QUÍMICA

**“EVALUACION DEL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR (E-
TEST) PARA EL ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD
ANTIFÚNGICA EN AISLADOS CLÍNICOS DE *Chrysosporium*
spp.”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

KARINA PATRICIA LAGAR HERNÁNDEZ

MÉXICO, D. F. CIUDAD UNIVERSITARIA 2008.



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.



Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Micología Médica del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de medicina de la UNAM, Jefe de Laboratorio Dr. Rubén López Martínez.

Instituciones que colaboraron:

Unidad de Investigación Médica en Dermatología Micología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS. Jefe Dr. Luis Javier Méndez Tovar.

Hospital General Dr. Darío Fernández Fierro ISSSTE.



Dedico este trabajo a.....

Mis padres, Donato y Daria, quienes
me brindaron su amor y apoyo
de manera incondicional.

Mis hermanos Haydeé, Elsa, Lulú y Ramón
por estar siempre conmigo y brindarme
su apoyo.

Daniel, mi esposo, amigo y confidente,
quien siempre supo darme las palabras
correctas para seguir adelante y día a día
me brinda su apoyo y su amor.

Sofía, el tesoro más preciado de mi vida,
y la personita que me da la inspiración
para ser cada día mejor.

Las personas que hicieron posible
que este trabajo se llevara a cabo.



Agradezco a.....

Dios por todas las bendiciones
que me ha dado.

La Universidad Nacional Autónoma de México
por la formación profesional
de excelente nivel que me brindo.

La Doctora Patricia Manzano Gayosso
por el apoyo, paciencia, conocimiento y
cariño que me brindo.

A la bióloga Blanca Millán Chiu
por la paciencia e instrucción que me brindo.



INDICE

INTRODUCCIÓN.....	3
Planteamiento de problema.....	3
Hipótesis.....	4
Objetivos.....	5
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES.....	6
1.1 Antecedentes históricos de la sensibilidad antifúngica.....	7
1.2 Método de sensibilidad.....	8
1.2.1 Dilución en caldo.....	8
1.2.2 Difusión en agar.....	9
1.3 Mecanismos de acción de los antifúngicos.....	11
1.4 Mecanismos de resistencia de los antifungicos	14
1.4.1 Mecanismos de resistencia a AMB.....	16
1.4.2 Mecanismos de resistencia a los azoles.....	17
1.4.3 Mecanismos de resistencia a las alilaminas.....	19
1.5 Frecuencia de resistencia	19
1.6 <i>Chrysosporium</i> spp: Agente etiológico de dermatmicosis.....	20
1.7 Dermatomicosis por <i>Chrysosporium</i> spp.....	22
CAPITULO 2. MATERIAL Y METODOS.....	24
2.1 Aislados de <i>Chrysosporium</i> spp.....	25
2.2 Estudio micológico.....	25
2.2.1 Examen microscópico directo.....	25
2.2.2 Cultivo del espécimen.....	26
2.2.3 Morfología Macroscópica.....	26
2.2.4 Morfología microscópica.....	26
2.2.5 Identificación de los aislamientos.....	26



2.3 Estudio de la sensibilidad antifúngica.....	29
2.3.1 E-Test.....	29
2.3.2 Método de microdilución en caldo.....	31
2.3.3 Cepas de control de calidad.....	34
CAPITULO 3. RESULTADOS.....	35
Tablas, gráficas y figuras.....	38
CAPITULO 4. DISCUSION Y RESULTADOS.....	43
Discusión	44
Conclusiones.....	47
BIBLIOGRAFÍA	48
ANEXOS.....	52
Anexo I. Medios de cultivo.....	53
Anexo II. Técnicas.....	59
Anexo III. Abreviaturas.....	61



INTRODUCCION

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La creciente incidencia y diversidad de las infecciones fúngicas oportunistas en pacientes inmunodeprimidos, ha favorecido el mejor conocimiento de las micosis, y el desarrollo de nuevos antifúngicos que ofrezcan alternativas al tratamiento clásico de estas infecciones. Al mismo tiempo, en la última década ha habido un aumento en el estudio de las pruebas de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos por la aparición de cepas resistentes; inicialmente estandarizadas en levaduras y posteriormente en hongos filamentosos. En las micosis invasivas, es relevante saber si la cepa es resistente al antifúngico y así condicionar un fracaso terapéutico. Las pruebas de sensibilidad se deben realizar en micosis que no responden al tratamiento, o cuando se quiere conocer la prevalencia de cepas resistentes en la institución o en las micosis producidas por patógenos emergentes.

En algunos hospitales de la Ciudad de México se ha observado un incremento en la mala respuesta terapéutica antifúngica que presentan los pacientes con dermatofitosis de las uñas y la piel lampiña; además con recidivas frecuentes. Después del estudio de sensibilidad antifúngica se demostró que el 19.4 % de las dermatofitos causales presentaron resistencia a los azoles. El interés del estudio de hongos filamentosos del género *Chrysosporium* surgió por los aislamientos obtenidos de pacientes con micosis superficiales diagnosticadas clínicamente como dermatofitosis y cuyos aislamientos obtenidos fueron identificados como *Chrysosporium*.

Por lo tanto es importante diferenciar este agente de los dermatofitos y de otros hongos filamentosos queratinofilicos de importancia médica, así como conocer su patrón de sensibilidad antifúngica. También debe tomarse en cuenta que algunas veces es causante de micosis severas en pacientes inmunosuprimidos. Actualmente en la literatura hay pocos trabajos que evalúen la sensibilidad antifúngica en este



hongo y aun no se ha establecido cual es la frecuencia de resistencia a los diferentes antifúngicos.

HIPÓTESIS

- Las especies de *Chrysosporium* spp. presentarán resistencia a las drogas azólicas ketoconazol (KTZ), itraconazol (ITZ), voriconazol (VRZ), fluconazol (FLZ) y mostrarán mayor sensibilidad a terbinafina (TRB).



OBJETIVOS

- Identificar las especies de los aislados de *Chrysosporium* obtenidos de pacientes con dermatomicosis causados por este hongo.
- Determinar el patrón de sensibilidad en los aislados de *Chrysosporium spp.*
- Determinar la frecuencia de resistencia a KTZ, ITZ, VRZ, FLZ y TRB.
- Establecer la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de las diferentes drogas antifúngicas.



Capítulo 1. ANTECEDENTES



1.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LA SENSIBILIDAD ANTIFÚNGICA.

La sensibilidad antifúngica se puede definir como el estudio del efecto del fármaco sobre una gran variedad de especies de hongos tanto levaduriformes como filamentosos.

a) Métodos de referencia para levaduras.

En 1982, el National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS), actualmente denominado Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) creó un subcomité con la finalidad de establecer protocolos de referencia para determinar la sensibilidad antifúngica *in vitro* a las levaduras. Sin embargo, el primer documento (M27-P) se publicó en 1992; en este manuscrito se propuso el método de dilución en caldo para levaduras del género *Candida* y *Cryptococcus neoformans*, el cual se fue perfeccionando para dar lugar al documento M27-T en 1995 y al M27-A en 1997. Este último protocolo hace referencia tanto a métodos de microdilución como de macrodilución en medio líquido usando RPMI (Roswell Park Memorial Institute) como medio de cultivo; se definieron los puntos de corte para fluconazol, itraconazol y 5-fluorocitosina. Sin embargo, debido a que este método presentaba algunas dificultades en la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI, concentración mas baja del antifúngico donde se observa un 80% de inhibición del crecimiento del hongo en estudio) de los azoles, se elaboró el nuevo documento M27-A2 que fue publicado en el 2002. Este documento recomienda una adición de glucosa al 2% al medio y una determinación de las CMI a las 24 horas para una mejor interpretación de la lectura. Este método también presenta importantes limitaciones debido a que no incluyeron a la fase levaduriforme de los hongos dimórficos como *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum* o *Sporothrix schenckii* y no se describieron los puntos de corte para equinocandinas o nuevos triazoles. El CLSI, en su interés por desarrollar un método menos laborioso y más próximo al estandarizado con bacterias, publicó en 2003 el documento M44-P. Este documento propone el método de difusión en agar para determinar la sensibilidad de *Candida spp* frente a fluconazol y voriconazol. El método es más sencillo y barato de realizar y la lectura es más fácil de interpretar que los métodos de macro y



microdilución en caldo. El método de difusión en agar muestra una excelente correlación con el método de microdilución [3] [6] [12] [27].

b) Métodos de referencia para hongos filamentosos

En 1998, se publicó el primer documento (M38-P) de referencia para determinar la sensibilidad *in vitro* de los hongos filamentosos frente a los antifúngicos. Sin embargo, los primeros estudios carecen de correlación con los resultados *in vivo*. Debido a ello, se llevaron a cabo nuevos trabajos para intentar establecer las condiciones más apropiadas para obtener una buena concordancia. Los resultados derivados de esos estudios se reúnen en el documento M38-A. Este documento recomienda los métodos de microdilución y macrodilución en caldo para *Rhizopus spp.*, *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Sporothrix schenckii* y *Pseudallescheria boydii*. Sin embargo, los métodos de referencia para hongos filamentosos presentan limitaciones, ya que no incluyen a todos los hongos filamentosos de importancia clínica, como los dermatofitos o los hongos dimórficos; además, este documento no establece los puntos de corte para antifúngicos. Sin embargo consideran que para los azoles ITZ, VRZ y KTZ una CMI ≥ 8 $\mu\text{g/mL}$ son resistentes frente al antifúngico y en el caso de FLZ la CMI ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$ [3] [12].

1.2 MÉTODOS DE SENSIBILIDAD

1.2.1 Dilución en Caldo

a) Macrodilución en caldo

El método de macrodilución se utiliza muy poco, es de utilidad cuando se requiere un resultado rápido y no se dispone de medios comerciales o placas preparadas. También es útil en los aislados de *Candida albicans* en las que se duda del resultado de la CMI por el método de microdilución, debido al crecimiento en las concentraciones superiores (efecto "trailing"). Uno de los principales inconvenientes de utilizar este método es el empleo de una gran cantidad de material, lo que eleva el



costo de la prueba y por lo tanto no la hace factible, además de ser una técnica complicada de realizar [13].

b) Microdilución en caldo

Este método de referencia M27-A2, para levaduras, y M38-P, para hongos filamentosos, propuestos por el CLSI [3], consisten en cuantificar el 80% de inhibición en el crecimiento producida por el antifúngico, comparada con el crecimiento de la levadura u hongo filamentosos en el mismo medio pero sin antifúngico (control). El medio de cultivo, pH, amortiguador, inóculo, tiempo y temperatura de incubación, deben ajustarse estrictamente a las recomendaciones establecidas en los documentos del CLSI para evitar variación en los resultados.

El medio de cultivo que ha dado mejor concordancia, tanto intra como interlaboratorio, es el medio sintético RPMI 1640 con glutamina y sin bicarbonato sódico, amortiguado con ácido morfolino propano sulfónico (MOPS) 0.164 M y ajustado a pH 7 ± 0.1 . [3] [12]

1.2.2 Difusión en Agar

Existe una diversidad de métodos comerciales alternativos basados en la difusión y dilución en agar, con los que se puede estudiar la sensibilidad a antifúngicos determinando cualitativamente si el hongo es sensible, resistente o moderadamente sensible; o bien se puede conocer cuantitativamente para determinar las CMI. Los métodos de difusión en agar son comunes en un laboratorio clínico de microbiología, económicos y fáciles de realizar como método de rutina.

a) Neo Sensitab

El método Neo Sensitabs es una técnica de difusión en agar, en la que el antifúngico se encuentra en forma de tabletas con concentraciones fijas. Es una técnica sencilla y rápida que consiste en sembrar el inóculo estandarizado sobre un medio de cultivo sólido y posteriormente se colocan las tabletas con antifúngicos.



La difusión radial del antifúngico en el agar forma halos de inhibición concéntrica, como consecuencia del gradiente de concentración.

