



39  
24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

FALLA DE ORIGEN

MANUAL TEORICO-PRACTICO DE MICOLOGIA  
MEDICA PARA LA CARRERA DE Q.F.B.  
(PRACTICAS Y ALTERNATIVAS)

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA  
P R E S E N T A :  
CAROLINA SEGUNDO ZARAGOZA

DIR. DE TESIS: Ph.D. ROBERTO ARNULFO CERVANTES OLIVARES

ASESOR: M.V.Z. ENRIQUE SALAS TELLEZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX. 1991





## **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 está 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.

## INDICE

LISTA DE FIGURAS.....	III
LISTA DE CUADROS.....	IV
INTRODUCCION.....	V
OBJETIVOS GENERALES.....	VI

PRACTICA No.	TITULO	PAGINA
1	INTRODUCCION A LA MICOLOGIA.	
	1.0 Introducción.....	2
	1.1 Clasificación.....	3
	1.2 Estructura de los hongos.....	4
	1.3 Hongos dimórficos.....	6
	1.4 Reproducción.....	6
	1.5 Clasificación de las micosis.....	8
2	COLECCION DE MUESTRAS PARA LA DEMOSTRACION Y AISLAMIENTO DE LOS HONGOS PATOGENOS.	
	2.0 Introducción.....	14
	2.1 Obtención y tratamiento de las muestras...	14
	2.2 Identificación presuntiva de hongos basada en el examen microscópico directo de las muestras clínicas.....	17
3	METODOS Y TECNICAS UTILIZADAS PARA EL TRA- TAMIENTO DE MUESTRAS REMITIDAS AL LABORATORIO DE MICOLOGIA MEDICA.	
	3.0 Introducción.....	20
	3.1 Detección. Examen del material clínico utilizando sustancias aclarantes.....	20
	3.2 Aislamiento. Cultivo.....	24
	3.3 Identificación.....	28
	3.4 Métodos Complementarios.....	37
	3.5 Histopatología.....	43
	3.6 Inmunología.....	43
4	DERMATOMICOSIS.	
	4.0 Generalidades.....	45
	4.1 Descripción de los géneros causantes de Dermatomicosis.....	46
	4.2 Diagnóstico de una infección por derma- tofitos.....	47
	4.3 Resultados.....	49

5	CANDIDA.	
	5.0 Generalidades.....	54
	5.1 Descripción del género <u>Candida</u> .....	54
	5.2 Diagnóstico de una infección por <u>Candida spp.</u> .....	54
	5.3 Resultados.....	59
6	CRYPTOCOCCUS.	
	6.0 Generalidades.....	65
	6.1 Descripción del género <u>Cryptococcus</u> .....	65
	6.2 Diagnóstico de criptococosis.....	66
	6.3 Resultados.....	71
7	HISTOPATOLOGIA.	
	7.0 Generalidades.....	75
	7.1 Métodos de tinción.....	76
	7.2 Material Histopatológico con el que cuenta el laboratorio.....	77
8	INMUNOLOGIA DE LAS MICOSIS.	
	8.0 Generalidades.....	81
	8.1 Pruebas de Inmunidad Humoral.....	83
	8.2 Pruebas de Inmunidad Celular.....	97
	8.3 Resultados.....	99
	BIBLIOGRAFIA.....	101

## LISTA DE FIGURAS

No. DE FIGURA	TITULO	PAGINA
1	Reproducción Asexual. Esporas Típicas....	11
1a	Reproducción Sexual. Esporas Típicas.....	12
2	Procedimiento Examinación directa al microscopio con KOH al 10%.....	23
3	Métodos de cultivo.....	27
4	Procedimiento Tinción con Azul de Algodón-Lactofenol.....	31-32
5	Procedimiento Tinción de Gram.....	34-36
6	Procedimiento Técnica de Microcultivo....	38-41
7	Microconidias y Macroconidias típicas de los Dermatofitos.....	51
8	Tipos de Patrones producidos en la Inmunodifusión Doble.....	89
9	Patrón de la Doble Difusión en placa.....	90
10	Procedimiento de Doble Difusión en Gel...	92
11	Fundamento Contraimmunoelectroforesis....	93
12	Patrón de perforaciones para la prueba de Contraimmunoelectroforesis.....	93
13	Fundamento de la prueba de Fijación de Complemento.....	96

## LISTA DE CUADROS

No. DE CUADRO	TITULO	PAGINA
1	Clasificación actual del Reino Fungi.....	3
2	Características de las familias de hongos patógenos.....	4
3	Identificación presuntiva de hongos basada en el examen microscópico directo de las muestras clínicas.....	18
4	Clasificación clínica de las Tiñas.....	46
5	Géneros y especies de Dermatofitos.....	47
6	Resultados de Dermatofitos.....	52
7	Especies de Candida encontradas en el hombre causantes de infección.....	54
8	Características de las especies de <u>Candida</u> más frecuentemente aisladas en muestras clínicas.....	61
9	Resultados Prueba de Tubo Germinativo y Producción de Clamidosporas.....	62
10	Resultados de Asimilación y Fermentación de Carbohidratos.....	63
11	Características de las especies de Cryptococcus más comúnmente halladas en muestras clínicas.....	73
12	Pruebas Inmunológicas comúnmente usadas en el Diagnóstico de Micosis.....	84

# INTRODUCCION

La Micología Médica es un campo fascinante dentro del estudio de la Biología, no obstante que los hongos fueron observados y descritos antes que otro tipo de microorganismos, tales como bacterias y virus estos han atraído mas la atención de los investigadores. La Micología progreso adecuadamente en el siglo XIX durante la era de Pasteur-Koch, pero con el tiempo cayo en un período de retraso. Fué entonces que con la publicación de las " Las Tiñas " por Sabouraud en 1910, el interés por la Micología resurgió. Sin embargo, el rápido desarrollo de la virología e inmunología contribuyo al decremento de la actividad en Micología Medica.

Durante la Segunda Guerra Mundial, con el incremento de movilización de individuos, las infecciones causadas por organismos micóticos empezaron a ser reconocidas más frecuentemente y más personas fueron atraídas hacia el estudio de la Micología Médica, existiendo una rápida expansión de laboratorios de Micología alrededor del mundo, dando como resultado el empleo de personal con poco ó nada de instrucción en esta área.

Los procedimientos del laboratorio clínico en Micología Diagnóstica son utilizados para la demostración y aislamiento de hongos patógenos presentes tanto en tejidos como en fluidos corporales. El diagnóstico de laboratorio, sin embargo, no puede funcionar sin el adecuado espécimen biológico, de allí que sean necesario utilizar sistemas adecuados de recepción, manejo y colección de los mismos. En general éstos, son simples y no requieren de equipo sofisticado (Campbell and Stewart, 1960).

#### PROPOSITO DEL MANUAL

Al realizar este manual se pretende, dar a conocer al Q.F.B., cuales son los muestras clínicas de donde se esperaria aislar un agente micótico involucrado en alguna enfermedad, la forma de tomar una muestra, qué procedimiento efectuar con ella y como lograr la identificación del agente micótico patógeno presente.



## **OBJETIVOS GENERALES:**

**1.- CONOCER LA DIFERENCIA ENTRE LOS DISTINTOS GRUPOS DE HONGOS, SU TAXONOMIA Y LA CLASIFICACION DE LAS ENFERMEDADES CAUSADAS POR ELLOS (MICOSIS).**

**2.- CONOCER EL TIPO DE MUESTRA, LOS METODOS Y LAS TECNICAS UTILIZADAS EN EL DIAGNOSTICO MICOLOGICO.**

# **PRACTICA 1**

## **INTRODUCCION A LA MICOLOGIA**

### **OBJETIVO:**

**EL ALUMNO CONOCERA LAS  
ESTRUCTURAS MICOTICAS MAS  
COMUNES APOYADO POR  
TECNICAS SIMPLES DEL  
LABORATORIO.**

## 1. Introducción.

Los hongos son un grupo de organismos, eucariotes que poseen núcleos organizados, cuya membrana nuclear está bien definida. Al igual que otros eucariotes, los hongos poseen mitocondrias y sistema endomembranoso (retículo endoplásmico y aparato de Golgi) (Alexopoulos, 1976). La membrana celular basal está bien organizada y contiene gran cantidad de esteroides, propiedad que los hace diferentes a otros micrororganismos, de aquí el mecanismo de acción de algunos fungistáticos como los polienos e imidazoles, que bloquean la formación de éstos y por lo tanto dejan una membrana defectuosa (Bonifaz, 1990). Se conoce, por análisis físico-químicos de la pared celular libre de citoplasma, que ésta contiene de un 80 a 90% de polisacáridos y el resto son proteínas y lípidos. Básicamente está constituida por quitina (polímeros de N-acetil glucosamina), celulosa, glucanas y mananas, compuestos que le dan rigidez y son de importancia en la taxonomía y propiedades antigénicas (Webster, 1980). Las bacterias están formadas por derivados N-acetil murámico y N-acetil neuramínico, los vegetales por celulosa y derivados, y los insectos y crustáceos por quitina (Bonifaz, 1990).

Los hongos se manifiestan de muchas maneras. Sus propiedades biológicas se extienden hacia todos los campos. Los hay altamente infecciosos o venenosos, tanto para el hombre como para los animales; otros por el contrario, constituyen la base de una gran cantidad de procesos industriales de fermentación, tales como la elaboración del pan, vino, cerveza y la preparación de algunos quesos; estos tienen gran importancia en la producción comercial de ácidos orgánicos y de algunas preparaciones vitamínicas y son responsables de la elaboración de sustancias antimicrobianas o antifúngicas. Un cuarto grupo, en cambio, se caracteriza por dañar la materia orgánica (alimentos, tejidos, cuero y otros artículos). Por último unos pocos se emplean como alimento (García y Córdoba, 1989).

## 1.1 CLASIFICACION

La clasificación taxonómica actual del reino Fungi de acuerdo a las reglas internacionales es la siguiente:

CUADRO 1. CLASIFICACION ACTUAL DEL REINO FUNGI

REINO	FAMILIA	CLASES
FUNGI	I. Mastigomycota	Chytridiomycetes Hyphochytridiomycetes Oomycetes
	II. Zygomycota	Zygomycetes Trichomycetes
	III. Ascomycota	Hemiascomycetes Loculoascomycetes Plectomycetes Laboulbeniomycetes Pyrenomycetes Discomycetes
	IV. Basidiomycota	Telionycetes Hymenomycetes Gasteromycetes
	V. Deuteromycota	Blastomycetes Hyphomycetes Coelomycetes
	VI. Mycophycophyta	Líquenes: Ascomycetes asociados con algas. Basidiomycetes asociados con algas. Deuteromycetes asociados con algas.

(Chandler et al., 1980), (Webster, 1980).

CUADRO 2. CARACTERISTICAS DE LAS FAMILIAS DE HONGOS PATOGENOS

FAMILIA	CARACTERISTICAS BASICAS
I. <u>Mastigomycota</u>	Hongos con micelios no septado. La reproducción asexual por medio de esporangios. Esporas sexuales como zoosporas.
II. <u>Zygomycota</u>	Hongos con micelio septado esparcido. Reproducción asexual por medio de esporangios. Esporas sexuales como zigosporas. (Homotalicos o heterotalicos).
III. <u>Ascomycota</u>	Unicelulares o filamentosos, con micelio septado. Reproducción por medio de una variedad de conidioforos. Reproducción sexual por medio de ascosporas dentro del asca.
IV. <u>Basidiomycota</u>	Unicelulares o filamentosos, con micelio septado, con conexiones de clamp. Reproducción asexual por conidias. Reproducción sexual por medio de basidiosporas típicas.
V. <u>Deuteromycota</u>	Unicelulares o filamentosos con micelio septado. Reproducción asexual usada como base para su clasificación e identificación; productores de conidia. Reproducción sexual usualmente ausente, pero cuando es encontrada, es típica de Ascomycetes o Basidiomycetes.

(Chandler et al., 1980), (Webster, 1980).

1.2 ESTRUCTURA DE LOS HONGOS

Cuando se cultivan en medios adecuados, muchos hongos producen filamentos largos y ramificantes. Cada filamento se denomina hifa. Las hifas pueden dividirse por su origen en dos:

- a) Hifas verdaderas. Son propias de los hongos mohos o filamentosos y se forman a partir de la germinación de una conidia o espora.

b) Pseudohifas, Son propias de los hongos levaduriformes y se forman a partir de gemaciones (blastosporas); éstas no se desprenden de la célula madre y posteriormente sufren elongaciones, hasta dar origen a una estructura similar a la hifa verdadera, regularmente se forman cuando el medio nutricional es pobre o tenso, por ejemplo al parasitar.

A medida que las hifas continúan creciendo y ramificándose, se produce un crecimiento enmarañado denominado micelio.

Por su función el micelio se divide en dos:

a) Micelio reproductivo o aéreo, es el que se encarga de soportar las estructuras y formas de reproducción y se forma por arriba de la superficie del sustrato empleado en el crecimiento del hongo.

b) Micelio vegetativo o de nutrición, se encarga de la absorción y transformación de los nutrientes, penetrando al interior del sustrato (Jawetz 1987 y Bonifaz, 1990).

Por su forma el micelio se clasifica en:

-Filamentoso: propio de los hongos mohos o filamentosos.

- Unicelular: propio de las levaduras

Por el diámetro de la hifa se divide en:

- Micelio macrosifonado, es aquél que tiene un diámetro mayor a una micra, lo presentan la mayor parte de hongos filamentosos.