El método de difusión en agar utilizando discos o tabletas impregnadas de antibióticos está muy difundido y aceptado por su fácil realización, especialmente por laboratorios bacteriológicos donde se utiliza como un método de rutina. En micología este método no ha conseguido su aceptación totalmente debido a que los antifúngicos polienos son inestables en los discos y que es difícil conseguir una buena solubilidad de los azoles. Además de ser necesario disponer de otros datos como la relación entre los valores cualitativos proporcionados por esta técnica como los cuantitativos de las pruebas de referencia, los resultados obtenidos sugieren que puede ser empleado en el estudio de sensibilidad *in vitro* en hongos filamentosos dematiáceos, incluyendo los de crecimiento lento [25].

b) E-test

Es un método cuantitativo que requiere un medio sólido que se basa en la difusión en el agar de varias concentraciones de antifúngicos incorporados a una tira de plástico inerte que se divide en dos partes, la sigla superior ϵ que identifica al antifúngico y la parte inferior que está calibrada con las concentraciones de la CMI en $\mu\text{g/mL}$ del fármaco como se muestra en la figura 1.1. La tira da lugar a la formación de una elipse de inhibición de crecimiento. La CMI es el punto de intersección de la elipse de inhibición del crecimiento con la tira de E-test. Es una técnica fácil de realizar, con un alto grado de reproducibilidad y una buena concordancia con el método de microdilución en caldo del CLSI. Estudios comparativos entre el E-test y el método de referencia han mostrado una excelente correlación en el caso de levaduras del género *Candida* y *Cryptococcus* [19]. Wanger, y cols [27] realizaron estudios para determinar la resistencia a AMB en aislamientos de *Candida*, comparando los métodos de E-test y microdilución en caldo. La concordancia en la CMI fue del 98% para *C. albicans*, 90% para *C. parapsilosis*, 85% para *C. tropicalis* y el 100% para *C. glabrata*. [27]



En el caso de los hongos filamentosos, existen pocos estudios comparativos con el método de referencia, pero los pocos datos de los que disponemos muestran resultados muy alentadores.

Una de las desventajas de este método es que en ocasiones se presenta dificultad para definir el borde preciso de la zona de inhibición, principalmente con fluconazol.

Este método no solo permite establecer si una cepa es sensible o resistente, sino que también nos permite conocer la CMI, adicionado a esto la manipulación fácil y la interpretación de resultados rápida, características que han hecho de esta técnica una de las más difundidas para el estudio la sensibilidad a los antifúngicos [1].

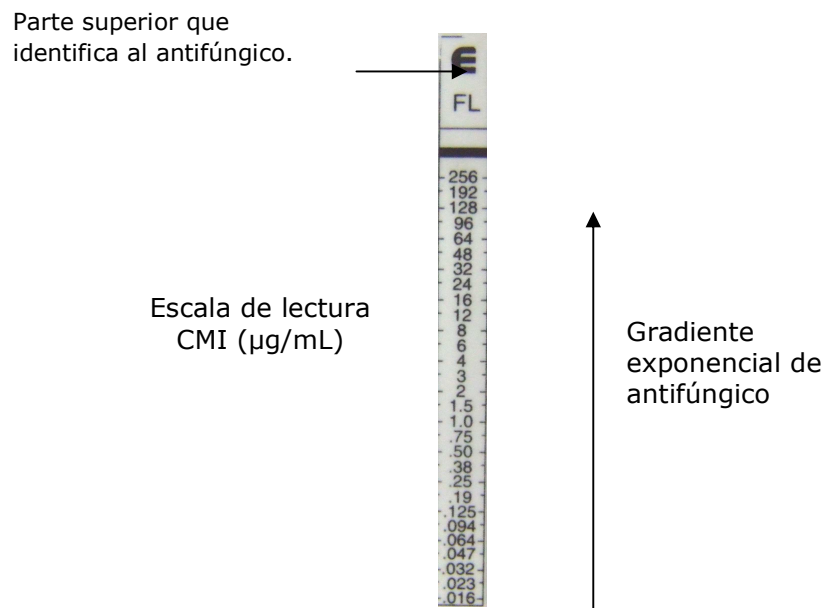


Figura 1.1. Características de las tiras de antifúngico empleadas en el método de E-Test.

1.3 MECANISMOS DE ACCION DE LOS ANTIFÚNGICOS

Actualmente se emplean un gran número de fármacos para el tratamiento de infecciones causadas por hongos tanto levaduriformes como filamentosos, entre estos fármacos mencionamos azoles, polienos y alilaminas.



POLIENOS

Anfotericina B (AMB)

Los polienos pertenecen a un tipo de antifúngicos naturales producidos por *Streptomyces nodosus*, descubiertos a principios de los años cincuenta del siglo XX. Uno de los derivados poliénicos más empleado para el tratamiento de micosis es la anfotericina B (AMB), otro fármaco perteneciente a este grupo es la nistatina, dichos compuestos son alifáticos, es decir poseen un lado hidrofóbico y un hidrofílico (Figura 1.2). La AMB puede formar sales solubles en entornos tanto básicos como ácidos, no se absorbe ni por vía oral, ni por vía muscular y es prácticamente insoluble en agua. El mecanismo de acción de la AMB consiste en unirse al ergosterol de la bicapa de la membrana teniendo como resultado la formación de poros hidrófilos compuestos por moléculas poliénicas unidas a los esteroides de la membrana. Esta configuración da origen a una estructura similar a la de un poro a través de la cual se escapan componentes citoplasmáticos vitales, produciendo la muerte del hongo [21].

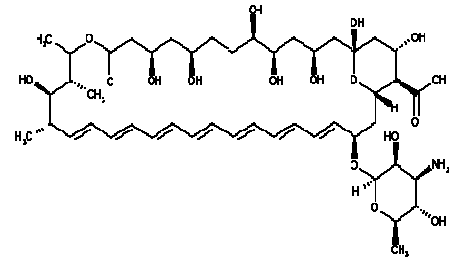


Figura 1.2 Molécula de AMB

AZOLES

Los azoles fueron descubiertos a finales de los años sesenta del siglo XX, son compuestos sintéticos. Los azoles utilizados en medicina se clasifican en imidazoles con sustitución en N-1 y triazoles. Los compuestos de la nueva generación de antifúngicos azólicos desarrollados pertenecen al grupo de los triazoles, dentro de este grupo encontramos a voriconazol, posaconazol, ruvoconazol, entre otros.

En levaduras y hongos filamentosos los azoles tiene como blanco común un citocromo P450, actualmente denominada Erg 11p, el producto de la codificación del gen ERG11. El nitrógeno libre del anillo imidazol o triazol de los antifúngicos azólicos se une al hierro del grupo hemo del Erg 11p como un sexto ligando y de este modo inhibe la reacción enzimática. La afinidad de los derivados imidazólicos y triazólicos



no solo depende de esta interacción, sino que también viene determinada por la sustitución N-1, la cual es, de hecho, la responsable de la elevada afinidad de los azólicos para su blanco.

Los azoles interfieren con la síntesis de ergosterol, al inhibir la C14- α -desmetilasa, una enzima acoplada al citocromo P-450 y que transforma lanosterol en ergosterol, ver figura 1.3. Esta inhibición altera la fluidez de la membrana, aumentando la permeabilidad y produciendo una inhibición del crecimiento celular y de la replicación. Esta inhibición del citocromo P-450 es responsable de los efectos adversos que los azoles pueden causar en humanos. [21]

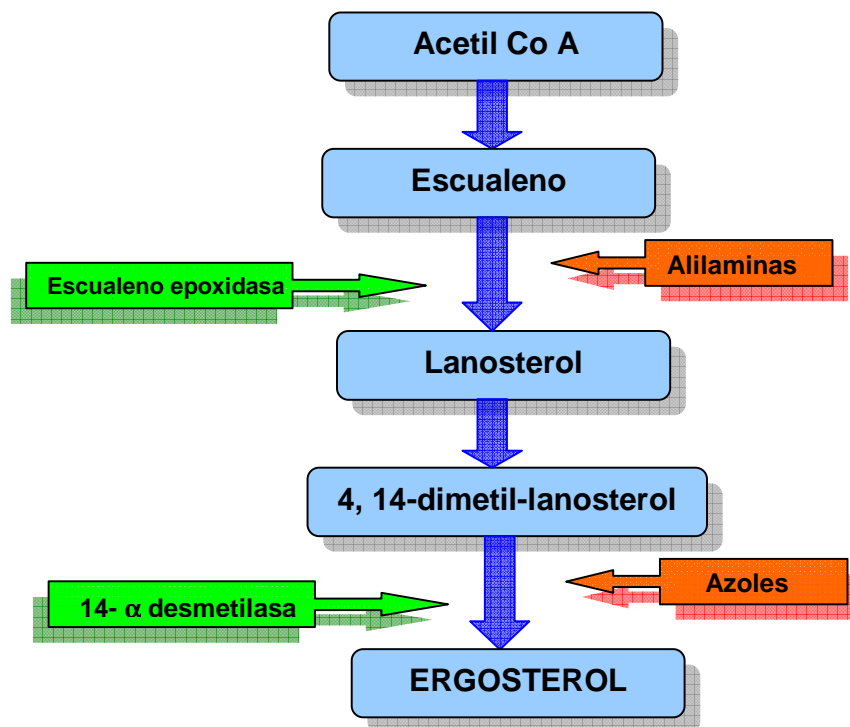


Figura 1.3 Mecanismos de acción de antifúngicos (azoles y alilaminas)



ALILAMINAS

Terbinafina (TRB)

Esta droga es un antifúngico sintético, interfiere con las primeras etapas de la síntesis del ergosterol, inhibiendo la enzima escualeno epoxidasa que realiza la epoxidación del escualeno, por lo que éste no se transforma en lanosterol, sino que se acumula en la célula, lo que provoca la ruptura de la membrana y la muerte de la célula fúngica. TRB es el único fármaco comercializado en presentación oral. Te Dorsthorst y cols [19] demostraron que TRB presenta actividad frente a dermatofitos y hongos filamentosos, además de mostrar efectos sinérgicos con los azoles, esto puede explicarse debido a que ambos agentes tienen diferente mecanismo de acción, bloquean en diferentes enzimas en la vía de la biosíntesis del ergosterol. Esta actividad puede determinar que la TRB se considere en un futuro como una alternativa terapéutica en algunas micosis sistémicas [16].

1.4 MECANISMOS DE RESISTENCIA DE LOS ANTIFÚNGICOS

La resistencia de los hongos filamentosos frente a los antifúngicos es un concepto amplio que puede clasificarse en resistencia clínica y en resistencia microbiológica.

La resistencia clínica se define como el crecimiento o falta de inhibición de un microorganismo en el foco de infección, a pesar de las concentraciones plasmáticas del fármaco. La resistencia clínica está relacionada con varios factores dependientes del paciente, del fármaco y su interacción. Los factores clínicos pueden contribuir al fracaso del tratamiento antifúngico establecido.

Cuando una infección persiste a pesar de la administración de un antifúngico a dosis máximas, se puede describir como clínicamente resistente al agente terapéutico. No obstante, el microorganismo responsable de la infección puede mostrar *in vitro* una sensibilidad normal al agente.

La resistencia microbiológica se puede definir como un cambio en la sensibilidad a los antifúngicos que se puede medir *in vitro* mediante técnicas de laboratorio adecuadas, se divide en:

- * Resistencia primaria o intrínseca: Es aquella que presentan todas las cepas de una misma especie de hongo normalmente sensibles a un



fármaco y aparece de forma espontánea sin haber estado en contacto previo con el fármaco.

- * Resistencia secundaria o adquirida: Es la que se desarrolla después de la exposición a los fármacos y que puede ser debida a alteraciones fenotípicas o genotípicas que se manifiestan de forma estable o transitoria [28].

En los años 90's, la resistencia a los fármacos genera un gran problema en una gran variedad de enfermedades infecciosas tales como el VIH, tuberculosis y otras infecciones bacterianas, lo cual tiene un gran efecto en la muerte de pacientes con estos padecimientos.

Hongos expuestos a drogas antifúngicas pueden limitar la actividad de los mismos por ser intrínsecamente resistentes o por adquirir mecanismos de resistencia específicos.