- Micelio microsifonado, es aquél que tiene un diámetro menor a una micra y es característico de los actinomicetos.  
De acuerdo a la ausencia o presencia de pigmento:

- Micelio hialino, es aquél que carece de pigmento.

- Micelio pigmentado, es aquél que posee pigmento, sobre todo del tipo melánico y esto lo presentan los hongos dematiáceos o fuliginosos. Otros hongos pueden presentar pigmentos carotenoides (Bonifaz, 1990).

### 1.3 HONGOS DIMORFICOS

El dimorfismo es la capacidad de algunas especies de hongos de desarrollarse en dos formas, según las condiciones ambientales: como filamento cuando se incuban a una temperatura de 25 a 30°C y como levadura, cuando se incuban de 35 a 37°C. No se ha establecido claramente si existe o no una relación causal entre dimorfismo y patogenicidad, sin embargo, los siguientes hongos dimórficos son todos de evidente patogenicidad para el hombre:

Candida spp.

Paracoccidioides dermatitidis

Paracoccidioides brasiliensis

Histoplasma capsulatum

Coccidioides immitis

Sporothrix schenckii

Debido que actualmente se recomienda que los cultivos fúngicos primarios sean incubados sólo de 25 a 30°C, la forma que primero se aísla en el laboratorio es la de filamento. En los hongos dimórficos, es la forma de levadura la que provoca enfermedad en el hombre. Sólo en raras ocasiones se encuentra la forma de filamento en los tejidos humanos. Es posible un diagnóstico presuntivo inmediato de enfermedad causada por un hongo patógeno dimórfico observando levaduras en el examen directo del material infectado. La forma de filamento, en cambio, es la que infecta al hombre y la enfermedad suele contraerse por inhalación de esporos aerotransportados (Koneman et al., 1983).

### 1.4 REPRODUCCION

Se entiende por reproducción la formación de nuevos individuos que tienen todas las características típicas de la especie. Se conocen dos tipos generales de reproducción: asexual y sexual. La reproducción asexual, a veces llamada somática o vegetativa, no incluye la unión de núcleos, células sexuales u órganos sexuales. La reproducción sexual, en cambio, está caracterizada por la unión de dos núcleos. En la formación de los órganos reproductores, ya sean sexuales o asexuales, todo el talo puede convertirse en una o más estructuras reproductoras de tal modo que la fase somática y la fase reproductora nunca se pueden presentar juntas en el mismo individuo.

## 1) Reproducción asexual

Típicamente los hongos se reproducen tanto sexual como asexualmente. En general, la reproducción asexual es más importante para la propagación de la especie, ya que origina la producción de numerosos individuos, particularmente porque el ciclo asexual por lo común se repite varias veces al año, en tanto que el estado sexual de muchos hongos se presenta anualmente. La forma más común de reproducción asexual que presentan los hongos es por medio de esporas. Las esporas varían de color desde hialinas (incolores) a verdes, amarillas, anaranjadas, rojas, castañas y hasta negras; en tamaño, de pequeñas a grandes; en forma desde globosas hasta ovales, oblongas, aciculares hasta helicoidales; en número de células, desde una a muchas; en la disposición de las células; y en el modo como nacen las esporas. Figura 1.

Esta infinita variedad de esporas hace el estudio de los hongos particularmente interesante. En tanto que algunos hongos producen solamente un tipo de esporas, otros dan hasta cuatro tipos. Las esporas asexualmente formadas pueden estar contenidas en esporangios y entonces se llaman esporangiosporas, o se producen diversos modos en las extremidades o a los lados de las hifas, y entonces se denominan conidias. Cuando no se conoce ninguna etapa sexual, la clasificación está basada en el desarrollo morfológico de conidias, dándose nombres especializados a cada forma de desarrollo de los mismos. Cuando más de una clase de conidias es producida dentro de una colonia determinada, las pequeñas conidias unicelulares son llamadas microconidias, y los grandes, a menudo conidias multicelulares, son denominados macroconidias.

Las siguientes esporas representan 3 de los tipos más comunes de conidias:

a. Blastosporas (blastoconidia): una simple estructura se desarrolla por gemación, con la separación subsiguiente de la yema de la célula progenitora (por ejemplo, en las levaduras).

b. Clamidosporas (Clamidoconidia): células terminadas o intercaladas en una hifa crecen y desarrollan paredes gruesas. Estas estructuras son resistentes a condiciones ambientales desfavorables y germinan cuando las condiciones se vuelven más favorables para el desarrollo vegetativo.



c. Artrósporas (Arthroconidia): las estructuras resultan de una hifa que se fragmenta en células individuales (Alexopoulos 1976 y Jawetz, 1987).

## 2) Reproducción Sexual.

Este tipo de reproducción se lleva a cabo por tres procesos: plasmogamia, fusión nuclear o cariogamia y meiosis. Para tener un verdadero ciclo sexual estos tres procesos se presentan en una secuencia regular y generalmente en estadios determinados.

Los hongos para su reproducción sexual pueden ser Heterotálicos, es decir que en una misma especie, los sexos (+ y -) se presentan en talos separados, de modo que se requiere de dos talos diferentes. Los Homotálicos se refieren a los hongos cuya reproducción perfecta necesita de un solo talo (Bonifaz, 1990).

Las esporas sexuales (Figura 1a) que se presentan son las siguientes:

a. Zigosporas: En ciertos zigomicetos, se fusionan las puntas de las hifas cercanas, ocurre la meiosis y se desarrollan zigosporas grandes, de pared gruesa.

b. Ascosporas: Se forman, por lo general, 4-8 esporas dentro de una célula especializada llamada asca, en la cual se ha llevado a cabo la meiosis.

c. Basidiosporas: Después de la meiosis, por lo general, se forman 4 esporas sobre la superficie de una célula especializada llamada basidia (Jawetz, 1987).

## 1.5 CLASIFICACION DE LAS MICOSIS

En el campo de la Micología Médica se hizo necesario el clasificar las enfermedades producidas por los hongos (micosis) en el hombre, para explicar la sintomatología y epidemiología producidas por ellos.

Actualmente la clasificación más aceptada de las micosis, es la realizada por el Dr. González Ochoa (Manual de Micología Médica, IPN, 1975) la cual se basa en dos puntos principalmente:

- 1) Lugar por el que penetran los hongos y,
- 2) Punto de vista de un médico dermatólogo.

Asimismo enuncia las premisas de la Micología Médica siendo:  
 a) existe una reducción de formas al estado parasitario, b) complicación en las formas al estado saprofito, las cuales tienen estrecha relación con los hongos dimórficos y, c) existencia de una pluralidad etiológica, es decir, que una misma micosis puede ser causada por diferentes géneros de hongos.

#### A. Micosis Exclusivamente Tegumentarias.

Estas micosis son producidas por hongos que se desarrollan sólo en estructuras superficiales de la piel y áreas queratinizadas, por ejemplo: pelos, piel, uñas.

#### B. Micosis Inicialmente Tegumentarias.

Estas micosis son ocasionadas por hongos que penetran por el tegumento y luego se van a localizar a tejidos profundos.

#### C. Micosis Secundariamente Tegumentarias.

En estas micosis los hongos penetran por otra vía que no sea la piel. Producen lesiones internas importantes y finalmente van a ocasionar lesiones en la piel o mucosas externas.

#### D. Micosis oportunistas raras.

Los hongos casuales de Micosis Secundariamente Tegumentarias, son virtualmente siempre patógenos y capaces de producir en potencia una enfermedad grave o que ponga en peligro la vida del paciente. Los agentes micóticos como Aspergillus fumigatus, miembros de los géneros Zygomycetes, y Candida, antiguamente considerados en el laboratorio como contaminantes de escasa importancia clínica, son ahora conocidos como causantes de enfermedad diseminada y aún fatal en el huésped sometido a inmunosupresión. Otros hongos ambientales como Scedosporium, Fusarium y Cladosporium, anteriormente no reconocidos como causales de enfermedad, son considerados ahora los agentes etiológicos de casos ocasionales de endocarditis, queratitis micótica y otras infecciones localizadas, o los responsables de enfermedades broncopulmonares alérgicas. Algunas de estas especies producen también aflatoxinas, que pueden provocar trastornos gastrointestinales o manifestaciones neurológicas al ser ingeridas por hombres y animales.

De lo anterior podemos observar la necesidad de un diagnóstico adecuado de las micosis, el cual puede tener sus orígenes en tres áreas principales:

- a) En un consultorio clínico.
- b) En un laboratorio de Anatomía y Patología, y/o
- c) En el laboratorio de Micología Médica, siendo este último el ámbito en el cual se puede efectuar el diagnóstico real del agente etiológico de la enfermedad fungal. Los datos iniciales que lleven a detectar una enfermedad micótica en un paciente dependen del reconocimiento de signos y/o síntomas específicos y de la información obtenida en la historia clínica.

Un diagnóstico presuntivo, puede resultar con la observación microscópica directa del material infectado, el diagnóstico definitivo se llevará a cabo, cuando se realice el aislamiento e identificación del agente causal de la micosis (Konezan et al., 1983).

Figura 1. Reproduccion Asexual. Esporas típicas.

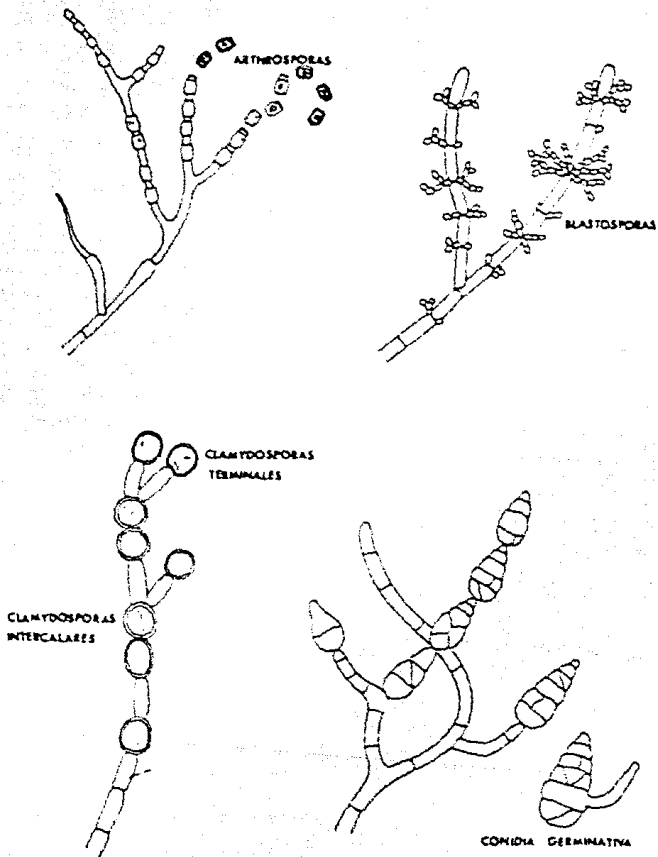
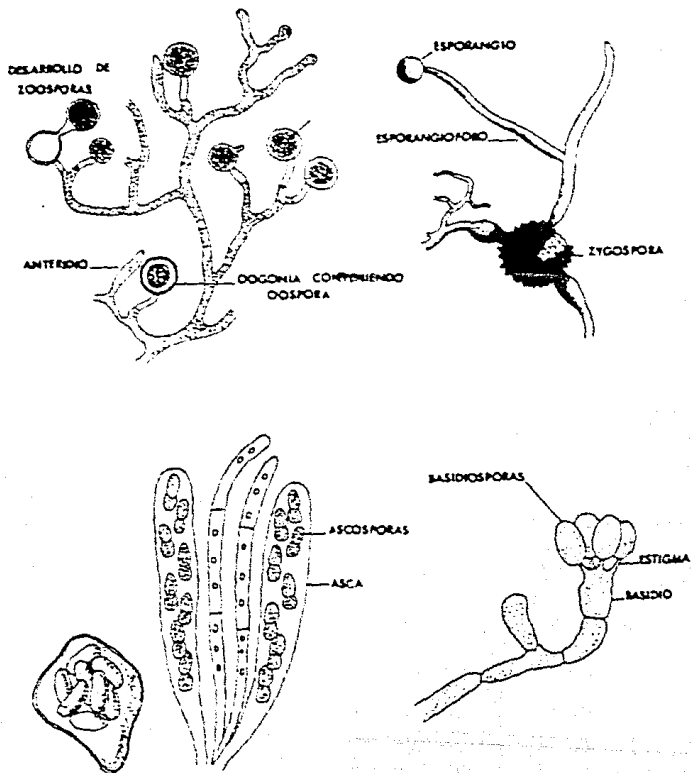


Figura 1a. Reproduccion Sexual. Esporas tipicas.



## **PRACTICA 2**

# **COLECCION DE MUESTRAS PARA LA DEMOSTRACION Y AISLAMIENTO DE LOS HONGOS PATOGENOS.**

### **OBJETIVO:**

**EL ALUMNO SE ADIESTRARA EN EL  
MANEJO DE MUESTRAS CLINICAS,  
PARA SU ESTUDIO DESDE EL PUNTO  
DE VISTA DEL LABORATORIO DE  
MICOLOGIA MEDICA.**

## 2. Introducción.

Los procedimientos de diagnóstico en Micología Médica están encaminados directamente a la demostración y aislamiento de hongos patógenos presentes en los tejidos y líquidos corporales.