La distinción entre levaduras o cepas fúngicas sensibles y resistentes se puede establecer mediante un valor umbral de sensibilidad a un fármaco dado, que es el punto de corte de la CMI. De un modo ideal, en la práctica médica habitual los valores de estos puntos de corte predecirían el éxito o el fracaso de un tratamiento antifúngico. Sin embargo, las experiencias acumuladas con distintos agentes de este tipo demuestran que esta asociación no se puede aplicar inequívocamente

Tras la caracterización fenotípica de la resistencia es obligado un análisis molecular y bioquímico que identifique los mecanismos de resistencia, actualmente se han identificado los mecanismos por los cuales la célula inicialmente sensible se hace resistente a agentes citotóxicos y estos son :

- 1.- Incapacidad del fármaco para alcanzar la diana dentro de la célula, que puede ser debida a la existencia de barreras de permeabilidad o a sistemas de bombeo activo del compuesto al exterior.

- 2.- Cambios en la interacción fármaco-diana, aumento del numero de copias de la diana o modificación debido a mutaciones.

- 3.- Modificaciones en las enzimas de las vías metabólicas.

- 4.- Alteraciones en el procesamiento intracelular (degradación o modificación) del fármaco [16].

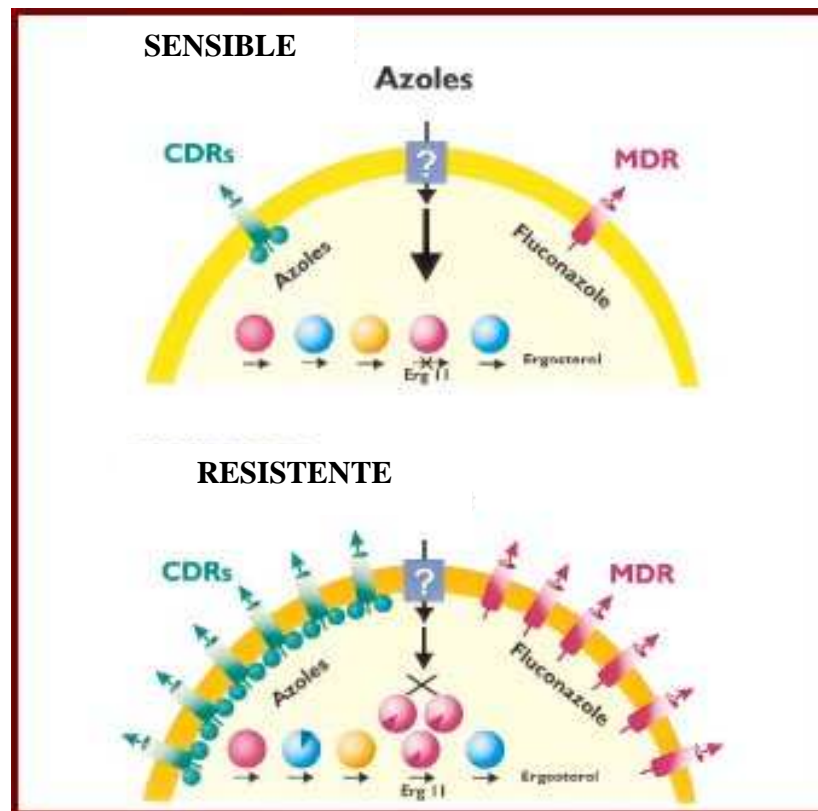


Figura 1.4 Mecanismos de resistencia a las drogas azolicas. Tomada de WHITE [28].

1.4.1 Mecanismo de resistencia a AMB.

La resistencia a AMB se presenta más frecuentemente en pacientes inmunocomprometidos, especialmente en pacientes con cáncer. También se presenta en aquellos que han sido expuestos a quimioterapias y a tratamientos con antifúngicos azólicos, esto puede ser debido a una alteración en la membrana celular.

La resistencia intrínseca a la AMB es más frecuente en hongos levaduriformes como: *C. lusitaniae* y *Trichosporon*. Algunas cepas de *C. lusitaniae* son capaces de experimentar *in vitro* una rápida conversión a ser resistentes a fármacos. La resistencia adquirida a la AMB se suelen asociar a alteraciones en los lípidos de membrana celular, especialmente de los esteroides. Recientemente se ha descrito aislados de *C. albicans* resistentes a la AMB que carecen de ergosterol y acumulan otros esteroides, característicos de un defecto en el sistema de la $\Delta^{5,6}$ desaturasa de esteroides. En *Sacharomyses cerevisiae* se conoce una alteración de este tipo que



deriva de un defecto en el gen ERG3 de la $\Delta^{5,6}$ esterol desaturasa. En una cepa clínica de *C. neoformans* aislada de un paciente con SIDA se identificó un defecto en la $\Delta^{8,7}$ isomerasa que también se asocia a resistencia a la AMB. La resistencia a la AMB también se puede deber a un descenso en el contenido de ergosterol asociado a la membrana celular, ya que la AMB requiere de la presencia de dicho compuesto para poder provocar lesiones en las células fúngicas. Diversos investigadores han respaldado esta posibilidad al demostrar que: a) la aparición de resistencias inducidas por un mecanismo de adaptación en una cepa de *C. albicans* se acompañaba de un descenso en el contenido en ergosterol de las células, y b) se presentó una disminución del 74-85% en el contenido en ergosterol de las cepas clínicas de *C. albicans* resistentes a los polienos procedentes de pacientes neutropénicos [21].

1.4.2 Mecanismo de resistencia a los azoles

Hasta finales de la década de 1980 del siglo XX las comunicaciones de resistencias a los antifúngicos azólicos habían sido raras. Los primeros casos descritos correspondieron a tratamientos prolongados con miconazol y KTZ contra *C. albicans*. El aumento en la frecuencia de la resistencia a la administración prolongada de FLZ fue para una amplia variedad de formas clínicas de candidosis. Los diversos mecanismos a través de los que las levaduras pueden adquirir resistencias frente a las drogas azólicas son:

a) Resistencias por alteraciones en el transporte del fármaco

Una causa de resistencia a los azoles que se ha identificado en diversas cepas de levaduras aisladas tras el tratamiento clínico es la incapacidad para acumular al fármaco. Los responsables de la baja acumulación de antifúngicos azólicos son las bombas de expulsión de múltiples fármacos pertenecientes a las superfamilias de transportadores con casete de unión al ATP (ATP-binding cassette) (ABC) y de facilitadores principales (FP). Se ha demostrado que en las cepas resistentes existe una sobreexpresión del gen *CDR 1* de los transportadores ABC y del gen *BENr* (también denominado *MDR 1*) de los FP.



b) Resistencias a los antifúngicos azólicos relacionadas con alteraciones de las dianas celulares.

Esta resistencia es debida al aumento del número de copias de la diana de los azoles (14- α esterol desmetilasa). El aumento del número de copias del gen *CYP 51* o de su expresión puede originar resistencia a los azoles. En levaduras se ha demostrado un aumento de la transcripción del gen *ERG 11 (CYP 51)* durante la exposición a los azoles. Este aumento se debe a la respuesta de la célula, a la disminución de ergosterol o a la acumulación de esteroides tóxicos. En hongos filamentosos los cambios en los niveles de expresión del gen *CYP 51* pueden desarrollar progresiva resistencia a los azoles. En cepas de *Penicillium digitatum* resistentes a triflumizol se ha demostrado la existencia de un activador de la transcripción en el promotor del *CYP 51* [16]. El número de copias de esta secuencia repetida en tandém se correlaciona directamente con la CMI a triflumizol. En *Aspergillus fumigatus* se ha comprobado que la transformación con un plásmido que contenga el gen *CYP 51* confiere resistencial a itraconazol. De esta manera podemos decir que la resistencia a los azoles en hongos filamentosos podría estar producida por amplificación o hiperexpresión de la diana de los azoles.

c) Mecanismos de resistencia a los azoles relacionados con alteraciones en la vía de la biosíntesis del ergosterol

El análisis de la composición en esteroides de las levaduras resistentes a los azoles ha permitido la formulación de diversas hipótesis sobre alteraciones específicas de enzimas implicadas en la compleja vía de la biosíntesis del ergosterol. En dos cepas clínicas distintas de *C. albicans* resistente a los azoles se observó una acumulación de ergosta-7, 22 – dienol – 3b –ol, característica compatible con la ausencia de actividad de la esterol $\Delta^{5,6}$ desaturasa, codificada por el gen *ERG*. En ambos casos la resistencia a los azoles se asoció a resistencia a la AMB, debido a la ausencia de ergosterol en esas células [21].



1.4.3 Mecanismo de resistencia a las Alilaminas

La resistencia a la TRB ha sido reportada recientemente en algunos trabajos, como los de White y cols [28], autores que realizaron estudios donde presentan evidencia de cepas resistentes de *Sacharomyses cerevisiae*, Leber y cols [13] estudiaron el mecanismo de resistencia TRB en la dicha cepa y encontraron que es debido a una mutación en el gen que codifica para la escualeno epoxidasa, enzima que es diana de TRB. Por otro lado, Favre B y cols [7] realizaron un estudio del mecanismo bioquímico de resistencia a TRB en aislamientos clínicos de *Trichophyton rubrum*, en el que encontraron una disminución en la actividad de TRB en los aislados clínicos que en una cepa control, ellos lo atribuyeron a una mutación en el gen que codifica para la escualeno epoxidasa. Leidich y cols [14] estudiaron la resistencia primaria a TRB en aislados clínicos de *T. rubrum* hallando en general una resistencia a otros inhibidores de la escualeno epoxidasa que atribuyen a un mecanismo de resistencia específico en la molécula diana.

1.5 FRECUENCIA DE RESISTENCIA

En la literatura existen pocos trabajos sobre la frecuencia de resistencia que presentan los hongos frente a diferentes drogas antifúngicas.

Vivas y cols [25] estudiaron la sensibilidad *in vitro* de hongos filamentosos donde encontraron que el 94.2% de los aislamientos fueron resistentes a la griseofulvina, el 96% a FLZ, el 28.8% a la AMB y el 100% a la 5-fluorocitosina. Por el contrario, todos los aislados fueron sensibles a ITZ, TRB y bifonazol, el 90.4% resultaron sensibles al KTZ, el 71% al miconazol y el 46% al clotrimazol y el 63 % de las cepas fueron sensibles a AMB.

En cuanto a la frecuencia de correlación entre diferentes métodos empleados para la determinación de sensibilidad antifúngica Wanger y cols [27] realizaron estudios para determinar la resistencia a AMB en aislamientos de *Candida*, compararon los métodos de E-test y microdilución en caldo, encontraron una concordancia en la CMI de 98% para *C. albicans*, 90% para *C. parapsilosis*, 85% para *C. tropicalis* y 100% para *C. glabrata*.



Guarro y cols [8] realizaron estudios de sensibilidad antifúngica en aislados de *Chrysosporium* y *Scytalidium spp.*, en los que encontraron que todos los aislamientos de *Chrysosporium* fueron sensibles a KTZ y FLZ y 25% fueron resistentes a ITZ. En el caso de *Scytalidium spp.* La resistencia de las cepas probadas fue de 7.7 para KTZ, 15.4 para FLZ y 62.5% para ITZ. El 23% de las cepas de *Scytalidium spp.* Y 100 % de las cepas de *Chrysosporium* fueron resistentes a 5-fluorocitosina.

En México, se han realizado algunos trabajos en aislado de *Candida spp* a partir de pacientes con candiduria, donde la resistencia mostrada fue del 8.7% frente a KTZ y FLZ y 30.4% frente a ITZ. [26] .Por otro lado en aislados de *Candida spp* de candidosis mucocutánea y sistémica se reportó el siguiente porcentaje de resistencia 35.5% para ITZ, 31.6% para VRZ, 23.7% para KTZ, 21% para FLZ y 7.9 % para AMB [18]. Por el contrario, en hongos filamentosos como *Sporotrix schenkkii* el 88.8 % de aislamientos fueron resistentes a FLZ, 61.1% a VRZ, 44.4% a ITZ. [8] Finalmente, recientemente Manzano-Gayosso y cols [15] determinaron un 20% y 27.5 % de resistencia en dermatofitos y en levaduras respectivamente.

1.6 *Chrysosporium spp*: AGENTE ETIOLOGIO DE DERMATOMICOSIS.