El diagnóstico de laboratorio, por lo tanto, no puede realizarse correctamente si las muestras clínicas remitidas al mismo no son las recomendables ó fueron obtenidas sin tomar las medidas adecuadas. Para el diagnóstico de micosis, deben remitirse al laboratorio diversas muestras, según el tipo de infección y la región afectada.

### 2.1 Obtención y Tratamiento de las muestras.

#### a) Escamas de piel.

Al obtener muestras de fuentes cutáneas, se recomienda pasar por el área elegida un algodón con alcohol al 70%, a fin de eliminar contaminantes bacterianos. Posteriormente la lesión se descama con un bisturí. Si la lesión se encuentra inflamada ó con fisuras, la limpieza debe efectuarse con una gasa empapada en agua estéril y no con alcohol.

En el caso de Pityriasis versicolor la descamación es tan fina que la muestra debe obtenerse mediante el raspado de la piel por un portaobjetos y recibiéndolo en otro portaobjetos limpio (Koneman et al., 1983).

#### b) Raspado de uñas.

i) Uñas de las manos. Se limpia la uña con una esponja con alcohol y se pone la yema del dedo infectado sobre una margen de un portaobjetos limpio o dentro de la superficie de una caja de petri limpia, se procede a raspar la uña con una navaja limpia yendo de la parte proximal a la distal, hasta obtener la cantidad de material adecuado para cultivos y estudio microscópico. Si mas de una uña debe ser raspada, use una navaja de bisturí limpia para cada una.

ii) Uñas de los pies. Limpiar la uña de la misma forma indicada en el inciso i. La persona que tome la muestra debe sentarse en una silla enfrente del paciente, quien debe acomodar el talón del pie sobre la rodilla de la persona que le va a tomar la muestra. Esto permite una posición cómoda y ventajosa para raspar la uña. El procedimiento de raspado es el mismo que para el de las uñas de las manos (Manual de Micología. I.P.N. 1975).

Las muestras de uñas infectadas deben recogerse por debajo de éstas para obtener material blando de la base. Si esto no es posible, se debe raspar la superficie de la uña con un bisturí a fin de obtener un material de partes más profundas. donde es más probable hallar organismos infectivos (Koneman et al., 1963).

Para este tipo de muestras (escamas de piel y uñas), se recomienda lo siguiente:

- Examen directo con solución de Hidróxido de potasio (KOH) al 10 %.

- Cultivo.

a) Agar Dextrosa Sabouraud.

b) Medio Selectivo con antibióticos y ciclohexamida. Pej. Agar Micobiotico.

- Se efectúa un Microcultivo según Ridell para la identificación del género y la especie correspondiente.

- En las lesiones sospechosas de infección por Candida albicans se deberá realizar un frotis y se procederá a teñir por tinción de Gram, el resto de la muestra se inocula en una placa de Agar Dextrosa Sabouraud.

c) Pelo.

Inicialmente debe examinarse la piel cabelluda del paciente y cualquier cabello que esté quebrado debe ser depilado con pinzas. Los cabellos están flojos en el folículo y pueden ser fácilmente removidos.

Cuando el paciente es un niño que no puede resistir la depilación de los cabellos con pinzas, se pone un pedazo de cinta adhesiva sobre la lesión y después se quita quedando los cabellos parasitados adheridos. En el caso de Piedra Negra y Piedra Blanca en las que los cabellos no están afectados en su raíz, el material se obtiene cortando con tijeras algunos cabellos parasitados.

Puede realizarse un examen directo del pelo, en el sujeto, empleando la lámpara de Wood. Los pelos infectados por Microsporun generalmente fluorescen de un color verde amarillento. Debe tomarse en cuenta que el diagnóstico de las tiñas empleando este procedimiento no es muy confiable, ya



que sólo un número limitado de dermatofitos producen el material que da dicha fluorescencia cuando es expuesto a la luz ultravioleta. El uso de la lámpara de Wood es un método de escrutinio para la búsqueda de portadores asintomáticos.

- El examen en fresco de los pelos se realiza utilizando la técnica del KOH, donde se puede diferenciar la forma endotrix y la ectotrix de parasitismo, en la primera se pueden observar abundantes esporas redondas dentro del pelo y en la segunda fuera de éste, rodeándolo, a manera de funda, se debe reportar este tipo de parasitismo ya que esto tiene significado epidemiológico.

- Otra parte de la muestra se inocula en Agar Micobiotico y Agar Dextrosa Sabouraud por medio de la técnica de puntos aislados.

#### d) Pus y Exudados.

Se sugiere que este tipo de muestras sean remitidas en recipientes estériles para efectuar la inculación de medios de cultivo.

El examen de estas muestras se realiza en forma directa ó bien se pueden agregar 1 ó 2 gotas de KOH al 10% para aclarar la preparación. Puede observarse, dependiendo del tipo de micosis: tubos germinativos, células grandes conteniendo endoesporas ó bien gránulos.

Los frotis de pus se deben teñir por tinción de Gram para demostrar fragmentos de hifas, pseudomicelios, los cuales tienen afinidad por el colorante básico. Los gránulos pueden ser tratados por el método de ácido resistentes modificado para Actinomicetos.

#### e) Líquido cefalorraquídeo (LCR).

El líquido obtenido en tubos ó jeringas estériles es centrifugado a 2000-2500 rpm., durante 15 minutos, y el sedimento se observa al microscopio, donde pueden aparecer células ovaladas ó tubulares; otra parte del sedimento se tiñe para demostración de cápsula, cuando se sospecha de infección por Cryptococcus neoformans, utilizando la técnica de la tinta china ó la tinción de nigrosina.

El sedimento puede teñirse por el método de Gram y también por el método de ácido resistentes, en el caso de infecciones por Actinomicetos.

f) Esputo.

Los frotis de esputo, son tratados de manera similar a los de pus y exudados. La tinción de Gram es útil para demostrar hifas de Actinomyces, células levaduriformes de Candida albicans, y artrosporas, la tinción de ácido resistentes, nos ayuda a identificar el género Nocardia; si se sospecha de infección por Cryptococcus, puede utilizarse el método de la tinta china. La observación con KOH 10% es fundamental en el caso de aspergillosis o candidosis pulmonares.

g) Médula Osea y Sangre.

Los frotis realizados con este tipo de material, son teñidos con los colorantes de Giemsa y Wright para detectar los casos agudos de Histoplasmosis. Las muestras provenientes de jeringas, son inoculadas directamente en medios de cultivo.

h) Material de Biopsia y Necropsia.

El material obtenido por biopsia ó durante la necropsia, puede ser fijado en formalina amortiguada al 10% para ser procesado por técnicas de Histopatología para la observación del agente y de los cambios microscópicos generados en los tejidos del paciente; o bien puede ser colectado en recipientes estériles para proceder al aislamiento del agente por medio de siembra en medio de cultivo.

Las muestras de los incisos d), e), f), g), h), al ser recibidas en el laboratorio, se deben sembrar en los medios de cultivos recomendados, tales como: Agar Dextrosa Sabouraud, Agar Micobiotico y Agar de Infusión-Cerebro-Corazón (Ajello et al., 1975).

**2.2 Identificación presuntiva de hongos basada en el examen microscópico directo de las muestras clínicas (Cuadro 3).**

CUADRO 3. IDENTIFICACION PRESUNTIVA DE HONGOS BASADA EN EL EXAMEN MICROSCOPICO DIRECTO DE LAS MUESTRAS CLINICAS

OBSERVACIONES MICROSCOPICAS DIRECTAS	IDENTIFICACION PRESUNTIVA
<p>Hifas relativamente pequeñas (6-10 <math>\mu</math>), tamaño regular, ramificación dicotómica en ángulo de 45 grados, septos transversales nitidos.</p>	<p><u>Aspergillus spp.</u></p>
<p>Hifas de tamaño irregular, de 6 a 50 <math>\mu</math>, aspecto de cintas septos.</p>	<p><u>Zygomycetes (Zygomycetes)</u> <u>Rhizopus, Mucor, Absidia</u></p>
<p>Hifas pequeñas (2-3 <math>\mu</math>), regulares, algunas ramificadas, a veces con artrosporas; se observan solo en piel, uñas y pelos.</p>	<p><u>Dermatofitos:</u> <u>Micrsporum spp.</u> <u>Trichophyton spp.</u> <u>Epidermophyton spp.</u></p>
<p>Delicados filamentos ramificados (1- o menos de diámetro), a menudo contenidos en (gránulos de azul); Gram positivos. Las especies de Noctardia son parcialmente acidorresistentes.</p>	<p><u>Actinomicetos:</u> <u>Actinomyces spp.</u> <u>Noctardia spp.</u> <u>Streptomyces spp.</u></p>
<p>Hifas, puntos de constricción nitidos, pseudohifas, suelen verse células levaduriformes en gemación (biastosporas).</p>	<p><u>Candida spp.</u></p>
<p>Células levaduriformes esféricas de tamaño irregular (6-15 <math>\mu</math>), con clara capsula gruesa de polisacáridos (no todas las células son capsuladas), con una o más yemas unidas por una constricción estrecha.</p>	<p><u>Cryptococcus neoformans</u> <u>Cryptococcus, especies no capsuladas</u></p>
<p>Células levaduriformes grandes (8-15 <math>\mu</math>), con paredes gruesas de doble contorno, con una única yema unida por una base ancha.</p>	<p><u>Blastomyces dermatitidis</u></p>
<p>Esterulas grandes, de tamaño irregular (10-50 <math>\mu</math>), de paredes gruesas, muchas contienen endosporas pequeñas (2-4 <math>\mu</math>) y redondas.</p>	<p><u>Coccidioides immitis</u></p>
<p>Microconidias largas (6-14 <math>\mu</math>) de diámetro, paredes gruesas y cubiertas con protuberancias digitales que varían en su largo y diámetro.</p>	<p><u>Histoplasma capsulatum</u></p>
<p>Hifas septadas, de consistencia hialina, producción de clamidosporas.</p>	<p><u>Paracoccidioides brasiliensis</u></p>

**PRACTICA 3  
METODOS Y TECNICAS  
UTILIZADAS PARA EL  
TRATAMIENTO DE  
MUESTRAS REMITIDAS AL  
LABORATORIO DE  
MICOLOGIA MEDICA.**

**OBJETIVO :  
EL ALUMNO CONOCERA LOS  
METODOS Y TECNICAS UTILIZADAS  
EN EL DIAGNOSTICO MICOLOGICO.**

### 3. Introducción.

Para lograr un adecuado manejo de las muestras en un laboratorio, el área de trabajo debe desinfectarse para evitar contaminación en las siembras a realizar.

El procesamiento de las muestras incluye generalmente tres pasos principales y algunos métodos complementarios:

#### 3.1 Detección. Examen del material clínico utilizando sustancias aclarantes este puede ser efectuado:

- KOH al 10%
- NaOH al 10%
- Aclarante de Amman
- Lactofenol
- Examen directo al microscopio. KOH al 10%.

La digestión de KOH por otros elementos celulares es más rápida que en los hongos, de este modo el aclaramiento del espécimen ó elemento fungal es mas visible (Campbell y Stewart, 1980).

#### Reactivos:

Hidróxido de Potasio (KOH)	10 g
Agua destilada	cbp 100 ml

#### Procedimiento:

- Adicionar hidróxido de potasio al agua destilada lentamente y con agitación.
- Mezclar y agitar hasta la completa disolución de los cristales (Laskin y Lechevalier, 1963).

Dentro de los procedimientos de laboratorio para establecer un diagnóstico presuntivo de las micosis, el método más sencillo consiste en realizar un examen directo de la muestra sobre un portaobjetos utilizando una solución aclaradora de hidróxido de potasio al 10%. Si a la observación microscópica, el resultado es negativo, no se debe descartar la posibilidad de que exista una infección micótica (García y Córdoba, 1988).

Este método es rápido y confiable para el diagnóstico de las Tiñas, cuando se examinan muestras de pelo ó raspados cutáneos.

En el examen microscópico del material biológico, pueden identificarse los filamentos de los dermatofitos que pueden ser largos, cortos, ramificados, fragmentados y de un diámetro regular de tres micras, es importante el saber diferenciarlos de filamentos de hongos contaminantes ó de artefactos diversos (García y Córdoba, 1988).

El material debe examinarse primero con el objetivo seco débil (10X) para enfocar la muestra y el posible agente micótico, posteriormente se realiza la observación con el objetivo seco fuerte (40X) para verificar el resultado de la presencia de estructuras fungales en la muestra (Figura 2). Con frecuencia se pueden encontrar más esporas que hifas, las cuales se pueden localizar en forma ectotrix o endotrix (García y Córdoba, 1988).

#### Precauciones:

- Debe tenerse cuidado en no colocar una cantidad excesiva de muestra (pelo, escamas ó exudados) sobre el portaobjetos, ya que esto puede impedir la observación de los elementos fungales.

- Existen algunas muestras que en ocasiones no permiten la observación clara del elemento fungal, por lo que se recomienda que el material permanezca en el KOH durante toda la noche, colocando las preparaciones en una cámara húmeda

- Si se utiliza KOH con glicerina en igual proporción (1:1), se pueden lograr preparaciones que duren un poco más de tiempo (García y Córdoba, 1988).

#### Interpretación de la técnica:

Positivo: elemento fungal puede verse claramente.

Negativo: elemento fungal no se ve  
(Campbell and Stewart, 1980).

- Técnica NaOH al 10%. Principio, técnica e interpretación igual a KOH al 10%.