Clasificación taxonómica

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Euascomycetes

Orden: Onygenales

Familia: Onygenaceae

Genero: *Chrysosporium*

El género *Chrysosporium* fue introducido por Corda en 1833. Saccardo lo propuso como sinónimo de *Sporotrichum*. Más tarde este género fue revisado de manera exhaustiva y hasta la fecha se han reconocido 22 especies de *Chrysosporium*. Por los trabajos realizados, de los aislados de diversas especies del género de *Chrysosporium* en diferentes hábitats de todo el mundo, se demostró que varias de las especies son queratinofílicas y otras termotolerantes. Algunas veces, los cultivos de *Chrysosporium* son muy parecidos a los dermatofitos, como



Trichophyton mentagrophytes, *T. rubrum* y *Microsporium persicolor*; en ocasiones se llegan a confundir con hongos causantes de micosis profundas como *Histoplasma capsulatum* y *Blastomyces dermatitidis*. A este género pertenece el estado anamórfico de varios Ascomycetos. [11]

Este género presenta colonias que van del color blanco hasta marrón, de acuerdo a las diferentes especies pueden ser pulverulentas, algodonosas, planas, laxas. En la figura 1.5 se muestra un ejemplo de las colonias que desarrolla *Chrysosporium* spp.



Figura 1.5 *C. tropicum* (184-05). Colonia blanca, algodonosa y elevada al centro, con bordes vellosos.

En cuanto a la morfología microscópica puede presentar conidios terminales, intercalados en forma de clava, artroconidios alternos separados por una célula, microconidios que nacen sobre extremos hifales o pedicelos. En la figura 1.6 se muestra un ejemplo de la microscopia característica de algunas especies de *Chrysosporium* ssp.

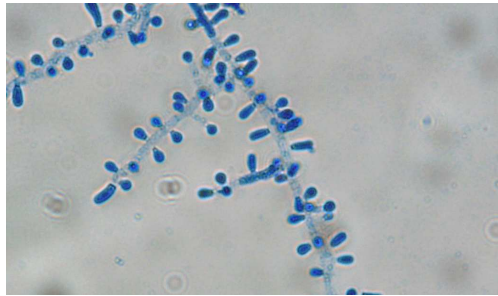


Figura 1.6 Microconidios en forma de clava, con conídios terminales que nacen sobre extremos hifales o pedicelos.

1.7 DERMATOMICOSIS POR *Chrysosporium* spp.

Las especies del género *Chrysosporium* son comúnmente saprofitos del suelo, muchas de las cuales son hongos queratinofílicos. La especies de *Chrysosporium* son aisladas con mayor frecuencia de escamas de piel y de uñas generalmente de los pies, debida a que es un hongo saprofito del suelo se considera como contaminante [20].

Chrysosporium spp. puede causar infecciones superficiales en el humano infecciones en la piel y onicomiosis en humanos. Ocasionalmente algunos aislados de *Chrysosporium* spp. alcanzan a originar infecciones sistémicas en pacientes que han recibido un transplante de medula ósea o con enfermedad granulomatosa crónica (EGC). Las infecciones por estos hongos son la mayor causa de morbilidad en pacientes inmunocomprometidos como es el caso de la EGC o enfermedades congénitas que producen inmunodeficiencia. [20]

Otras enfermedades asociadas a este género es la adiaspiromicosis cutánea, la infección cutánea primaria no es muy frecuente, posteriormente la diseminación secundaria va hacia órganos vitales tales como riñon, hígado, cerebro, pulmones. En la literatura se han reportado algunos casos de esta micosis, como infección primaria en ojos, senos nasales y paranasales y en corazón [23].



Figura 1.7 OSD causada por *Chrysosporium spp.*
Patología más frecuente asociada a este género.

De las formas clínicas cutáneas causadas por este género, la localización mas frecuente es las uñas de los pies (Figura 1.7), esta entidad clínica se caracteriza por engrosamiento de la uña, se torna de color amarillo, algunas veces son quebradizas y pulverulentas, porosas, fragmentadas con líneas surcadas. Cuando se presenta una dermatomicosis se caracteriza por la descamación de la piel, esto sucede generalmente en la planta del pie.



Capítulo 2. MATERIAL Y MÉTODOS



2.1 AISLADOS DE *Chrysosporium* spp.

Se estudiaron 11 aislados de *Chrysosporium* spp obtenidos de pacientes. Ocho de los pacientes eran residentes de zonas rurales y aparentemente sin ningún factor de riesgo; los tres restantes de la Ciudad de México y con diabetes mellitus tipo 2 (DMT2). Los datos demográficos y la localización de las dermatomicosis se muestran en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1 Datos demográficos y localización de la dermatomicosis.

CLAVE	SEXO	EDAD	LOCALIZACIÓN
127-05	M	74	Uñas
57-04*	F	54	Uñas
45-05*	M	66	Uñas
114-05	F	69	Uñas
103-05	F	50	Uñas
196-05	F	33	planta del pie
322-05	F	58	Uñas
115-05*	F	16	Uñas
184-05	F	28	Uñas
278-05	M	35	planta del pie
360-05	F	42	Uñas

* Estos aislados se obtuvieron de pacientes con DMT2.

2.2 ESTUDIO MICOLÓGICO

2.2.1 Examen microscópico directo.

A todos los pacientes se les tomo muestra de escamas de uñas y/o planta del pie; las cuales fueron obtenidas por raspado con la ayuda de un bisturí con hoja desafilada y colectadas en cajas de petri estériles. A cada muestra se realizó examen microscópico directo aclarado con hidróxido de potasio al 15% para la observación de las estructuras parasitarias del hongo.



2.2.2 Cultivo del espécimen.

Las escamas se inocularon en 10 puntos sobre la superficie de Agar Dextrosa Sabouraud (ADS) y ADS con cicloheximida y cloranfenicol, contenidos en cajas de Petri. Se incubaron a 28°C durante cuatro semanas.

2.2.3 Morfología Macroscópica.

El estudio macroscópico se basó en la observación de las características de las colonias como: textura, forma, tamaño, color de la colonia, producción de pigmento anverso y reverso. Las colonias son de crecimiento moderadamente rápido, planas, el color del anverso varía de blanco a marrón, la textura de la superficie puede ser de algodonosa a granulosa. En el reverso el pigmento puede estar o no presente, cuando esta presente va de blanco a marrón pálido.

2.2.4 Morfología Microscópica

A cada uno de los aislados se le realizó un microcultivo para la observación de los conidios (forma, tamaño, disposición en la hifa conidiógena). Esta especie posee hifas hialinas, septadas, los conidios son producidos directamente de la hifa vegetativa por conidiogenesis no especializada. Los conidios son típicamente piriformes o en forma de clava con base truncada, laterales o terminales. En ocasiones forman artroconidios intercalados.

2.2.5 Identificación de los aislamientos.

La identificación de los diferentes aislamientos de *Chrysosporium* se realizó siguiendo el esquema de Kane y cols [10] el cual consiste en las pruebas enunciadas en la Tabla 2.2 y descritas a continuación:



Tabla 2.2 Características fisiológicas y pruebas bioquímicas de hongos similares a dermatofitos. [10]

Clave de la Reacciones en BCP			Otras reacciones								
	Desarrollo y pH	pH e hidrólisis	PIG.	1	2	3	4	5	6	7	Especies
A	- Crecimiento mínimo o restringido	Hidrólisis moderada a completa	marrón	R	3-5	a	+	+	-/ lento	-	<i>Chrysosporium lobatum</i>
	- No hay cambio de pH	No hay hidrólisis	-	S S	12- 15	a/M	+	+	-	-	<i>Chrysosporium carmichaelli</i>
B	- Crecimiento moderado o profuso. - No hay cambio de pH o trazas.	- No o ligeramente ácido. No o hidrólisis incompleta	-	R	5-7	a	+	-	++	+	<i>Chrysosporium tropicum</i>
			-	R	5-7	a/M	+	-	+/ lento	+	<i>Chrysosporium keratinophyllum</i>
		- No o ligera alcalinización. Hidrólisis moderada a completa	-	R	5-7	a/M	+	-	+/ lento	+	<i>Chrysosporium articulatum</i>
			-	R	3	a/M	+	-	-	+	<i>Chrysosporium evolceanium</i>
C	- Crecimiento mínimo o moderado. - pH alcalino	Hidrólisis moderada a completa	Rojo	R	7-10	R	+	-	-	+	<i>Chrysosporium georgiae</i>

1: Tolerancia a cicloheximida (R: resistente; SS: en parte sensible)
 2: Desarrollo en medio hiperosmolar (mm).
 3: Producción de pigmento a/M: amarillo/lento
 4: Urea
 5: Requerimientos de tiamina

6: Desarrollo a 37°C
 7: Prueba de perforación en pelo.
 PIG: Pigmento en el reverso (Marrón: Al reverso el color es visible además aclara el medio.) – No presente pigmento.
 Hidrólisis completa: La periferia del medio se aclara.

- ✧ Producción de ureasa: se utiliza el medio Christensen, en el cual se inoculó una pequeña porción del aislado. Se incubó a 28°C y la lectura se realizó a los 7-14 días. El resultado es positivo cuando se produce una alcalinización del medio, por la liberación de amoniaco lo que produce un cambio de coloración en el medio de amarillo a rojo.
- ✧ La resistencia a cicloheximida utilizando el medio ADS con antibióticos, y se comparó el crecimiento con el observado en medio ADS. Las cajas de Petri con ADS y ADS con antibióticos, se inocularon con 2 µL en el centro de la placa, de una suspensión a una concentración de 1×10^6 conidios del aislado de 7 días de crecimiento en ADS a 28°C, se incubaron a 28°C durante 7-14 días. Las lecturas se realizaron midiendo el diámetro de la colonia.



- ✧ El crecimiento, cambio de pH y la hidrólisis del medio sólido de leche azul de bromocresol adicionado con agar y glucosa (BCP). En este medio se inocularon 2 μL de una suspensión a una concentración de 1×10^6 conidios del aislado de 7 días de crecimiento a 28°C , se incubaron a 28°C durante 7-14 días. Se evaluó el crecimiento de las colonias. El pH fue registrado como alcalino, si el medio se torno morado o ácido si se torno amarillo. La hidrólisis observada más allá de la periferia de la colonia fueron registrados como una hidrólisis completa, en tanto el aclaramiento detrás de la colonia se registró como hidrólisis incompleta.
- ✧ Producción de pigmento en medio agar-peptona al 1% y en agar lactrimel. El pigmento se evaluó al reverso de la colonia o difundido al medio.
- ✧ El crecimiento en un medio hiperosmolar: (ADS-adicionado con cloruro de sodio al 5%). Esta prueba consiste en inocular 2 μL de una suspensión a una concentración de 1×10^6 conidios del aislado de 7 días de crecimiento a 28°C en el centro de la placa, se incubaron a 28°C durante 7-14 días. Las lecturas se realizaron midiendo el diámetro de la colonia. El tamaño de la colonia menor a 5 mm se consideró como colonias inhibidas por la concentración de sal.
- ✧ Requerimientos nutricionales de tiamina, mediante la comparación del crecimiento en una medio adicionado con tiamina a una concentración de 0.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y otro sin este compuesto.
- ✧ Capacidad de degradar la queratina, mediante la técnica de perforación en pelo. Los pelos se examinaron bajo el microscopio, buscando perforaciones a lo largo de la extensión.
- ✧ La capacidad de crecer a 37°C . Para evaluar la ter motolerancia se inocularon 2 μL en el centro de la placa conteniendo ADS, de una suspensión a una concentración de 1×10^6 conidios del aislado de 7 días de crecimiento a 28°C , se incubaron a 37°C durante 7-14 días. Las lecturas se realizaron midiendo el diámetro de la colonia.



Los aislamientos se mantuvieron en agua hasta los estudios de sensibilidad antifúngica

2.3 ESTUDIO DE SENSIBILIDAD ANTIFÚNGICA

2.3.1 E-Test

a) Recuperación de los aislados en arroz.

Todos los aislados fueron recuperados de agua mediante la inoculación en granos de arroz estériles contenidos en un frasco de 50 mL, se incubaron durante 7 a 14 días a 28°C. Posteriormente se tomó una colonia de las que desarrollaron en arroz y se sembró en agar Lactrimel para inducir la esporulación de los hongos.

b) Preparación del inóculo de conidios.

- ✧ Los aislados de *Chrysosporium* crecidos en ADS a 28°C durante 7 días, fueron resembrados en tubos de ensaye que contenían agar Lactrimel durante 7 días a 28°C.
- ✧ Se agregó un mililitro de solución salina estéril al 0.85% y con ayuda de una pipeta Pasteur se resuspendió varias veces hasta obtener una suspensión homogénea de conidios.
- ✧ Con la pipeta se obtuvo la suspensión de conidios y se depositó en tubos de ensaye de 100 X 12 mm.
- ✧ Se agitó suavemente con un vortex y se dejó resuspender durante 5 minutos.
- ✧ Se tomó una porción de la suspensión de la parte intermedia y se colocó en una cámara de Neubauer.
- ✧ Se contaron los conidios y se ajustó a una concentración de 1×10^6 conidios/ mL.
- ✧ Para verificar que la concentración de conidios fue la deseada se inocularon 10 µL de la suspensión obtenida en una placa de ADS, se incubó a 28°C durante 7 días, se realizó la cuenta de colonias y se obtuvo la relación.



c) Inoculación de las placas

Con un hisopo estéril impregnado con la suspensión de conidios del hongo en estudio, se sembraron las placas de agar RPMI con extensión a toda la superficie en tres direcciones; las placas se dejaron abiertas en una campana de flujo laminar, para el completo secado durante 15 minutos. Se aplicaron las tiras antifúngicas y se cubrieron con bolsas de plástico. Se incubaron a 35°C durante 24 horas y posteriormente a 28°C hasta 5 días.



Figura 2.1 Aplicación de las tiras del antifúngico sobre el agar RPMI

d) Tiras antifúngicas

Se utilizaron tiras antifúngicas de voriconazol, itraconazol y ketoconazol con un gradiente de concentraciones de 0.002 $\mu\text{g/mL}$ a 32 $\mu\text{g/mL}$ y tiras de fluconazol con un gradiente de 0.016 a 256 $\mu\text{g/mL}$ (AB BIODISK).

e) Lectura

La lectura de la CMI es en el punto donde el halo de inhibición interseca con la escala de CMI de la tira antifúngica. Se ignoraron los filamentos observados dentro del halo, ya que este sobrecrecimiento se puede dar por incubación prolongada.

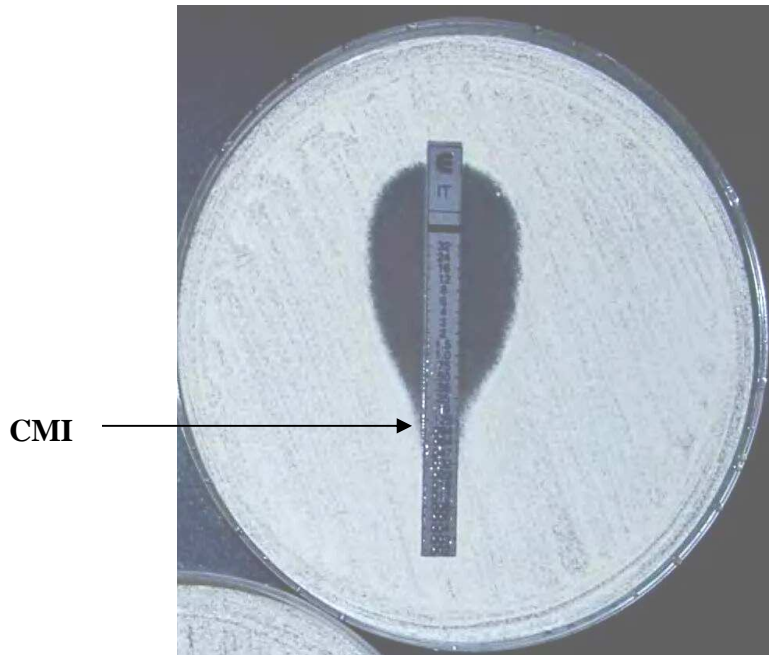


Figura 2.2 Lectura de la CMI.

2.3.2 Método de microdilución en caldo.

Este método solo se emplea para terbinafina, debido a que no se cuenta con una tira de E-test de dicho antifúngico.

a) Preparación de la solución madre

- ✧ Se preparó una solución con 16 g de la sal en 10 mL de dimetil sulfóxido (DMSO) para obtener una concentración de 1,600 $\mu\text{g/mL}$ (100 veces superior a la concentración más alta de antifúngico a ensayar).
- ✧ Se esterilizó por filtración con unidades filtro de 0.2 μm de diámetro.
- ✧ Se repartieron en alícuotas de 500 μL y conservar a -20°C hasta su uso.

b) Preparación de las placas de agar RPMI

- ✧ A partir de la solución madre se preparó la serie de diluciones a una concentración 100 veces superior a la concentración final deseada, utilizando como diluyente DMSO.



- ✱ Posteriormente se realizó una dilución 1/50 tomando 100 μL de cada tubo y se transfirieron a otro tubo que contenía 4.9 mL de RPMI, con lo que la concentración del antifúngico es dos veces mayor que la concentración final deseada (32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ – 0.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y la de DMSO al 2%.
- ✱ El contenido de cada tubo se vertió en una placa de Petri estéril y con ayuda de una micropipeta multicanal (8 canales) se procedió al llenado de las placas estériles de 96 pozos, como se muestra en la figura 2.3, 100 μl de la concentración correspondiente, en cada pozo es decir, en los pozos de la columna 1 la mayor concentración y en la 10 la menor.

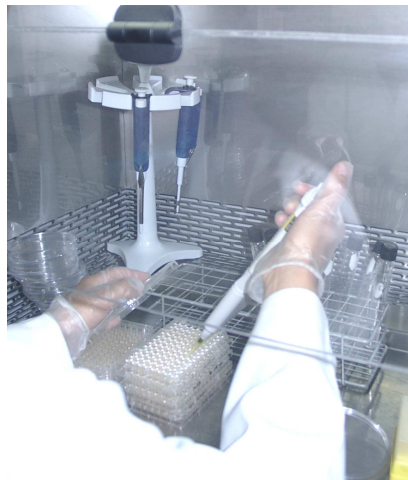


Figura 2.3 Llenado de las placas

- ✱ Las microplacas se sellaron para evitar la evaporación del líquido y cubrieron con papel aluminio, se congelaron a -20°C .

c) Preparación del inóculo

La preparación de inóculo se realiza de la misma manera que para el método de E-test.

d) Inoculación de las placas

La inoculación de las placas se realizó de la siguiente manera: se hizo una dilución 1:50 del inóculo para obtener una concentración de 1×10^6 conidios/ mL. Se inocularon con 100 μL de la suspensión, los pozos de la fila C a la H. Los pozos de la columna 11 correspondieron a el control de crecimiento del hongo y la columna 12 al



control de esterilidad (RPMI + DMSO 2%). Las placas fueron cubiertas con bolsas de plástico y se incubaron a 35°C durante 24 horas y posteriormente a 28°C hasta 5 días.

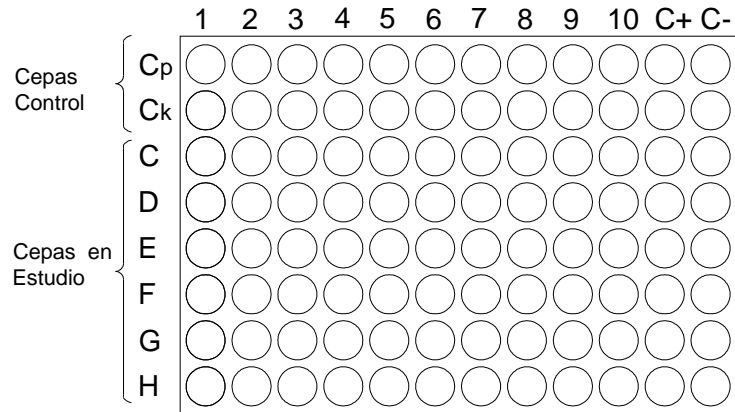


Figura 2.4 Placa de microdilución

e) Lectura de la CMI

La lectura de las placas se realizó visualmente con un espejo invertido y se determinó el porcentaje del 100% de inhibición del crecimiento respecto al control del crecimiento. El punto de corte para considerar resistencia fue $CMI \geq 8 \mu\text{g/mL}$ y sensible $\leq 8 \mu\text{g/mL}$.



2.3.3 Cepas control de calidad

En cada ensayo se incluyó una cepa control para poder detectar cualquier anomalía o desactivación del antifúngico. El CLSI aconseja utilizar las siguientes cepas: *C. parapsilosis* American

Type Culture Collection (ATCC) 22019 y *C. krusei* ATCC 6258. Son cepas que han mostrado tener estabilidad genética y para las que la CMI se ha determinado repetidamente.

Tabla 2.3 Intervalos de CMI para los controles de calidad después de 48 horas

<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	MIC µg/mL	
	CLSI	E.test
AMB	0.25 – 1	0.25 – 2
FLZ	0.12 – 0.5	2 – 8
KTZ	2 – 8	0.032 – 0.125
ITZ	0.06 – 0.25	0.064 – 0.25
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	MIC µg/mL	
	CLSI	E.test
AMB	0.5 – 2	0.5 – 2
FLZ	16 – 64	≥ 256
KTZ	0.12 – 0.5	0.25 – 1
ITZ	0.12 – 0.5	0.125 – 0.5



Capítulo 3. RESULTADOS



En la tabla 3.1 se muestran los datos demográficos, diagnóstico y especie de *Chrysosporium* causal de dermatomicosis. De los 11 pacientes estudiados, 3 fueron mujeres y 8 hombres, con edad promedio de 47.7 años. Ocho de los once pacientes presentaron onicomicosis subungueal distal (OSD), dos dermatomicosis y uno onicomicosis distrófica total (ODT), dichos cuadros clínicos se muestran en la figura 3.1, donde la OSD estuvo caracterizada por afección de la porción distal de la uña, con engrosamiento, de tonalidad blanquecina, porosa, fragmentada y con líneas surcadas horizontalmente; en la ODT la uña estaba afectada en su totalidad, con engrosamiento, porosa y de tonalidad amarillenta, finalmente en la dermatomicosis de la planta del pie se observa descamación difusa. En todas las muestras de escamas procesadas para examen microscópico directo con KOH se observaron hifas hialinas, largas y ramificadas, como se muestra en la figura 3.2.

De las especies identificadas, cuatro correspondieron a *C. tropicum*, dos a *C. tuberculatum*, dos a *C. lobatum*; y de las especies *C. keratinophilum*, *C. georgiae* y *C. evolceaniu* hubo un aislado de cada una. Para dicha identificación de acuerdo al esquema de Kane, en la figura 3.3 se muestra la perforación en pelo realizada por *C. keratinophilum*; en la figura 3.4 a) se muestra el crecimiento en peptona, NaCl al 5% y agar antibióticos del aislado *C. tropicum* (184-05), donde se observó la alta sensibilidad al NaCl y resistencia a cicloheximida. En la figura 3.4 b) se aprecia un cambio de coloración en el medio BCP por una variación de pH debido a la hidrólisis que ocurre con los sólidos de la leche.

En las figuras 3.5 y 3.6 se muestran las características macro y microscópicas de algunos de los aislados, en la figura 3.5 a) se observa una colonia pulverulenta con margen blanco algodonoso, de color beige que corresponde a *C. tuberculatum*, en b) se observa una colonia blanca de centro elevado algodonoso y margen veloso perteneciente a *C. tropicum* y en c) se presenta una colonia concéntrica, aterciopelada con pliegues radiales.

En la figura 3.6 se muestran las diferentes formas de conidios que predominaron en las especies aisladas de *Chrysosporium*, en a) se observa artroconidios alternos separados por una célula, y microconidios intercalares en



forma de clava, en b) microconidios laterales y terminales en forma de clava, nacen sobre extremos hifales y en c) conidios grandes ovoides o piriformes y equinulados.