- Aclarante de Amman

Hidrato de cloral	2 partes
Fenol	1 parte
Acido láctico	1 parte

- Lactofenol	
Fenol	20 gms.
Acido láctico	20 ml
Glicerina	40 ml
Agua destilada	20 ml

Disolver en los 20 ml de agua el fenol en baño María, agregar el ácido láctico y la glicerina.

23

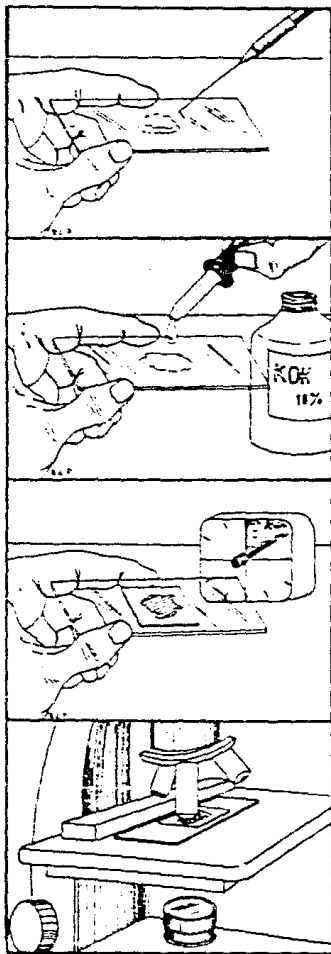
## FIG. 2. PROCEDIMIENTO EXAMEN DIRECTO AL MICROSCOPIO CON KOH AL 10%.

1. FRENTE AL MECHERO Y SOBRE UN PORTAOBJETOS, SE DEPOSITA UNA PEQUEÑA CANTIDAD DE PELOS Y/O ESCAMAS, RASPADAS DE LA PERIFERIA DE LA LESION.

2. SE AGREGAN 2 O 3 GOTAS DE UNA SOLUCION DE HIDROXIDO DE POTASIO (KOH) AL 10% Y SE COLOCA UN CUBREOBJETOS.

3. SE DEJA EN REPOSO LA PREPARACION POR 10 O 15 MINUTOS.

4. OBSERVAR AL MICROSCOPIO CON EL OBJETIVO SECO FUERTE (40X) PARA LA IDENTIFICACION DE ESTRUCTURAS.





## 3.2

## Aislamiento.

## Cultivo

## Medios de cultivo:

- Agar Dextrosa Sabouraud (SDA)
- Agar Micobiotico
- Agar Dextrosa Papa (PDA)
- Agar Nutritivo

**Agar Sabouraud Dextrosa. (SDA). Cultivo y Conservación de Hongos.**

El SDA se recomienda para el cultivo y conservación de Hongos. Es un medio que ha sido extensamente usado para aislamiento de hongos y para propósitos generales en trabajos de Micología.

Formula aproximada en gramos por litro:

Mezcla de peptonas	10
Dextrosa	40
Agar	15
pH final 5.6 +/- 0.2	

## Preparación:

Suspender 65 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Remojar de 10 a 15 minutos. Mezclar bien hasta que se obtenga una suspensión uniforme. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante un minuto. Distribuir y esterilizar a 118-121°C (no más de 15 lb de presión) durante 15 minutos.

## Usos:

Puede emplearse para el aislamiento, identificación y conservación de hongos patógenos y saprófitos. Cuando los materiales en estudio están altamente contaminados, el aislamiento mejora si se añaden al medio sustancias antimicrobianas (Manual Bioxon).

**Agar Micobiotico.** Para el cultivo y aislamiento de Hongos patógenos.

El agar Micobiotico es un medio para cultivar selectivamente a los hongos patógenos a partir de muestras clínicas diversas y de otros materiales contaminados con una flora mixta asociada. Básicamente está constituido como un agar

Sabouraud, al cual se le han añadido los antibióticos Cloranfenicol que abate el desarrollo bacteriano y Ciclohexamida que retrasa el crecimiento de hongos sensibles a ella.

Formula en gramos por litro:

Peptona de soya	10
Dextrosa	10
Agar	15.5
Ciclohexamida (actidiona)	0.4
Cicranfenicol	0.05
pH final 6.9 más menos 0.2	

Preparación:

Suspender 36 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada de buena calidad. Mezclar cuidadosamente y dejarlo en reposo para que se hidrate correctamente el agar. Esterilizar a 121°C , 15 lb de presión por 15 minutos. Distribuir en cajas de Petri o en tubos de ensaye, con tapa de resca, de 20 X 250 mm y dejarlos solidificar en posición inclinada. No sobrecalentar nunca.

El agar Micobiótico es relativamente estable y puede conservarse bien en refrigeración durante varias semanas.

Usos:

El agar Micobiótico es útil para aislar hongos patógenos sa partir de diversos tipos de muestras altamente contaminadas con diferentes tipos de flora acompañante, como son los cabellos, raspados de piel, uñas, lavados bronquiales, gástricos, etc.

Los dermatofitos se desarrollan con mayor rapidez en el agar Micobiótico en comparación con otros géneros de hongos (Manual Bioxon).

**Agar de Dextrosa y Papa** (Cultivo e identificación de hongos y levaduras).

Es un medio empleado en cultivos e identificación de hongos (principalmente dematiaceos) y levaduras.

Formula en gramos por litro:

Infusión de papa	200
Dextrosa	20
Agar	15
pH final 5.6 más menos 0.2	

Preparación:

Suspender 39 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Remojar de 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante un minuto. Esterilizar a 121°C, 15 lb de presión por 15 minutos. Una vez esterilizado enfriar a unos 40-45°C y vaciar en cajas Petri.

Usos:

Puede usarse en la identificación de hongos y levaduras de acuerdo con su morfología celular o en métodos de microcultivo en portaobjetos (Manual Bioxon).

**Agar Nutritivo**

El agar Nutritivo es un medio de uso general en el laboratorio, no selectivo y adecuado para el cultivo de microorganismos poco exigentes.

Formula en gramos por litro:

Peptona de gelatina	5.0
Extracto de carne de res	3.0
Agar	15.0
pH final 6.8	

Preparación:

Suspender 23 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Remojar unos 15 minutos, mezclar y calentar a ebullición de 1 a 2 minutos hasta disolver el producto. Distribuir y esterilizar a 121°C, 15 lb de presión por 15 minutos.

Usos:

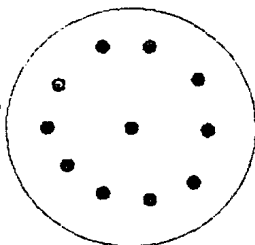
Empleado en la multiplicación de microorganismos en general; en las pruebas de sensibilidad y resistencia (Manual Bioxon).

Métodos de cultivo utilizados para sembrar en estos medios (Figura 3).

## FIGURA 3. METODOS DE CULTIVO

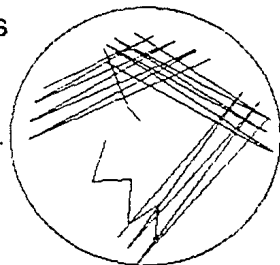
### 1. TECNICA DE PUNTOS AISLADOS

SOBRE UNA CAJA DE PETRI CON AGAR SDA O MIC, SE COLOCA LA MUESTRA PROVENIENTE DE UNA, PELO Y/O ESCAMAS. MEDIANTE EL ASA MICROLOGICA EN FORMA DE L, SE DEPOSITA LA MUESTRA EN AGAR DE MANERA QUE QUEDEN SEPARADAS UNA DE OTRA PARA FAVORECER SU CRECIMIENTO. EN UNA CAJA DE PETRI SE RECOMIENDA COMO MAXIMO LA SIEMBRA DE 10 PUNTOS AISLADOS.



### 2. TECNICA POR ESTRIA CONTINUA (UTILIZADO EN MUESTRAS, TALES COMO PUS Y EXUDADOS).

CON UN ASA DE INOCULACION ESTERILIZADA, SE COLOCA UNA GOTTA DEL MATERIAL CERCA DEL BORDE DE LA PLACA Y SE REALIZA UNA ESTRIA INICIAL. SE ESTERILIZA EL ASA EN LA FLAMA Y SE DEJA ENFRIAR. DISTRIBUIR LA MUESTRA EN LA PLACA EN ESTRIAS DE LA FORMA QUE SE INDICA EN LA FIGURA PRESIONANDO LIGERAMENTE SIN ROMPER EL AGAR. A PARTIR DEL EXTREMO DE LA PRIMERA ESTRIA, SE REALIZA UNA SEGUNDA Y ASI SUCESIVAMENTE HASTA COMPLETAR LAS CUATRO ESTRIAS. AL CONCLUIR, ESTERILIZAR EL ASA NUEVAMENTE, EVITANDO CON ESTO POSIBLES CONTAMINACIONES A OTROS MEDIOS.



### 3.3 Identificación.

#### Morfología Macroscópica

Las características generales que nos permiten realizar una identificación preliminar de los hongos en cultivo las podemos agrupar en:

A) Morfología colonial: es importante observar para todos los tipos de crecimiento:

- Aspecto de la colonia
- Morfología general (plana, agrupada, con pliegues regulares o irregulares).
- Textura: levaduriforme, pulverulenta, granular, vellosa o algodonosa.
- Tiempo de crecimiento o desarrollo.
- Pigmentación y la difusión del pigmento al reverso de la colonia.

B) Tipos de Micelio:

<u>Unicelular</u>	<u>Filamentoso</u>
Pseudomicelio	Macrosifonado
Pigmentado	Microsifonado
Hialino	Cenocítico
	Septado
	Hialino

Las características macroscópicas de las colonias y la pigmentación son medios útiles para la identificación, pero en la identificación final se hace necesario el desarrollo pleno de todas sus estructuras para así realizar una apreciación exacta de ellas.

Ya que el estudio de la morfología de las esporas y las relaciones espора-micelio son necesarias para la identificación final del hongo, los micólogos en ocasiones suplementan sus cultivos, mediante el cultivo del hongo en portaobjetos, utilizando el método de Microcultivo, el cual permite un estudio mas adecuado de las estructuras de los hongos miceliados (García y Córdoba, 1988).

#### Morfología Microscópica

- Tinción Azul de Lactofenol ó Azul de Anilina.  
Principio. Esta es una tinción de rutina usada para estructuras de modelos aislados en preparaciones

microscópicas. El contenido de fenol, el cual sirve como un fungicida; glicerina, la cual hace una preparación semipermanente; azul de algodón ó azul de anilina, el cual tiñe el exterior de la pared de los hongos; y el ácido láctico, el cual actúa como agente aclarante.

Una preparación permanente puede lograrse por incorporación de alcohol polivinílico dentro del medio en lugar de glicerina, siguiendo el método descrito por Wolfrussell y Shimoda citado por Campbell y Stewart en 1980.

#### Preparación del Azul de algodón lactofenol:

Cristales de fenol	20 g
Acido láctico	20 ml
Glicerina	40 ml
Agua destilada	20 ml

#### Procedimiento:

- Adicionar ácido láctico y glicerina al agua destilada y agitar vigorosamente.
- Adicionar cristales de fenol y mezclar. Calentar suavemente con agitación frecuente hasta disolver los cristales.
- Adicionar 2 ml de azul de algodón al 1% y mezclar. (Azul de algodón al 1% = 1 g de azul de algodón + 99 ml de agua (Campbell and Stewart, 1980).

#### a) Preparación Alcohol Polivinílico

Alcohol polivinílico	1.66 g
Agua destilada	10.00 ml
Acido láctico	10.00 ml
Glicerina	1.00 ml

Disolver los cristales de alcohol polivinílico en agua destilada lentamente. El ácido láctico es adicionado a la solución de alcohol polivinílico, agitando vigorosamente siguiente la adición de la glicerina. Filtrando si es necesario. La solución se deja reposar 24 horas.

#### Procedimiento Tinción Azul de Algodón-Lactofenol (Figura 4).

#### Materiales:

- Azul de algodón lactofenol ó azul de anilina
- Portaobjetos y cubreobjetos limpios.

microscópicas. El contenido de fenol, el cual sirve como un fungicida; glicerina, la cual hace una preparación semipermanente; azul de algodón ó azul de anilina, el cual tñe el exterior de la pared de los hongos; y el ácido láctico, el cual actua como agente aclarante.

Una preparación permanente puede lograrse por incorporación de alcohol polivinílico dentro del medio en lugar de glicerina, siguiendo el método descrito por Wolfussell y Shimoda citado por Campbell y Stewart en 1980.

Preparación del Azul de algodón lactofenol:

Cristales de fenol	20 g
Acido láctico	20 ml
Glicerina	40 ml
Agua destilada	20 ml

Procedimiento:

- Adicionar ácido láctico y glicerina al agua destilada y agitar vigorosamente.
- Adicionar cristales de fenol y mezclar. Calentar suavemente con agitación frecuente hasta disolver los cristales.
- Adicionar 2 ml de azul de algodón al 1% y mezclar. (Azul de algodón al 1% = 1 g de azul de algodón + 99 ml de agua (Campbell and Stewart,1980).

a) Preparación Alcohol Polivinílico

Alcohol polivinílico	1.66 g
Agua destilada	10.00 ml
Acido láctico	10.00 ml
Glicerina	1.00 ml

Disolver los cristales de alcohol polivinílico en agua destilada lentamente. El ácido láctico es adicionado a la solución de alcohol polivinílico, agitando vigorosamente siguiente la adición de la glicerina. Filtrando si es necesario. La solución se deja reposar 24 horas.