En cuanto a los resultados obtenidos de las pruebas de sensibilidad antifúngica, en la tabla 3.2 se enlistan las CMI's de aislamientos de *Chrysosporium* spp. frente a diferentes antifúngicos por el método de E-test. Los diferentes aislados mostraron resistencia frente a las drogas azólicas, siendo el mayor porcentaje de FLZ con 54.5%, seguido por VRZ con 45.6% e ITZ con 36.4% y 27.3 % de cepas resistentes frente a KTZ. Solamente dos de los aislamientos, *C. lobatum* (114-05) y *C. tuberculatum* (196-05) mostrarán resistencia frente a tres y cuatro azoles respectivamente. En la gráfica 1, se muestra que ninguno de los aislados de *Chrysosporium* presentaron resistencia frente a terbinafina y en la figura 3.7 se observa la CMI de 0.06 µg/mL, de los diferentes aislados probados con TRB.

En la figura 3.8 en a) se observa que el aislado 114-05, que correspondió a *C. lobatum* presentó resistencia a todos los azoles probados, en el caso de VRZ, que es la placa del extremo inferior derecho se observa un pequeño halo de inhibición, cuya CMI fue de 4 µg/mL valor que indica sensibilidad frente a este antifúngico; en cambio en b) el aislado 115-05 que correspondió a *C. tropicum*, presenta el halo de inhibición bien definido y la CMI fue de 0.016 µg/mL valor que significa sensibilidad a VRZ (placa del extremo inferior derecho). En la placa inferior izquierda se observa que este aislado presenta resistencia a FLZ.



Tablas, Gráficas y Figuras



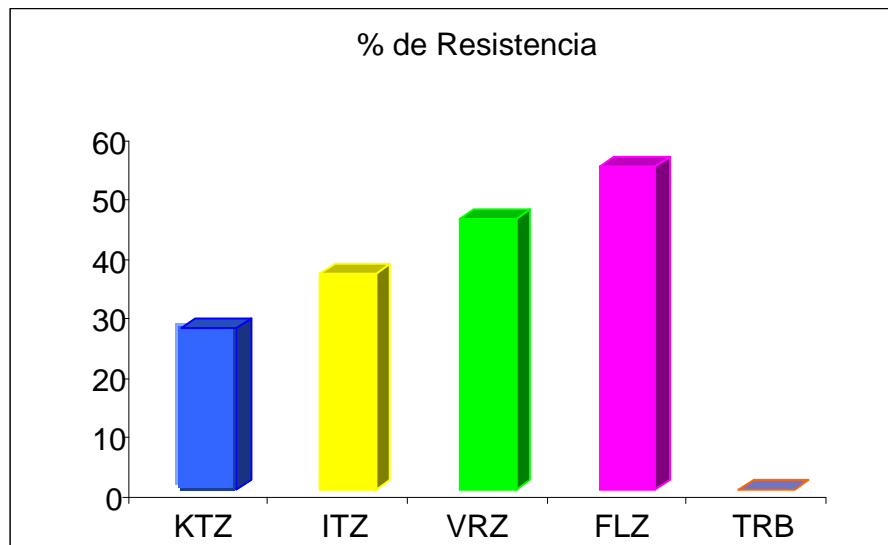
Tabla 3.1 Aislamientos de *Chrysosporium* spp. Obtenidas de pacientes con dermatomicosis.

CLAVE	SEXO	EDAD	DIAGNOSTICO	EXAMEN DIRECTO	IDENTIFICACIÓN
127-05	M	74	OSD	Hifas hialinas	<i>C. evolceani</i>
57-04*	F	54	OSD	Hifas hialinas	<i>C.georgiae</i>
45-05*	M	66	OSD	Hifas hialinas	<i>C.keratinophylum</i>
114-05	F	69	OSD	Hifas hialinas	<i>C. lobatum</i>
103-05	F	50	OSD	Hifas hialinas	<i>C. lobatum</i>
196-05	F	33	Dermatomicosis	Hifas hialinas	<i>C. tuberculatum</i>
322-05	F	58	OSD	Hifas hialinas	<i>C. tuberculatum</i>
115-05*	F	16	ODT	Hifas hialinas	<i>C. tropicum</i>
184-05	F	28	OSD	Hifas hialinas	<i>C. tropicum</i>
278-05	M	35	Dermatomicosis	Hifas hialinas	<i>C. tropicum</i>
360-05	F	42	OSD	Hifas hialinas	<i>C. tropicum</i>

*Estos aislados se obtuvieron de pacientes con Diabetes mellitus Tipo 2 (DMT2).

Tabla 3.2 CMI de los aislamientos de *Chrysosporium* spp. frente a diferentes antifúngicos por el método de E-test.

Clave	Especie	KTZ ($\mu\text{g/mL}$)	ITZ ($\mu\text{g/mL}$)	VRZ ($\mu\text{g/mL}$)	FLZ ($\mu\text{g/mL}$)
127-05	<i>C. evolceani</i>	0.75	0.25	0.047	>256
57-04	<i>C.georgiae</i>	0.25	1.0	0.016	>256
45-05	<i>C.keratinophylum</i>	2.0	2.0	0.25	32.0
114-05	<i>C. lobatum</i>	>32.0	>32.0	4.0	>256
103-05	<i>C. lobatum</i>	0.125	0.125	>32.0	0.06
196-05	<i>C. tuberculatum</i>	16.0	16.0	>32.0	>256
322-05	<i>C. tuberculatum</i>	1.0	0.5	>32.0	32.0
115-05	<i>C. tropicum</i>	0.125	0.125	0.016	>256
184-05	<i>C. tropicum</i>	12.0	12.0	0.125	>256
278-05	<i>C. tropicum</i>	2.0	2.0	>32.0	0.06
360-05	<i>C. tropicum</i>	2.0	8.0	>32.0	0.047
% de resistencia		27.3	36.4	45.6	54.5



Grafica 1. Resistencia antifúngica en *Chrysosporium* spp. frente a diferentes antifúngicos.

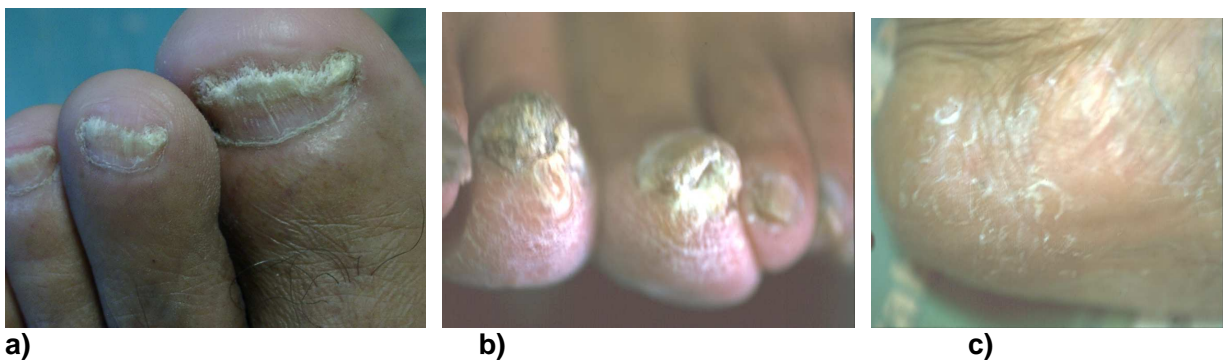


Figura 3.1 a) Onicomicosis subungueal distal (OSD), b) Onicomicosis distrófica total (ODT), c) Dermatomicosis

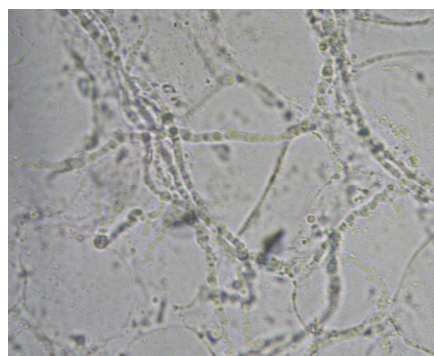
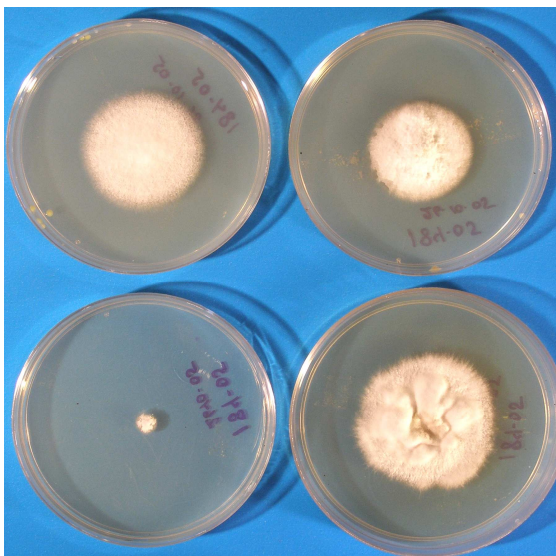


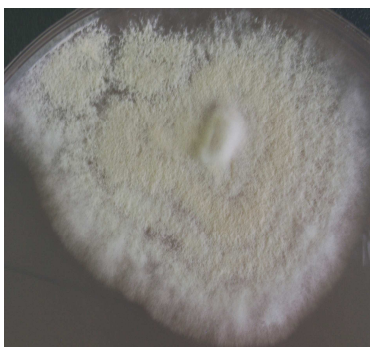
Figura 3.2 Examen microscópico directo con KOH se observan hifas hialinas ramificadas



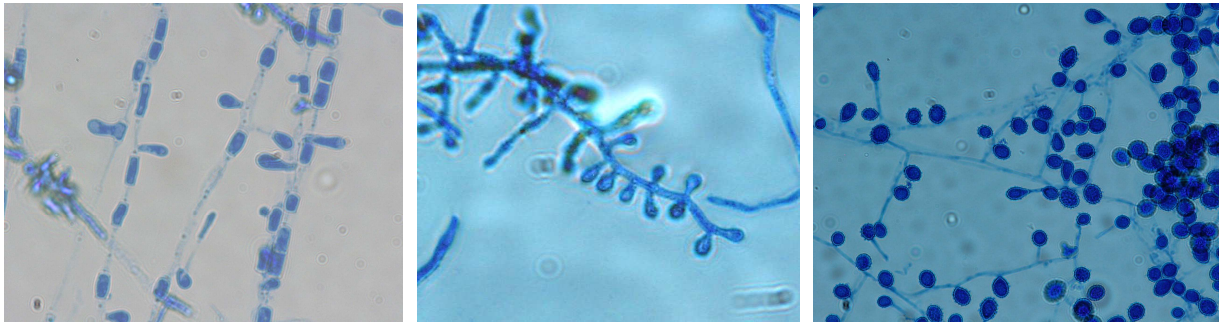
Figura 3.3 Prueba de perforación del pelo



a) **Figura 3.4** a) Crecimiento de *Chrysosporium* en ADS, agar peptona 1%, agar NaCl 5%, ADS con cloranfenicol y cicloheximida. b) Aislados de *Chrysosporium* en medio BCP.



a) **Figura 3.5** Características macroscópicas del género *Chrysosporium*, que corresponde a a) *C. tuberculatum* (196-05) b) *C. tropicum* (184-05) c) *C. evolceanii* (127-05)



a)

b)

c)

Figura 3.6 Características microscópicas de *Chrysosporium* spp.