Procedimiento Tinción Azul de Algodón-Lactofenol (Figura 4).

Materiales:

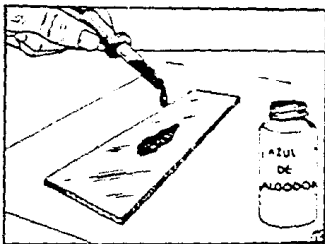
- Azul de algodón lactofenol ó azul de anilina
- Portaobjetos y cubreobjetos limpios.

NOTA: El azul de algodón ha sido reportado como carcinógeno. El potencial carcinógeno del azul de anilina no se conoce. No obstante que el azul de anilina y el azul de algodón tienen igual función su origen es distinto (Campbell and Stewart, 1980).

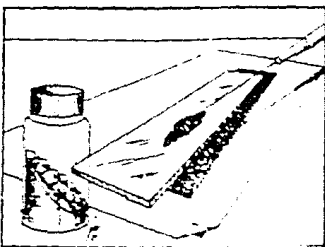


## FIGURA 4. PROCEDIMIENTO DE TINCION CON AZUL DE ALGODON LACTOFENOL.

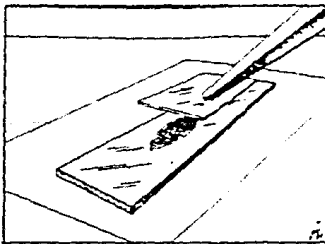
1. SOBRE UN PORTAOBJETOS LIMPIO COLOCAR UNA GOTTA DE AZUL DE ALGODON LACTOFENOL.



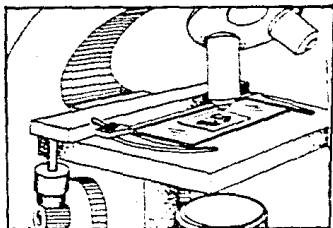
2. USANDO UNA FLAMA FIRME Y CON UNA AGUJA SE TOMA UNA PEQUENA CANTIDAD DE LA COLONIA Y SE SEPARA DEL CULTIVO, PREFERENTIEMEN TE DEL AREA GRANULAR. PUEDE SER DE UTILIDAD SI SE TOMA UNA PEQUENA CANTIDAD DE AGAR CON LA PIEZA DE LA COLONIA. SE COLOCA SOBRE LA GOTTA DE AZUL DE ALGODON LACTOFENOL EN EL PORTAOBJETOS.



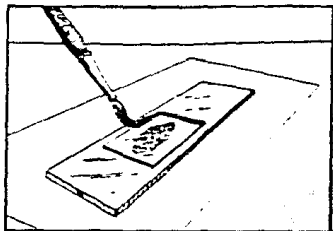
3. SE COLOCA UN CUBREOBJETOS SOBRE LA PREPARACION, LA CUAL PUEDE SER SUAVEMENTE CALENTADA. ESTO AYUDA A EXTENDER EL HONGO EN TODA LA PREPARACION Y A REMOVER LAS BURBUJAS.



4. EXAMINAR BAJO EL MICROSCOPIO  
CON LUZ BAJA.



5. UNA PREPARACION SEMIPERMANENTE, PUEDE HACERSE COMO SIGUE:  
A) SELLANDO EL CUBREOBJETOS CON  
ESMALTE DE UNAS INCOLORO Y/O  
B) ADICIONANDO ALCOHOL POLIVINILICO  
A LA SOLUCION DE AZUL DE ALGODON  
LACTOFENOL O AZUL DE ANILINA CON  
LACTOFENOL. (1954) P. 112.



## - Tinción de Gram.

## Colorantes y Reactivos.

## Solución de Cristal Violeta:

## Solución A

Cristal Violeta	2 g
Alcohol etílico	30 ml

## Solución B

Oxalato de Amonio	0.8 g
Agua destilada	20 ml

Se diluye la solución A al 10% en agua destilada y se mezcla con igual volumen de la solución B.

## Solución de Lugol:

Yodo	1 g
Yoduro de potasio	2 g
Agua destilada	200 ml

## Decolorante:

Alcohol etílico de 95 grados

## Contraste (Solución de Fucsina):

Fucsina básica	0.10 g
Agua destilada	100 ml

Este método divide las bacterias en dos grupos: positivas y negativas. Al colorar los gérmenes con cristal ó violeta de genciana y añadirles una solución débil de yodo (Lugol) se combinan estos con algunos componentes de la célula bacteriana que son retenidos por la membrana citoplásmatica cuando se tratan por alcohol, otros en cambio liberan rápidamente el colorante por lo que no aparecerían a la visión microscópica a no ser que se las contratiñera con algún otro tinte biológico como la safranina ó fucsina. Por lo tanto, los microorganismos que conservan el cristal ó violeta de genciana se observan de azul (positivas) y las que no lo hacen (negativas), muestran un color que corresponde al utilizado en el contraste, que en este caso sería rosa para la safranina y rojo para la fucsina (Figura 5) (Divo, 1971).

# FIGURA 5. PROCEDIMIENTO DE TINCION DE GRAM

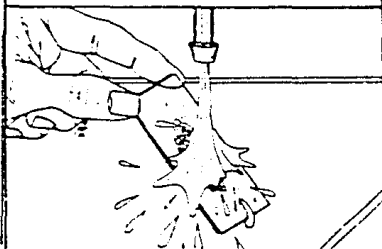
1. PREPARAR EL FROTIS Y FIJARLO AL CALOR.



2. CUBRIR LA PREPARACION FIJADA CON LA SOLUCION DE CRISTAL VIOLETA DURANTE UN MINUTO.



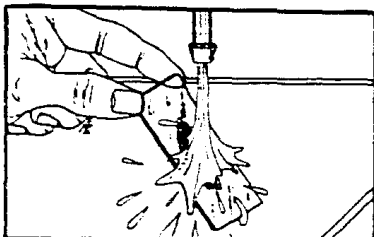
3. LAUAR CON AGUA.



4. CUBRIR EL FROTIS CON LUGOL POR UN MINUTO.



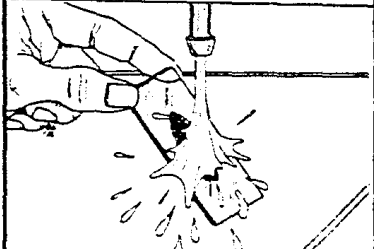
5. LAVAR CON AGUA



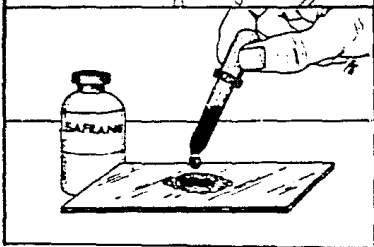
6. DECOLORAR CON  
ALCOHOL-ACETONA



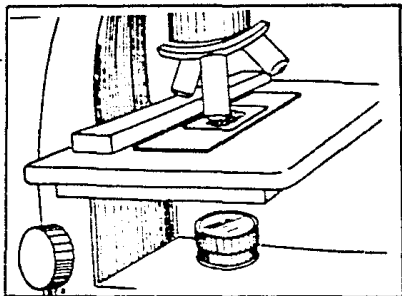
7. LAVAR RAPIDAMENTE CON  
AGUA.



8. CONTRASTAS CON LA  
SOLUCION DE FUCSINA  
Y/O SAFRANINA POR  
UN MINUTO.



9. LAVAR CON AGUA. SECAR AL  
AIRE Y EXAMINAR CON OBJE  
TIVO DE INMERSION.



#### - Microcultivo

Principio. Un microcultivo se hace para observar las características del hongo aislado, el arreglo de esporas e hifas. El provecho de este proceso relativamente laborioso es que se puede seguir el desarrollo de esporas e hifas en un período corto.

En estos cultivos el crecimiento se realiza en una cámara húmeda, preparada con una rodaja de papel filtro que se coloca en el fondo de una caja petri, una varilla de vidrio doblada, un portaobjetos y un cubreobjetos. Este paquete se esteriliza en el autoclave y se almacena hasta ser utilizado (Figura 6) (Campbell and Stewart, 1980).

NOTA: Cuando se trabaja con cultivo de hongos, se debe de tener cuidado para evitar la contaminación del laboratorista y del área de trabajo; se emplean técnicas asépticas, es conveniente colocar una toalla de papel sobre el área de trabajo de la mesa y humedecerla con cualquier desinfectante, la toalla puede doblarse y desecharse después de haber terminado el trabajo (Jungerman y Schwartzman, 1977).

### 3.4 Metodos complementarios

#### Actividad Metabolica

Las pruebas para determinar la habilidad de las levaduras para utilizar un carbohidrato (Fermentación y Asimilación) como única fuente de carbono en un medio químicamente definido han tenido auge dentro de los taxonomistas de levaduras y han significado un paso esencial en la identificación de levaduras.

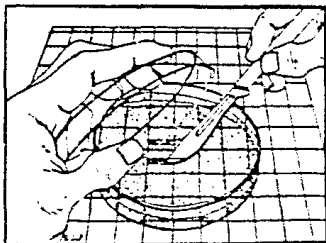
#### Fermentación de Carbohidratos.

La prueba de Fermentación de carbohidratos es comunmente utilizada para la identificación de levaduras. Sin embargo, esta prueba es menos variable y son menos dependientes que las pruebas de asimilación de carbohidratos. La única real evidencia de la fermentación de carbohidratos por las levaduras es la producción de gas por lo que, la utilización del tubo de Durham es indispensable para su detección.

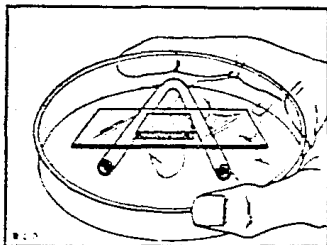
## FIGURA 6. PROCEDIMIENTO TECNICA DE MICROCULTIVO.

1. PREPARAR UNA PLACA CON 30-35 ML DE EDIO.

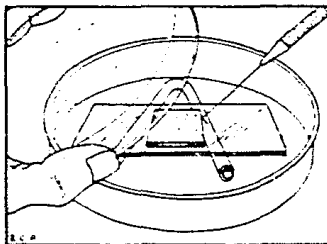
2. SE CORTA UN BLOQUE DE APROXIMADAMENTE 1 CM<sup>2</sup>, UTILIZANDO MATERIAL Y TECNICAS ASEPTICAS.



3. SE TRANSFIERE EL BLOQUE DE AGAR A LA SUPERFICIE DEL PORTA OBJETOS.

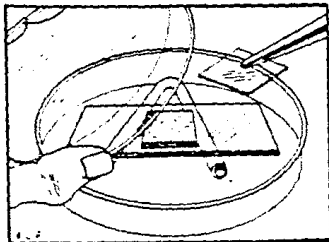


4. SE INOCULAN LOS CUATRO LADOS DEL BLOQUE DE AGAR CON LAS ESPORAS O EL CRECIMIENTO MICE-LIAL DEL HONGO QUE SE ESTA ESTUDIANDO.

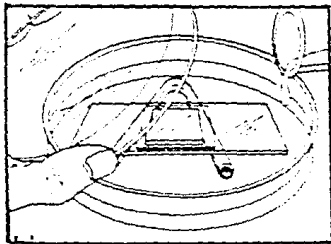




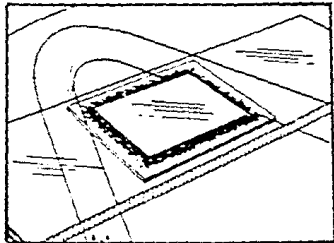
5. SE COLOCA UN CUBREOBJETOS UTILIZANDO UNAS PINZAS PREVIA MENTE FLAMEADAS ENCIMA DEL BLOQUE, HACIENDO UNA LIGERA PRESION.



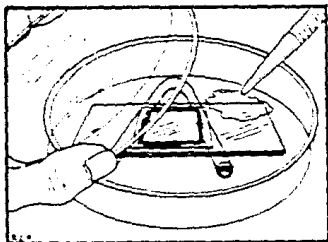
6. SE ADICIONAN APROXIMADAMENTE 18 ML DE AGUA DESTILADA ESTERIL O UNA SOLUCION AL 18% DE GLICERINA ESTERIL TENIENDO CUIDADO DE QUE EL NIVEL DE LIQUIDO NO TOQUE EL PORTAOBJETOS.



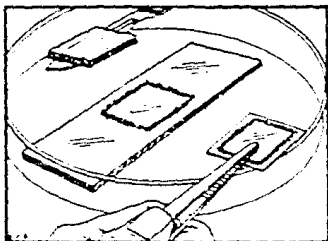
7. SE INCUBA EL MICRO CULTIVO A 28°C HASTA OBSERVAR SOBRE EL MEDIO EL DESARROLLO DEL MICELIO. CUANDO EL MICELIO TOQUE TANTO AL PORTA COMO AL CUBREOBJETOS, PUEDE REALIZARSE SU OBSERVACION.



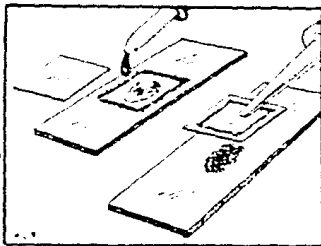
8. ANTES DE OBSERVAR, SE RETIRA EL AGUA DESTILADA CON PIPETA Y SE SUSTITUYE POR FORMOL AL 10% (10 ML). SE DEJA ACTUAR POR ESPACIO DE 1 A 2 HORAS.