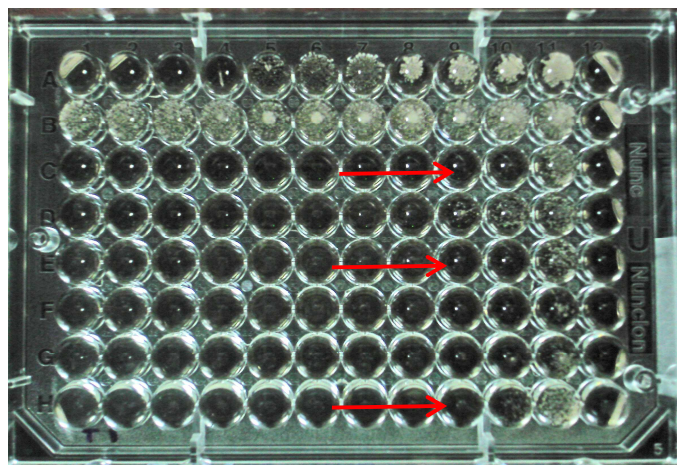
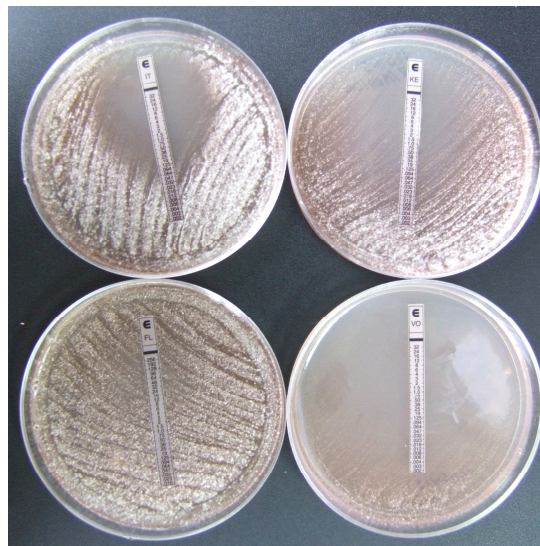


Figura 3.7 Placa de microdilución en caldo con terbinafina e inoculada con diferentes aislados de *Chrysosporium* spp, la CMI's es de 0.06 µg/mL (→)



a)114-05



b) 115-05

Figura 3.8 a) Aislado resistente frente a las cuatro drogas antifúngicas y b) Aislado resistente a FLZ y sensible a KTZ, ITZ y VRZ.



Capitulo 4. DISCUSIÓN y CONCLUSIONES



DISCUSIÓN

En la actualidad son pocos los casos descritos sobre las micosis causadas por hongos filamentosos del género *Chrysosporium*. En general, cuando el padecimiento es cutáneo se confunde con dermatofitosis, debido a las características clínicas que en su mayoría afectan las uñas y la piel. [20] En ocasiones pueden causar infecciones profundas como pericarditis, en pacientes inmunocomprometidos. [19] Stebbins y cols. . [23] reportan un caso de adiospiromicosis cutánea, una entidad dermatológica distinta asociada con especies de *Chrysosporium* en un paciente inmunocomprometido por un trasplante de corazón.

Aunque esta micosis es rara, en la literatura son más comunes las descripciones de onicomycosis (OSD) por este agente, como se observó en el presente estudio que 9 de 11 pacientes presentaron esta forma clínica. [22]

El estudio micológico de los aislamientos de *Chrysosporium*, tanto en su morfología macroscópica y microscopía es de suma importancia para poder establecer un diagnóstico preciso e iniciar un tratamiento dirigido para el control de los padecimientos causados por este agente etiológico. En el presente estudio se identificaron dos aislados de *C. tuberculatum*; el cual presenta conidios equinulados; esta especie es importante diferenciarla de otros hongos como *Histoplasma capsulatum*, agente causal de una micosis sistémica, de alta mortalidad. En la literatura existen reportes de falsos positivos con esta especie, por tanto se han diseñado otros métodos de tipo molecular para su diferenciación. [2], en nuestro estudio con las pruebas descritas en el esquema de Kane. [10] se realizó la identificación de *C. tuberculatum*.

Otros hongos con los cuales se debe diferenciar *Chrysosporium* es con los dermatofitos, con los cuales tiene una relación biológica estrecha como con *Trichophyton mentagrophytes* el cual presenta colonias planas, blancas, pulverulentas y vellosas con un pigmento amarillo a marrón al reverso y con *Blastomyces dermatitis*, quien presenta colonias blancas, vellosas y con pliegues radiales, cuyo micelio es muy fino, y los conidios redondos u ovoides similares a los observados en nuestros aislados de *C. keratinophyllum* y *C. tuberculatum*. [10]



De acuerdo con las diferentes publicaciones se han empleado diversos antifúngicos para el tratamiento de los padecimientos causados por *Chrysosporium*, en la literatura se ha reportado AMB como el antifúngico de mayor acción contra este agente, debido a que este tipo de hongos es susceptible a dicho fármaco. [20] Este antifúngico sería ideal para los casos diseminados a órganos internos. En las dermatomicosis causadas por este agente no se ha establecido un tratamiento de elección, se han empleado drogas azólicas y alilaminas con resultados variables; como el caso descrito por Baran y Walów [22], el cual recibió múltiples tratamientos antifúngicos con reactivaciones por *C. keratinophyllum*

Algunos de los trabajos de sensibilidad antifúngica *in vitro* en hongos filamentosos han demostrado resistencia variable frente a los antifúngicos, como el trabajo de Vivas y cols, [25] quienes mediante el método de E- test encontraron que el 94.2% de los aislamientos fueron resistentes a griseofulvina, el 96% a FLZ, el 28.8% a AMB y el 100% a 5-fluorocitosina. Por el contrario, todos los aislados fueron sensibles a ITZ, TRB y bifonazol, y el 90.4% sensible a KTZ. Mientras que Mendez-Tovar y cols. [16] demostraron el 19.4% de resistencia de aislados de *Trichophyton* en pacientes con dermatofitosis.

Guarro y cols. [8] presentaron un estudio de sensibilidad antifúngica de *Chrysosporium* frente a FLZ, ITZ y KTZ, donde reportaron que los tres antifúngicos mostraron actividad, en el caso de FLZ y KTZ todas las cepas fueron sensibles, y el 25 % de las cepas fueron resistentes a ITZ. A diferencia de estos resultados en nuestro estudio encontramos que el antifúngico que presentó menor actividad fue FLZ, ya que el 54.5 % de cepas fueron resistentes, seguido por VRZ, ITZ y KTZ en el 45.6, 36.4% y 27.3 %, respectivamente. El antifúngico que mostró mayor actividad fue TRB, ya que todas las cepas fueron sensibles; de tal manera que podría ser el tratamiento de elección para las dermatomicosis causadas por *Chrysosporium*. Cabe mencionar que en dos de los aislados de *C. lobatum*, 114-05 presentó resistencia a tres de las drogas azólicas, KTZ, ITZ y FLZ, mientras que el aislado 103-05, fue resistente a VRZ y en el caso del aislado 196-05 resultó ser resistente a las cuatro drogas azólicas probadas en el estudio; en cambio frente a TRB tuvo una respuesta favorable ya que fue sensible a la CMI más baja (0.03 µg/mL).



En cuanto a la evaluación del método de difusión en agar, debido a que es un método comercial es de fácil manipulación, así como de una interpretación rápida de resultados; esto favorece para no tener microorganismos contaminantes por los periodos prolongados de incubación que muchas de las veces interfieren en la lectura de la CMI; el medio empleado en este método permite el crecimiento óptimo de *Crhysosporium* spp. El inconveniente de esta técnica es que no se encuentran disponibles todos los antifúngicos en tiras de E-test.



CONCLUSIONES

- Las dermatomicosis causadas por *Chrysosporium* presentan similitud clínica con otras micosis por hongos queratinofilicos, principalmente dermatofitos, por lo que es importante su diferenciación clínica y la determinación del agente causal para establecer un tratamiento.
- En este estudio se demostró una resistencia antifúngica del 54.5% a FLZ, 45.6% a VRZ, 36.4% a ITZ y 27.3% a KTZ.
- TRB mostró buena actividad antifúngica *in vitro* frente a *Chrysosporium* y puede ser considerado el antifúngico de elección para el tratamiento de las formas cutáneas causadas por *Chrysosporium*.
- FLZ mostró baja actividad frente a las diversas especies del *Chrysosporium*, lo cual limita su uso en el tratamiento de los casos cutáneos de micosis causados por este hongo.
- El método E-test se recomienda para la determinación del patrón de sensibilidad de hongos keratinofilicos.



BIBLIOGRAFÍA

1. Ballesté R, Arteta Z, Barloco A, Mier C, Fernandez N, Mousqués N, Xavier B, Cabrera MJ, Combol A, Gezuele E. Evaluación del desempeño diagnóstico del método de difusión en agar E-test para el estudio de sensibilidad a los antifúngicos. *Ver Méd Urug* 2006; 22: 128 – 135.
2. Brant ME, Gaunt D, Iqbal N, McClinton S, Hambleton S, Sigler L. False-Positive *Histoplasma capsulatum* Gen-Probe Chemiluminescent Test Result Caused by a *Chrysosporium* Species. *J Clin Microbiol* 2005;43:1456-1458.
3. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M-38A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
4. Dimitrios P. K., Russel E.L., Namita S., Gregory M., Randall A.P., Kenneth V.I.R. Itraconazole-Amphotericin B Antagonism in *Aspergillus fumigatus*: an E-test-Based Strategy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 44: 2915-2918.
5. Espinel-Ingroff A, Fothergill A, Ghannoum M, Manavathu E, Ostrosky-Zeichner L, Pfaller MA, Rinaldi MG, Schell W, Walsh TJ. Quality Control and Reference Guidelines for CLSI Broth Microdilution Method (M38-A Document) for Susceptibility Testing of Anidulafungin against Molds. *J Clin Microbiol* 2007; 45:2180–2182.
6. Espinel-Ingroff A, Rezusta A. E-test Method for testing susceptibilities of *Aspergillus* spp. To the New Triazoles Voriconazole and posaconazole and to Established Antifungal Agents: Comparison with NCCLS Broth Microdilution Method. *J Clin Microbiol* 2002;40:2101-2107.



7. Favre B, Leidich SD, Ghannoum MA, Ryder NS. Biochemical Mechanism Of Resistance to Terbinafine in clinical Isolotes of the Dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;41:J-1842.
8. Guarro J., Pujol I., Aguilar C., Ortopeda M. In vitro antifungal suceptibility of non dermatophytic keratinophilic fungi. (Eds). *Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi*. Revista Iberoamericana de Micología, Bilbao, Es, 2000, pp.142-147
9. Hernandez-Hernandez L. Sensibilidad antifúngica *in vitro* de aislados clínicos se *Sporothrix schenckii* en fase micelar y levaduriforme. Tesis de licenciatura. UNAM. México D.F. 2006.
10. Kane J, Summerbell R, Sigler L, Krajden S, Land G. 1997. Laboratory handbook of dermatophytes: a clinical guide and laboratory handbook of dermatophytes and other filamentous fungi from skin, hair, and nails. Star Publishing Co, Belmont.
11. Kushwaha RKS. The genus *Chrysosporium*, its physiology and biotechnological potential. (Eds). *Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi*. Revista Iberoamericana de Micología, Bilbao, Es, 2000, pp.66-76
12. Lacasa C. E, Mazuelos M. E, Espinel-Ingroff A. Pruebas estandarizadas para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos. *Rev. Iberoam. Micol* 2001;84-607:15-1 – 15- 13.
13. Leber R, Fuchsbichler S, Klobucníkova V, Schweighofer N, Pitters E, Wohlfarter K, Lederer M, Landl K, Ruckenstuhl C, Halapa I, Turnowsky F. Molecular Mechanism of Terbinafine Resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:3890-3900.



14. Leidich SD, Isham N, Leitner I, Ryder NS, Ghannoum MA. Primary Resistance to Terbinafine in a Clinical Isolate of the Dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;41:J-114.
15. Manzano-Gayosso P, Méndez-Tovar LJ, Hernández-Hernández F, López-Martínez R. La resistencia a los antifúngicos: un problema emergente en México. *Gac Med Mex* 2008;144 (en prensa).
16. Mellado E, Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL. Importancia Clínica de los mecanismos de resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002;20:523-30.
17. Méndez-Tovar LJ, Manzano-Gayosso P, Velásquez-Hernández V, Millan-Chiu B, Hernández-Hernández F, Mondragón-González R, López-Martínez R. Resistencia a compuestos azólicos de aislados clínicos de *Trichophyton* spp. *Rev Iberoam Micol* 2007;24 (en prensa)
18. Palacios-Morales YE. Sensibilidad antifúngica *in vitro* por microdilución en caldo en levaduras aisladas de pacientes. Tesis de posgrado. UNAM. México D.F. 2007.
19. Pfaller MA, Messer SA, Karlsson Å, Bolmstro A. Evaluation of the Etest Method for Determining Fluconazole Susceptibilities of 402 Clinical Yeast Isolates by Using Three Different Agar Media. *J Clin Microbiol* 1998;36:2586–2589.
20. Roilides E., Sigler L., Bibashi E., Katsifa H., Flaris N., Panteliadis C. Disseminated Infection Due a *Chrysosporium zonatum* in a Patient with Chronic Granulomatous Disease and Review of Non- *Aspergillus* Fungal Infections in patients with This Disease. *J Clin microbial* 1999; 37: 18-25.



21. Sanglard Dominique. Importancia Clínica de los mecanismos de resistencia a los antifúngicos en levaduras. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002; 20: 225-234.
22. Spiewak R. Zoophilic and geophilic fungi as cause of skin disease in farmers. *Ann Agric Environ Med* 1998;5:97-102.
23. Stebbins W. G, Krishtul A. B. S, Bottone E. J., Phelps R, Cohen Steven. Cutaneous adiaspiromycosis: a distic dermatologic entity associate with *Chrysosporium* species. 2004. *Am Acad of Dermatol*: 51; S 113- 7.
24. Te Dorsthorst DT, Verweij PE, Meis JF, Punt NC, Mouton JW, Comparison of fractional inhibitory concentration index with response surface modeling for characterization of *in vitro* interaction of antifungals against itraconazole – susceptible and resistant *Aspergillus fumigatus* isolates. *Antimicron Agents Chemother* 2002;46:702-707.
25. Vivas CRJ, Torres-Rodríguez JM. Sensibilidad de hongos micelares dematiáceos a diez antifúngicos empleando un método de difusión en agar. *Rev. Iberoam. Micol* 2001;18: 113-117.
26. Velásquez-Zavala NG. Especies de *Candida* causantes de infección de vías urinarias en pacientes diabéticos y su sensibilidad antifúngica *in vitro*. Tesis de Licenciatura. UNAM. México, D.F. 2003.
27. Wanger A, Mills K, Nelson PW, Rex JH. Comparison of Etest and National Committee for Clinical Laboratory Standards Broth Macrodilution Method for Antifungal Susceptibility Testing: Enhanced Ability To Detect Amphotericin B-Resistant *Candida* Isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:2520–2522.
28. White T.C, Marr K. A, Bowden R.A. Clinical, Cellular and Molecular Factors That Contribute to Antifungal Drug Resistance. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 382 – 402.



ANEXOS



ANEXO I. MEDIOS DE CULTIVO

Agar Lactrimel de Borelli

Componentes

- | | |
|-------------------|---------|
| ▪ Harina de arroz | 14 g |
| ▪ Leche en polvo | 14 g |
| ▪ Miel | 7 g |
| ▪ Agar | 14 g |
| ▪ Agua destilada | 1000 mL |

Preparación

- Mezclar todos los ingredientes (excepto el agar) y calentar a fuego lento durante una hora.
- La mezcla se filtra en papel filtro y se afora a 1000 mL.
- Añadir el agar y calentar todos los ingredientes para disolver el agar.
- Esterilizar la mezcla a 121 °C durante 15 minutos.
- Verter en cajas petri en campana de flujo laminar.
- Dejar enfriar y conservar en refrigeración.

Agar Sabouraud – Antibióticos

Es un medio empleado para el aislamiento de hongos patógenos. La cicloheximida inhibe el desarrollo de los hongos contaminantes y el cloranfenicol de las bacterias.

Componentes

- | | |
|-----------------------------|---------|
| ▪ Peptona | 10 g |
| ▪ Glucosa | 20 g |
| ▪ Agar – agar | 20 g |
| ▪ Cloramfenicol | 500 mg |
| ▪ Actidiona (cicloheximida) | 500 mg |
| ▪ Agua destilada | 1000 mL |

Preparación

- Disolver en agua los tres primeros ingredientes.
- Ajustar a pH de 5.6.



- Dejar reposar durante 10 minutos.
- Esterilizar durante 15 minutos a 121°C.
- Dejar enfriar a 50°C aproximadamente.
- En un ambiente estéril agregar los antibióticos.

Agar Dextrosa Sabouraud

Componentes

- | | |
|------------------|---------|
| ▪ Peptona | 10 g |
| ▪ Glucosa | 20 g |
| ▪ Agar – agar | 20 g |
| ▪ Agua destilada | 1000 mL |

Preparación

- Disuelva los ingredientes en el agua.
- Se dejan reposar durante 10 minutos.
- Ajustar a pH de 5.6.
- Se esteriliza durante 15 minutos a 121 grados.

Agar Papa Dextrosa

Componentes

- | | |
|------------------|---------|
| ▪ Pulpa de papa | 250 g |
| ▪ Glucosa | 20 g |
| ▪ Agar | 20 g |
| ▪ Agua destilada | 1000 ml |

Preparación

- Pelar la papa y cortarla en pedasos finos.
- Poner en ebullición durante 30 min.
- Filtrar a través de una gasa y reponer el volumen anterior.
- Añadir el agar y la glucosa.
- Disolver con calentamiento.
- Esterilizar durante 15 minutos a 121°C.
- Envasar la mezcla.



BCP (Bromocresol purple) sólidos de la leche, extracto de levadura + cloramfenicol, cicloheximida y gentamicina (CCG)

Componentes

Solución A

- | | |
|-----------------------------|--------|
| ▪ Sólidos de leche en polvo | 40 g |
| ▪ Morado de bromocresol | 1 mL |
| ▪ Extracto de levadura | 2 g |
| ▪ Agua destilada | 500 mL |

Solución B

- | | |
|------------------|--------|
| ▪ Agar | 15 g |
| ▪ Agua destilada | 480 mL |

Solución de antibióticos

- | | |
|--------------------------------------|-------|
| ▪ Cicloheximida (en 2 ml de acetona) | 0.1 g |
| ▪ Cloranfenicol (25 mg/mL) | 4 mL |
| ▪ Gentamicina (10 mg/ml) | 5 ml |

Preparación

Solución A

- Disolver la leche y la levadura en agua y adicionar el bromocresol.
- Mezclar y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

Solución B

- Disolver el agar y Posteriormente ambas soluciones se llevan a un temperatura aproximada de 50°C.
- Mezclar la solución A y B.
- .
- Posteriormente ambas soluciones A y B se llevan a una temperatura aproximada de 50°C.
- Mezclar la solución A y B y adicionar el concentrado de antibióticos y mezclar.
- Verter en tubos de 1 oz. en una zona aseptica.



Christensen Urea (caldo)

Componentes

Base del medio

- | | |
|------------------------|--------|
| ▪ Bacto peptona | 1 g |
| ▪ Cloruro de sodio | 5 g |
| ▪ Fosfato monopotásico | 2 g |
| ▪ Rojo de fenol | 8 ml |
| ▪ Agua destilada | 900 ml |

Solución de urea

- | | |
|------------------|--------|
| ▪ Urea | 20 g |
| ▪ Glucosa | 1 g |
| ▪ Agua destilada | 100 ml |

Preparación

- Mezclar todos los componentes de la base del medio.
- Ajustar a pH 6.9.
- Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.
- Disolver todos los componentes para la solución de urea y esterilizar por filtración de unidades filtro de 0.2µm.
- Adicionar la solución de urea a la base del medio.
- Verter en tubos y conservar en refrigeración a 4°C.

Medio con granos de arroz

Componentes

- | | |
|------------------|-------|
| ▪ Arroz | 12 g |
| ▪ Agua destilada | 40 ml |

Preparación

- Colocar 10 gramos de arroz en un frasco de 50 ml cierre hermético con el agua destilada.
- Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.
- Dejar enfriar y se conservar en refrigeración a 4°C hasta el momento de su uso.



RPMI - Líquido

Componentes

- MOPS 34.5 g en 300 mL de agua destilada
- Glucosa 0.2g en 50 mL de agua destilada
- RPMI 10.0 g en 400mL de agua destilada

Preparación.

- Preparar a temperatura ambiente, disolver cada componente en la cantidad indicada de agua destilada.
- Mezclar los tres componentes y aforar a 1000 mL.
- Mantener en agitación
- Llevar a pH 7 con perlas de NaOH, controlando el pH con un pH-metro
- Esterilizar por filtración de unidades filtro de 0.2µm.
- Colocar el filtrado en frascos de 500 mL cubiertos con papel aluminio y mantener en refrigeración a 4°C.

RPMI - Sólido

Componentes

- MOPS 34.5 g en 300 mL de agua destilada
- Glucosa 20 g en 50 mL de agua destilada
- RPMI 10 g en 150 mL de agua destilada
- Bacto agar 18g en 500 mL de agua destilada

Preparación

Solución A

- Mezclar los primeros tres componentes, disolver en las cantidades de agua correspondientes de manera individual, una vez disueltos mezclar de modo que el volumen final sea de 500 mL.
- Esterilizar por filtración de unidades filtro de 0.2µm.

Solución B

- En un matraz de aproximadamente 2000 mL disolver el agar en 500 mL de agua destilada utilizando calor.



- Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.
- Posteriormente ambas soluciones se llevan a una temperatura aproximada de 50°C.
- Mezclar la solución A y B.
- Verter en cajas petri.
- Almacenar en refrigeración a 4°C cubiertas con papel aluminio.



ANEXO II. TÉCNICAS

Técnica de microcultivo

Los medios de cultivo y tiempos de incubación son variables, dependiendo los hongos por estudiar.

Técnica tradicional

- En la base de una caja de petri de 10 cm de diámetro colocar una varilla de vidrio doblada en forma de “V” (Caballete).
- Sobre la varilla fijar un portaobjetos de 76 X 22 mm, con ayuda de cinta adhesiva y un cubre objetos de 22 X 22 mm.
- Esterilizar el material durante 15 minutos a 121°C.
- Preparar una caja de petri con el medio seleccionado de aproximadamente 5 mm de espesor.
- Cortar el medio en cuadros de 1 cm por lado con ayuda de un bisturí estéril.
- Colocar un cuadro de medio de cultivo en el centro del portaobjetos de la caja de petri.
- Inocular en cada uno de los lados del fragmento de medio una pequeña porción del hongo a estudiar.
- Se coloca el cubre objetos sobre el medio.
- Adicionar a la caja 10 mL de agua glicerinada al 10%, cuidando de no mojar el cultivo.
- Incubar en la oscuridad durante 7 a 14 días a 28°C .
- Se retira el cubre objetos y se deposita en un portaobjetos en el que previamente se ha adicionado un gota de azul de algodón.
- Retirar y desechar el fragmento de medio de cultivo del portaobjetos; se deposita una gota de azul de algodón en el centro del portaobjetos y se coloca un cubreobjetos nuevo.

Técnica de conservación en agua

Probablemente esta es la técnica más simple para la conservación de aislamientos fúngicos, se mantiene viables hasta 5 años.



Procedimiento

- En condiciones asépticas, agregar 2 mL de agua estéril a un tubo con cultivo altamente esporulado crecido en APD.
- Con una asa micológica estéril, desprender solo los conidios agar.
- Con una pipeta estéril, extraer la suspensión y depositarla en un frasco pequeño estéril marcado con el número de ingreso.
- Cerrar herméticamente el frasco y mantenerlo a temperatura ambiente.
- En cualquier momento se puede adicionar agua estéril.

Técnica de perforación en pelo

Se utiliza para la diferenciación de algunos hongos capaces de producir órganos de perforación.

Composición

- Solución de extracto de levadura al 10 % 3 mL
- Agua destilada 20 mL
- Cabellos de niños prepúber cortados en fragmentos de 1 cm

Preparación

- Mezclar la solución del extracto de levadura al 10 % con el agua destilada.
- Verter 2 mL de la solución en tubos de ensaye.
- Agregar de 5 a 10 cabellos por tubo.
- Inocular los tubos con el hongo por estudiar.
- Incubar durante 4 semanas a temperatura ambiente.
- Observar los pelos aclarados con KOH o con azul de algodón.



ANEXO III. ABREVIATURAS

ADS	Agar Dextrosa Sabouraud
AMB	Amfotericina B
APD	Agar Papa Dextrosa
CLSI	Clinical and Laboratory Standard Institute
DMSO	Dimetil Sulfoxido
DMT2	Diabetes Mellitus Tipo 2
EGC	Enfermedad granulomatosa Crónica
FLZ	Fluconazol
ITZ	Itraconazol
KTZ	Ketoconazol
MOPS	Acido Morfolino Propano Sulfónico
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standard
ODT	Onicomycosis Distrófica Total
OSD	Onicomycosis Subungueal Distal
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
TRB	Terbinafina
VRZ	Voriconazol