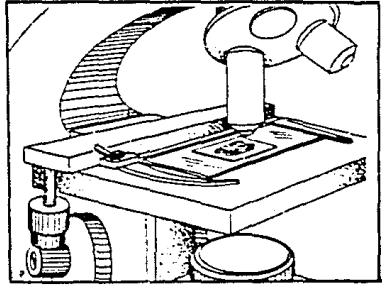
9. POSTERIORMENTE SE RETIRA EL MEDIO DE CULTIVO CON UN BISTURI PREVIAMENTE FLAMEADO Y OBTENEMOS EL HONGO SOBRE EL PORTA Y CUBREOBJETOS.



10. PARA EL EXAMEN, SE AGREGAN 1 O 2 GOTAS DEL COLORANTE AZUL DE ALGODON LACTOFENOL EN UN PORTAOBJETOS LIMPIO Y SE COLOCA EL CUBREOBJETOS DEL MICROCULTIVO EN EL COLORANTE; POR OTRO LADO EL PORTAOBJETOS DEL MICROCULTIVO SE LE AGREGA EL COLORANTE Y UN CUBREOBJETOS LIMPIO.



11. PARA EL EXAMEN MICROSCOPICO, SE OBSERVA PRIMERO CON MENOR AUMENTO (10X) Y DESPUES CON EL OBJETIVO DE MAYOR AUMENTO (40X).



**Medio utilizado:**

- Caldo de Peptona, carbohidratos y rojo de fenol  
Es un medio similar al agar dextrosa (Bioxon) al cual se le ha agregado rojo de fenol como indicador de pH.

**Formula en gramos por litro:**

Mezcla de peptonas	10
Cloruro de sodio	5
Carbohidrato	10
Rojo de fenol	0.025
pH final	7.4

**Preparación:**

Disolver la mezcla de peptonas en el agua destilada, adicionar cloruro de sodio y mezclar bien, se añade el carbohidrato, finalmente agregar rojo de fenol. Esterilizar en autoclave 115° 10 lb 10'.

Servir el medio en tubos de ensayo, aproximadamente 8 ml por tubo y conteniendo campana de Durham para la detección de la producción de gas. El microorganismo de prueba es inoculado, incubando a una temperatura de 37°C por espacio de 10-15 días (Manual Bioxon).

**Interpretación:**

Una prueba positiva se observa con una burbuja de aire recolectada en la campana de Durham lo cual indica producción de gas, en algunas ocasiones se puede apreciar acidificación del medio por el cambio de coloración del medio (de púrpura a amarillo).

Un cambio de coloración del medio sin producción de gas, podría ser indicativo de una contaminación bacteriana (Lennette, 1985).

**Asimilación de Carbohidratos.**

**Formula del medio basal en gramos por litro:**

Azul de bromotimol	0.16
Agar bacteriológico	20.0
Solución buffer de fosfatos	100.0 ml

**Procedimiento:**

Disolver el agar en el agua destilada, adicionar la solución buffer y el indicador.

Esterilizar por autoclave a 121°C, 15 lb, 15 minutos.

Se deja enfriar y se agrega la solución del carbohidrato a probar. Inocular el medio y dejar incubar 4 días a 37°C.

Adición del azúcar.

Asépticamente se adiciona el azúcar a partir de una solución "stock" esterilizada por filtración. La glucosa, lactosa y sacarosa se adicionan a una concentración final del 1%; mientras que la Maltosa, Galactosa, Melibiosa, Celobiosa, Inositol, Xilosa, Rafinosa, Trealosa y Dulcitol a una concentración final de 0.5% (Campbell and Stewart, 1980).  
- Prueba de Ureasa.

La hidrólisis de la urea es un método usual que ayuda a la identificación de los géneros: Cryptococcus, Rodothorula, Trichosporum y ocasionalmente la especie krusei del género Candida.

El mecanismo de la prueba es simple, ya que se observa la reacción de la hidrólisis de la urea mediante la utilización de un indicador (rojo de fenol), el cambio de pH a un estado alcalino variará el color a rosado, lo que será indicativo de una reacción positiva. La reacción es más obvia para levaduras que para bacterias (Roberts et al., 1978).

Seeliger's enfatizó el papel de la hidrólisis de la urea en la Taxonomía de las levaduras y utilizó esta prueba para la identificación de Cryptococcus, así concluye que la prueba rápida de urea puede ser utilizada como prueba presuntiva para la identificación de levaduras de importancia médica. (Roberts et al., 1978).

Roberts y Zimmons (1979) utilizaron la prueba de ureasa para la identificación tentativa de C. neoformans después de seis horas de iniciada la prueba. La prueba rápida de la urea es selectiva para C. neoformans el cual puede dar resultados positivos a los 15-20 minutos de incubación. Aún cuando la prueba de la ureasa es una buena prueba de escrutinio, la identificación final de C. neoformans deberá ser precedida de pruebas específicas confirmativas para este hongo.

3.5. Histopatología. Ver práctica 7.

3.6. Inmunología. Ver práctica 8.

# **PRACTICA 4 DERMATOMICOSIS**

## **OBJETIVO:**

**EL ALUMNO CONOCERA LAS  
PRINCIPALES DERMATOMICOSIS Y  
LA FORMA DE REALIZAR EL  
DIAGNOSTICO DE LAS MISMAS.**

#### 4. Generalidades.

Las micosis superficiales son enfermedades producidas por hongos que invaden sólo tejido queratinizado (piel, cabello, pelo y uñas) pero no invaden tejidos profundos, dentro de este grupo se incluyen los Dermatofitos, también denominados hongos queratinofílicos.

Estudios ecológicos sobre éstos organismos han permitido clasificarlos en: geofílicos, zoofílicos y antropofílicos; los geofílicos son hongos que habitan el suelo y que utilizan la queratina; los que utilizan la queratina de los tejidos de animales se les llama zoofílicos y aquellos que son capaces de atacar las capas superficiales de la piel y sus anexos en el humano se les llama antropofílicos.

Estas infecciones se transmiten directamente de animal a hombre y de suelo a hombre, o indirectamente por medio de pelo o escamas infectadas. Las dermatofitosis o "Tiñas" se inician con una colonización de éstos hongos en la parte superficial de la piel y el avance de la infección depende del huésped, sitio anatómico afectado, cepa y especie del hongo. La lesión en el huésped puede ser limitada a una descamación o prosperar a una fase eruptiva con reacción inflamatoria (producida por enzimas proteolíticas, elastasas y colagenasas) que en la mayoría de los casos se resuelve, sin embargo los hongos pueden permanecer por años en el huésped transformándose en acarreador y si se presenta un estrés o trauma se puede exacerbar la enfermedad clínica.

Los géneros que producen este tipo de micosis se clasifican en tres, que son: Microsporium, Trichophyton, Epidermophyton los cuales en tejido queratinizado no viable solo forman hifas y artrosporas. Estos hongos en cultivo pueden desarrollar sus características particulares, lo que va a permitir la identificación de género y especie (Jawetz, 1987).

Otra de las clasificaciones para estos hongos, esta dada dependiendo del lugar anatómico que lesionen en el humano (Cuadro 4).

Cuadro 4	CLASIFICACION CLINICA.
Cabeza o cuero cabelludo	Tiña capitis
Manos	Tiña nanum
Barba y bigote	Tiña barbae
En pie	Tiña pedis
En uñas	Tiña unguium
Región crural	Tiña cruris
Otro sitio del cuerpo	Tiña corporis
Corporal con lesiones concéntricas	Tiña imbricata (tokelau)

(Campbell, 1980).

#### 4.1 Descripción de los géneros causantes de Dermatomicosis.

##### 1. Género Microsporium.

Son hongos Deuteromicetos, se reproducen asexualmente por medio de conidias, éstas se clasifican en macro y microconidias, tienen forma navicular y el número de septos de las conidias varía según la especie de que se trate. Su reproducción sexual, al estado perfecto es el género Mannizzia.

##### 2. Género Trichophyton.

Son también Deuteromicetos cuya reproducción asexual es por medio de conidias y éstas tienen forma de basto, pueden haber o no macroconidia. Cuando están presentes son escasas, largas, en forma de pincel y poseen una pared lisa y fina. Las microconidias son generalmente numerosas y se ubican lateralmente a lo largo de las hifas (rama de tirso) o en grupos (racimo de uvas). Su reproducción sexual, al estado perfecto han permitido clasificarlos en el género Arthroderma.

##### 3. Género Epidermophyton.

Este género tiene la particularidad de presentar solo una especie, cuya reproducción es asexual por conidias que presentan agrupaciones en racimos. No produce microconidias. La diferenciación del género se realiza observando las grandes macroconidias en forma de clava, de paredes lisas,



divididos en 2 a 5 células por septos transversales.  
Aún no se conoce su reproducción sexual (Figura 7) (Jawetz et al., 1987).

CUADRO 5. GENEROS Y ESPECIES DE DERMATOFITOS

<u>Microsporium</u>	<u>canis</u> <u>nanum</u> <u>gypseum</u> <u>equinum</u> <u>audouinii</u>
<u>Trichophyton</u>	<u>tonsurans</u> <u>rubrum</u> <u>mentagrophytew</u> <u>concentricum</u> <u>scholeimii</u> <u>terrestre</u> <u>verrucosum</u> <u>equinum</u> <u>gallinae</u> <u>simii</u>
<u>Epidermophyton</u>	<u>floccosum</u>

#### 4.2 Diagnóstico de una infección por Dermatofitos

Para lograr realizar un diagnóstico adecuado de una infección por Dermatofitos, se sugiere seguir el siguiente procedimiento:

1. Obtener una muestra del lugar donde se presente la lesión, el tipo de muestra adecuado puede ser de: piel, uñas, y cabello.
2. Al material biológico, se le realiza una prueba microscópica directa con Hidróxido de Potasio (KOH) al 10%.
3. Cultivo en: Sabouraud Dextrosa Agar (SDA), Agar Micobiotic, Agar Dextrosa Papa (ADP) y Medio Prueba para Dermatofitos (DTM).

**Medio Prueba para Dermatofitos (Dermatophyte Test Medium).  
DTM.**

Usado para el aislamiento de dermatofitos. Este medio selectivo excluye bacterias y hongos contaminantes, combinado con un indicador de pH (rojo de fenol) que vira de amarillo a rojo el cual es rápidamente afectado por los dermatofitos y hongos relacionados que permiten su temprano reconocimiento. Se aconseja utilizar el DTM como cualquier otro medio para el aislamiento de dermatofitos.

Nota: La substitución de ingredientes originales puede cambiar las características y selectividad del medio.

**Reactivos:**

Agua destilada	1000 ml
Phytona	10 g
Dextrosa	10 g
Agar bacteriológico	20 g
Solución rojo de fenol	40 ml
HCl 0.8 N	6 ml
Ciclohexamida (Actidiona)	0.5 g
Sulfato de Gentamicina	0.1 g = 100/ ml
Clortetraciclina HCl	0.1 g = 100/ ml

**Procedimiento:**

- Adicionar Phytona, dextrosa y agar en 1000 ml de agua destilada y hervir hasta que se disuelva el agar.
- Adicionar 40 ml de solución Rojo de Fenol (soln. rojo de fenol: 0.5 gm rojo de fenol, disolver en 15 ml de Hidróxido de sodio 0.1 N y aforar a 100 ml).
- Adicionar 2 ml de sulfato de gentamicina.
- Adicionar 2 ml de Ciclohexamida.
- Esterilizar en autoclave a 12 lb por 10 minutos.
- Dejar enfriar a 45°C.
- Adicionar 80 ml de Buffer de Fosfatos ajustado a pH = 5.7 (esterilizado por Filtración en Millipore).
- Adicionar 25 ml de ampicilina
- Adicionar cantidad suficiente de HCl 0.8N, hasta obtener coloración amarilla del medio.
- Vaciar en cajas Petri y dejar solidificar a temperatura ambiente.
- Después de la inoculación esperar al cambio de color. La temperatura optima de incubación es 28-30°C. El excesivo calor puede afectar el desarrollo de los hongos.

- El cambio de color se puede detectar después de una semana de inoculación. Si se deja más tiempo podemos encontrar falsos positivos, dados por hongos contaminantes que inhiban el desarrollo adecuado de los dermatofitos.

Nota: El intervalo de pH del indicador rojo de fenol es: 6.8 (amarillo) a 8.4 (rojo) (Rebell y Taplin, 1974).

#### Interpretación.

Positivo: se observa una coloración roja (reacción alcalina) y el crecimiento del hongo sobre el DTM después de una semana de haber inoculado el medio.

Negativo: se observa desarrollo en Agar Dextrosa Sabouraud, pero no en Medio DTM (Campbell and Stewart, 1980).

4. Cuando se obtiene crecimiento en cualquiera de los medios utilizados para el aislamiento de los Dermatofitos, se realiza una tinción con azul de algodón y observación al microscopio para reconocer las estructuras obtenidas en el cultivo.

5. Posteriormente se realiza un microcultivo, para lograr identificar adecuadamente el género y especie.

#### 4.3 Resultados.

Las técnicas anteriores fueron probadas con muestras clínicas obtenidas en el Laboratorio de Micología, observándose lo siguiente:

Se trabajaron 66 muestras de pacientes externos a este laboratorio de las cuales 16 fueron positivas a crecimiento bacteriano, 20 no presentaron crecimiento y 30 fueron positivas a hongos.

Estas últimas se sometieron al siguiente tratamiento:

a) Para muestras de pelo, una o raspado cutáneo:

- Observación con KOH al 10%
- Cultivo en SDA y MIC
- Tinción de azul de algodón
- Microcultivo

b) Cuando la muestra era obtenida de un exudado:

- Observacion a KOH al 10%
- Tincion de Gram
- Cultivo en SDA y MIC
- Tincion de azul de algodón
- Microcultivo

Al final de este proceso se detectó que de las 30 muestras positivas a hongos, 15 lo eran a dermatofitos.

De estas 15; 2 provenian de pelo, 4 de unas y 9 de escamas (raspado cutaneo), así como la identificación de: 20.00% del genero Microsporum, 40.0% del genero Trichophyton y un 40.00% de Dermatofitos sin clasificar.

c) El medio de DTM se utilizo para cepas conocidas de Microsporum canis y Trichophyton mentagrophytes, para evaluar el viraje en color del medio reportado en la literatura. No se utilizo como medio de aislamiento en las muestras clinicas.

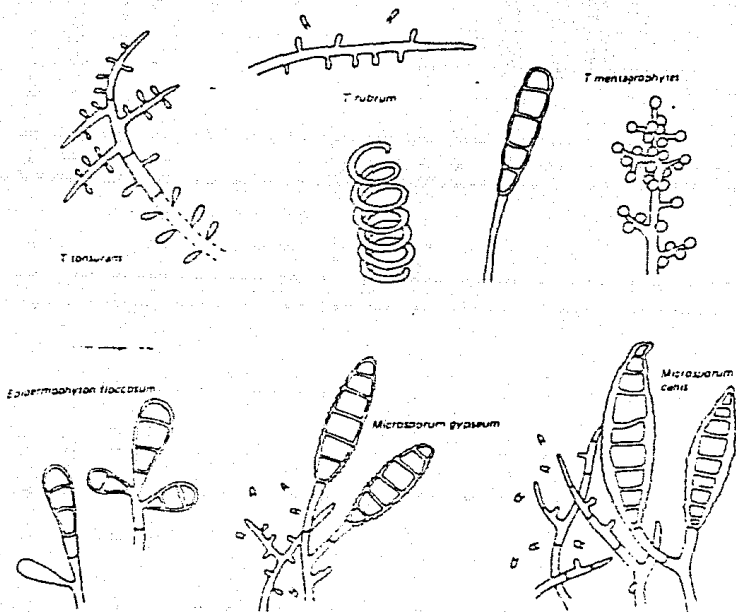
Resultados de pruebas realizadas a Dermatofitos (Cuadro 6).

De los resultados obtenidos se observó que la presencia de dermatofitos se encuentra en mayor proporción en comparación con otros hongos, siendo importante para posteriores investigaciones la asociación encontrada entre Malazzesia y Dermatofitos (de los géneros Microsporum o Trichophyton).

Los procedimientos a realizar en la práctica por los alumnos son:

- a) Aislamiento de dermatofitos a partir de una muestra clínica.
- b) Pruebas de identificación de los géneros obtenidos con los métodos correspondientes.

FIGURA 7. MICROCONIDIAS Y MACROCONIDIAS TÍPICAS DE LOS DERMATOFITOS.



Jawets et al., 1967.

CUADRO 6. RESULTADOS DE  
DERMATOFITOS

No. de MTRA.	ORIGEN	KOH	CULTIVO		GRAM	TINCION D E AZUL DE ALGODON	MICRO CULTIVO	IDENTIFICACION
			SDA	MIC				
01	PELO	+	+	+	NR	R	NR	<u>Trichophyton spp.</u>
02	PELO	+	+	+	NR	R	NR	<u>Microsporium spp.</u>
03	UNA	+	+	+	NR	R	NR	Dermatofito s/c.
04	UNA	+	+	+	NR	R	NR	<u>Microsporium spp.</u>
05	ESCAMAS	+	+	+	NR	R	NR	Dermatofito s/c.
06	ESCAMAS	+	+	+	NR	R	-	<u>Trichophyton spp.</u>
07	ESCAMAS	+	+	+	NR	R	+	Microsporium spp.
08	ESCAMAS	+	+	+	NR	R	NR	Dermatofito s/c.
09	ESCAMAS	+	+	+	NR	R	NR	Dermatofito s/c.
10	UNA	+	+	+	NR	R	-	<u>Trichophyton spp.</u>
11	UNA	+	+	+	NR	R	-	<u>Trichophyton spp.</u>
12	ESCAMAS	+	+	+	+	R	NR	Dermatofito s/c
13	ESCAMAS	-	+	+	NR	R	+	<u>Trichophyton spp.</u>
14	ESCAMAS	+	+	+	NR	R	+	<u>Trichophyton spp.</u>
15	ESCAMAS	+	+	+	NR	R	NR	Dermatofito s/c.

NR No realizado  
+ Realizado

# **PRACTICA 5**

## **CANDIDA**

**OBJETIVO:**

**EL ALUMNO CONOCERA LAS  
CARACTERISTICAS PRINCIPALES Y  
LA FORMA DE DIAGNOSTICAR UNA  
MICOSIS CAUSADA POR EL GENERO  
CANDIDA.**

## 5. Generalidades.

La candidosis es una de las enfermedades micóticas más frecuentes que afecta a niños, jóvenes y ancianos, principalmente a personas del sexo femenino. Una de las manifestaciones clínicas más frecuente es la vulvovaginitis producida por levaduras de este género, siendo el principal agente etiológico Candida albicans. Estas levaduras residen en el humano y animal como comensal; pero pueden causar desórdenes e infección cuando el hospedador se encuentra inmunodeprimido (Valdespino, 1988).

### 5.1 Descripción del género Candida

El género Candida se ha clasificado dentro del grupo Deuteromicotina, al cual pertenecen la mayoría de los hongos patógenos al humano. El género Candida está constituido por levaduras, las cuales son organismos unicelulares ó filamentosos con formación de pseudomicelio, micelio septado, reproducción asexual y en algunas especies la reproducción sexual. El término pseudomicelio se designa a una agrupación de blastosporas que a la observación microscópica dan la impresión de ser un micelio, por ello su nombre de pseudomicelio. El micelio verdadero está formado por la elongación y ramificación del tubo germinativo producido por la célula madre. Este género está constituido por 155 especies de las cuales, siete son patógenas al humano (Cuadro 7).

Cuadro 7. Especies de Candida encontradas en el hombre causantes de infección.

Candida albicans  
Candida tropicalis  
Candida stellatoidea  
Candida parapsilosis  
Candida pseudotropicalis  
Candida krusei  
Candida guilliermondii

(Odds, 1979).

### 5.2 Diagnóstico de infección por Candida spp.

Cuando se sospecha de una infección por Candida, es conveniente realizar las siguientes pruebas para llegar a un diagnóstico acertado:



1. Realizar una Tinción de Gram, con el objeto de identificar las levaduras características de este género.

2. Cultivo en Agar Dextrosa Sabouraud (SDA) y Agar BIGGY, para el aislamiento de la levadura.

Agar Biggy (Para aislamiento e identificación de *Candida* spp.)

El agar de Glicina, Glucosa, Levadura y Sulfito de Bismuto es útil para el aislamiento y la identificación presuntiva de *Candida* por medio de la reacción de sulfuro.

Formula en gramos por litro:

Citrato de amonio y bismuto	5.0
Sulfito de sodio	3.0
Dextrosa	10.0
Glicina	10.0
Extracto de levadura	1.0
Agar	16.0

Preparación:

Suspender 45 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Remojar de 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante no más de un minuto. Dejar enfriar a 45-50°C.

Agitar circularmente y vaciar en placas de Petri estériles, utilizando aproximadamente 20 ml para cada placa. No esterilizar (Hernández y Martínez, 1985).

3. Tubo germinativo.

Cuando son incubadas células individuales de *C. albicans* producen un filamento hifal corto lateral que da origen al tubo germinativo, que no lo producen otras especies del género *Candida*, siendo esta una de las pruebas rápidas de diferenciación de especies en este género.

En esta prueba se necesita solamente una suspensión diluida de levaduras en 0.5 a 1.0 ml de suero. La mezcla se incuba a 37°C por 3 horas. El suero humano y bovino, incluyendo el suero fetal de becerro (que puede ser obtenido comercialmente), la albúmina sérica bovina, ovoalbúmina, bilis de buey o peptona pueden ser usados con éxito en la producción de tubo germinativo. Cepas conocidas de *C. albicans* y *C. tropicalis* pueden usarse como controles

positivo y negativo, respectivamente (Lennette, 1985).

4. Tolerancia a pH ácido. (Para identificación Presuntiva de C. albicans ).

La eficacia de la tolerancia a pH's ácidos de C. albicans se ha demostrado sólo en aislamientos de especies de levaduras comúnmente encontradas en muestras clínicas. En ocasiones aislamientos de especies menos comunes pueden dar resultados falsos-positivos.

La prueba de tolerancia a pH's ácidos, ayuda a diferenciar a C. albicans de otras especies, pues se ha encontrado que el rango de pH 1.2 a 1.5 es conveniente para el crecimiento de C. albicans, ya que a pH's mayores pueden crecer Candida spp.

Agar para la Prueba de pH ácido.

Solución A:

Agar Czapek Dox	50 g
Agua destilada	1000 ml

Procedimiento:

Disolver el agar en 1000 ml de agua destilada, esterilizar en autoclave a 121°C/15 lb/15'.

Solución B:

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	9.438 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	9.073 g
Dextrosa	10.0 g
Agua destilada	1000.0 ml

Nota: Se ajusta al pH deseado con HCl 1N.

Procedimiento:

Se disuelven los fosfatos y la dextrosa en 1000 ml de agua destilada. El pH se ajusta con HCl al pH deseado con ayuda del potenciómetro. La solución final se esteriliza por filtración en filtro Millipore (.22 ).

Finalmente se mezclan la solución A y B en la siguiente proporción: por cada 180 ml de A adicionar 20 ml de B. El medio se vacía en Cajas Petri (8.5 cm de diámetro). Dejar solidificar y someter a prueba de esterilidad (Odds y Abbot, 1980).

## 5. Producción de Clamidosporas

Se ha observado que algunas especies de *Candida*, principalmente *C. albicans* tienen la habilidad de formar esporas esféricas de doble pared llamadas Clamidosporas, constituyendo una prueba diferencial entre las especies del género *Candida*. Estas clamidosporas pueden ser inducidas a su formación en medios específicos, tales como: Agar Clamidospora, Agar Czapek-Dox, Agar Harina de Maíz (Corn Meal), adicionando a los dos últimos Tween 80 a una proporción de 1%.

### a) Agar Clamidospora.

Formula en gramos por litro:

Sulfato de Amonio	1.0
Fosfato Monopotásico	1.0
Azul de Tripán	0.1
Polisacárido Purificado	20.0
Agar	15.0
Biotina	5.0 mcg
pH final 5.1 +/- 0.2	

Preparación:

Se suspenden 37 gramos del polvo deshidratado en un litro de agua destilada. Dejar remojar durante 19 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 minutos. Enfriar a 45-50°C y servir en cajas Petri (Manual Bioxon).

### b) Agar de Czapek Dox + Tween 80

Formula en gramos por litro:

Agar Czapek-Dox	50	
Agua destilada	1000	
Tween 80 (Polisorbato 80)		10

Preparación:

- Suspender 50 g del medio deshidratado en 1000 ml de agua destilada y mezclar agitando vigorosamente.
- Adicionar 10 ml de Tween 80, mezclar y agitar.
- Calentar con agitación frecuente por espacio de un minuto.

- Esterilizar en autoclave a 121°C , 15 lb de presión por 15 minutos. pH final igual a 7.5.
- Enfriar y vaciar a cajas Petri.

c) Agar Corn Meal + Tween 80

Formula en gramos por litro:

Agar Corn Meal	17
Agua destilada	1000
Tween 80 (Polisorbato 80)	10

Preparación:

- Adicionar Agar Corn Meal al agua destilada y mezclar.
  - Calentar a ebullición con agitación frecuente hasta que se disuelva completamente.
  - Adicionar en caliente 10 ml de Tween 80 y mezclar.
  - Esterilizar por autoclave a 121°C 15 lb de presión, 15 minutos.
  - Enfriar aproximadamente a 45-50°C y vaciar en cajas Petri estériles.
  - Dejar solidificar a temperatura ambiente.
  - El pH final es de 5.6 a 6.2 a 25°C (temperatura ambiente).
- (Campbell y Stewart, 1980).

Las técnicas utilizadas para sembrar estos medios, son las siguientes:

- Técnica de Picadura.- en cajas Petri de 5 cm de diámetro, estéril, se vacían aproximadamente 12 ml del medio a utilizar, se espera a que solidifique para luego sembrar la cepa a probar, esto se hace teniendo el asa en forma de L y tomando una asada de la colonia, introduciendo el asa al medio y rasgando el agar a lo largo de la caja Petri, se deja incubar a 37°C, se revisa diariamente al microscopio, para lograr observar el desarrollo de las Clamidosporas.
- Técnica de Sandwich.- en un portaobjetos limpio y desengrasado se vierten de 4-5 ml del medio a utilizar, se espera a que solidifique, sembrando posteriormente sobre la superficie del agar, cubriéndose el sembrado con otro portaobjetos limpio y desengrasado. Dejar incubando a 37°C y observar diariamente las laminillas para observar el desarrollo de las Clamidosporas.

Existen algunos factores que pueden influir en la formación de las Clamidosporas, tales como:

i) Medio de cultivo utilizado.- de los medios de cultivo utilizados, se ha demostrado que el Agar Czapek-Dox con Tween 80, resulta ser el mas eficiente, no importando la técnica de sembrado (Sandwich y Estría).

ii) Densidad del inóculo.- el inóculo recomendado se encuentra en el siguiente rango: de  $3,500 \times 10^7$  a  $50 \times 10^7$  células por ml.

iii) Temperatura.- la temperatura ideal para su formación se encuentra de  $24^{\circ}\text{C}$  a  $28^{\circ}\text{C}$ , debido a que no alcanzan un desarrollo adecuado a  $37^{\circ}\text{C}$ .

iv) Anaerobiosis parcial

v) Tiempo de incubación.- De 24 a 48 horas.  
(Dawson, 1961).

e) Asimilación y Fermentación de Carbohidratos.  
Estas pruebas se consideran importantes para lograr la diferenciación del género y especie de Candida (ver práctica 2).

Características de las especies de Candida más frecuentemente aisladas en muestras clínicas (Cuadro 8).

### 5.3 Resultados.

Las pruebas antes mencionadas se probaron en cepas de C. albicans, Candida krusei, C. tropicalis y cinco muestras clínicas presuntivas de ser positivas a C. albicans, obtenidas a partir de exudados vaginales.

Por la técnica de tinción de Gram se logro observar la morfología de cada una de las cepas en estudio, Candida aparece como una levadura grampositiva, que tiene gemación. Posteriormente se realizó el cultivo en agar SDA y BIGGY, para lograr el aislamiento de la levadura en el caso de las muestras clínicas, siendo este satisfactorio ya que se obtuvo un crecimiento favorable, con el cual se procedió a realizar las pruebas de diferenciación de especies dentro de este género.

Prueba de tubo Germinativo y producción de Clamidosporas (Cuadro 9).

Con respecto al crecimiento en pH's ácidos, el resultado observado en el caso de las cinco muestras clínicas y la cepa de C. albicans, fue un crecimiento positivo desde pH = 1.2 a pH = 1.4, para la cepa de C. tropicalis y C. krusei, el desarrollo se dió a partir de pH = 1.6.

Resultados de Asimilación y Fermentación de Carbohidratos para levaduras (Cuadro 10).

Los procedimientos a realizar por los alumnos en la práctica, son los siguientes:

- a) Aislamiento del género Candida a partir de una muestra clínica, en los medios específicos.
- b) Producción de tubo germinativo y clamidosporas de cepas conocidas de C. albicans.

CUADRO 8 -

CARACTERISTICAS DE LAS ESPECIES DE CANDIDA MAS FRECUENTEMENTE AISLADAS EN MUESTRAS CLINICAS

ORGANISMO	ASIMILACIONES										FERMENTACIONES				OTRAS REACCIONES								
	GLUCOSE	MELTIOSE	SUCROSE	LACTULOSE	GALACTULOSE	MALTOSE	MILIOSE	TRIOSE	XILOSE	INOSITOL	GLICEROL	GLUCULOSE	MELTIOSE	SUCROSE	LACTULOSE	TRIOSE	GLUCULOSE	MELTIOSE	SUCROSE	TRIOSE	GLUCULOSE	TRIOSE	GLUCULOSE
<i>Candida albicans</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-
<i>C. parapsilosis</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-
<i>C. tropicalis</i>	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
<i>C. pseudotropicalis</i>	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
<i>C. krusei</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
<i>C. guilliermondii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
<i>C. rugosa</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

AG = ACIDO Y GAS  
 A = ACIDO PRODUCIDO SOLO EN EL CALDO DE FERMENTACION

Koneman et al., 1983.

CUADRO 9.

RESULTADOS DE PRODUCCION DE CLAMIDOSPORA  
Y TUBO GERMINATIVO PARA CANDIDA.

IDENTIFICACION	AGAR CZAPEK DOX		AGAR CORN MEAL		AGAR CLAMIDOSPORA		TUBO GERMINATIVO
	* SANDWICH	* RASGADO	SANDWICH	RASGADO	SANDWICH	RASGADO	
<u>Candida albicans</u>	+	+	+	+	-	-	+
<u>Candida krusei</u>	-	-	-	-	-	-	-
13	-	+	-	+	-	-	+
1442	-	-	-	+	-	-	+
898	+	+	-	+	-	-	+
374	+	-	-	+	-	-	+
459	+	-	-	+	-	-	+

\* METODOS DE INOCULACION PARA LA PRODUCCION DE CLAMIDOSPORA.



CUADRO 10.

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE  
ASIMILACION Y FERMENTACION DE  
CARBOHIDRATOS PARA LEVADURAS

IDENTIFICACION	ASIMILACIONES						FERMENTACIONES					
	LEUCO-OSACAROS	GLUCO-OSACAROS	MELIBIO-OSACAROS	XILOSA	RAFINOSA	INULINO-OSACAROS	GLUCOSA	MELIBIO-OSACAROS	SUCROSA	LEUCO-OSACAROS	GLUCO-OSACAROS	INULINO-OSACAROS
<u>Candida albicans</u>	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+
<u>C. tropicalis</u>	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-
<u>C. krusei</u>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
<u>Rhodotorula</u>	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<u>Cryptococcus</u>												
<u>neoformans var. neof</u>	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<u>C. neoformans</u>												
<u>var. gatti</u>	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
374	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+
1442	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+
13	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+
459	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+

# **PRACTICA 6**

## **CRYPTOCOCCUS**

**OBJETIVO:**

**EL ALUMNO CONOCERA LAS  
CARACTERISTICAS PRINCIPALES Y  
LA FORMA DE DIAGNOSTICAR UNA  
MICOSIS CAUSADA POR EL GENERO  
CRYPTOCOCCUS.**

## 6. Generalidades.

La Criptococosis es una infección pulmonar en humanos y animales causada por una levadura, Cryptococcus neoformans ( sinónimos: Saccharomyces neoformans, Cryptococcus hominis, Torula neoformans, Torula histolytica y Blastomyces neoformans). A su estado perfecto se le conoce como Filobasidiella neoformans la cual pertenece a la clase de los Basidiomicetos, siendo su habitat natural el excremento de paloma.

La ruta de infección en humanos y animales es por vía pulmonar debido a la inhalación de las basidiosporas, que son las esporas del estado perfecto de C. neoformans, resultando en una infección subclínica respiratoria la cual es resuelta espontáneamente por el hospedero. En aproximadamente 10% de los individuos con infección pulmonar el microorganismo pasa a la sangre, causando una diseminación en el organismo que generalmente se manifiesta por meningitis. La diseminación ocurre con mayor frecuencia en pacientes inmunodeprimidos, por lo cual está levadura es considerada como oportunista. Sin embargo, se ha encontrado infección diseminada en personas normales (Hernández, 1988).

### 6.1 Descripción del género Cryptococcus.

En tejidos, C. neoformans se desarrolla como una levadura gemante, rodeada de una cápsula. Esta estructura es obvia y lo diferencia de otras levaduras no capsuladas que pueden estar presentes en los tejidos.

A diferencia de otros hongos que producen micosis profundas, C. neoformans presenta la misma morfología (levaduras capsuladas) tanto en el estado parasitario como vegetativo, es decir, no es dimórfico.

Existen otras especies no patógenas dentro del género Cryptococcus como: C. albidus, C. laurentii, C. luteolus, C. terreus, C. unguiculatus, las cuales pueden diferenciarse de C. neoformans porque esta especie se desarrolla de 28 a 37°C y es patógena para el ratón.

Características como presencia de cápsula, forma de la célula, aspecto de la colonia, producción de ureasa, asimilación de nitratos, fermentación y asimilación de azúcares funcionan para diferenciar al género Cryptococcus de otras levaduras patógenas.

## 6.2 Diagnóstico de infección por Cryptococcus.

El diagnóstico de esta micosis se realiza usualmente por: 1) cultivo de esputo, secreción bronquial, orina, heces y sangre; 2) la observación de la cápsula en tinta china y/o 3) la demostración del antígeno criptococal en el líquido cefalorraquídeo por aglutinación en látex cuando la infección es diseminada.

La inoculación de ratones jóvenes por vía intratecal es un método auxiliar para el diagnóstico de la criptococosis cuando no se logra observar la levadura capsulada en las muestras clínicas (Hernández, 1988).

Pruebas para diferenciar Cryptococcus neoformans de otras levaduras patógenas.

### 1. Tinción con tinta china

Preparaciones con tinta china para la observación de cápsula en Cryptococcus neoformans.

Principio. Es una prueba rápida de rutina utilizada para la identificación de C. neoformans a partir de muestras clínicas en las cuales se sospecha la presencia de esta levadura.

#### Método:

- Se coloca una gota de tinta china en un portaobjetos limpio.
- Suspender una pequeña porción de muestra y mezclar con la tinta china.
- Cubrir con un cubreobjetos limpio.
- Observar al microscopio (10X o 40X) para identificar levaduras gemantes cubiertas por una cápsula.

Nota: Se sugiere la utilización de tinta china en color azul debido a una observación más clara de la cápsula en comparación al resultado obtenido usando tinta china en color negro.

#### Interpretación:

Positivo: Células gemantes de 4-20 micrometros envueltas en cápsulas de 1 a 20 micrometros, blancas y brillantes.

Negativo: Ninguna célula cubierta por cápsulas (Campbell y Stewart, 1980).

## 2. Desarrollo de C. neoformans en diferentes medios de cultivo.

a) Desarrollo en Agar Dextrosa Sabouraud.- colonias blancas o marizadas, desde crema hasta marrón, textura suave y cremosa, resbalan por las paredes del tubo que las contiene dando la apariencia de leche condensada (Rendón, 1986).

b) Desarrollo en Medio Niger (agar) ó Agar Alpiste de Staib y Senska.

El crecimiento diferencial de C. neoformans en el medio de Niger se ha usado como una prueba para su identificación, ya que es la única levadura de su género capaz de asimilar la Creatinina que se encuentra en estas semillas (Niger) produciendo un pigmento café-oscuro.

Hopfer y Groschel describieron una prueba más rápida, en la que se utiliza el componente activo del alpiste (ácido cafeico). Las levaduras, especialmente el C. neoformans, capaces de producir fenoloxidasas, producen también un pigmento marrón en medios que contienen ácido cafeico como sustrato (Koneman, 1983).

### Preparación del Medio Niger Simplificado:

Semillas de <u>Guizotia abyssinica</u> (Niger)	50 g
Agar bacteriológico	15 g
Agua destilada	1000 ml
Cloranfenicol	50 mg

### Procedimiento:

- Pulverizar las semillas de Niger en un mezclador eléctrico. Hervir por 25 minutos en 100 ml de agua. Filtrar a través de una gasa ó papel filtro.
- Adicionar 15 g de agar. Llevar a un volumen de un litro con agua destilada.
- Esterilizar en autoclave a 110°C por 25 minutos.
- Enfriar a 50°C. Adicionar cloranfenicol, el cual ya debe estar disuelto en 10 ml de alcohol absoluto.
- Homogenizar y servir en cajas petri o tubos.
- Dejar solidificar y sembrar por estría la cepa en estudio. Una prueba positiva se obtiene con el desarrollo de colonias convexas, lisas, de bordes regulares, de color café oscuro-opacas con apariencia vidriosa y húmedas debido a la gran cantidad de material capsular presente (Rendón, 1986).

c) Micobiotic.-no se desarrollan pues son sensibles a ciclohexamida.

3. Producción de ureasa.- Útil especialmente en la diferenciación entre los géneros Cryptococcus y Candida.

Todos los Cryptococcus son positivos a la producción de esta enzima. Las especies más comunes del género Candida, excepto C. krusei son ureasa negativa (Manual de Micología Médica, 1975).

#### 4. Asimilación de nitratos

Esta prueba demuestra la habilidad de las levaduras para utilizar como única fuente de nitrógeno a los nitratos, conociéndose que una cuarta parte de las levaduras los utilizan. Existen otros componentes nitrogenados, como el nitrito, etilamina y L-lisina, que pueden ser empleados como sustratos para esta prueba.

Los métodos para probar el crecimiento son similares a los que utilizan fuente de carbono, empleando medios líquidos y sólidos con base de nitrógeno en lugar de una base de carbono, los nitritos pueden ser tóxicos para las levaduras debido a que forman ácido nitroso a un pH= 6. Por esta razón el medio debe ajustarse inicialmente a un pH= 4.5. Debido a esta toxicidad, los auxonogramas son empleados para probar la utilización de nitritos y etilamina, la cual puede también ser inhibitoria. Los sustratos para la prueba de utilización de nitrógeno deberán adicionarse en solución a una concentración de 2 a 5 mM (Barnett, 1983).

Uno de los métodos recomendados en Micología para la realización de esta prueba es el siguiente:

- Prueba del Hisopo Nitrato-Zephiran

Principio. Los hisopos impregnados con  $KNO_3$ -Zephiran son usados para demostrar la habilidad de las levaduras de formar nitritos a partir de nitratos (presencia de la nitrato reductasa). La formación de nitritos es detectada por la adición de un reactivo de color. La reacción (cambio de color) ocurre en el hisopo de algodón.

### Materiales y Reactivos.

Hisopos tratados con solución bufferada de Nitratos-Zephiran.

Tubos de ensaye (10 cm X 1 cm)

Cultivos control.

Positivo: Cryptococcus albidus var. albidus

Negativo: C. neoformans

Solución A: 0.5% de alfa-naftilamina en ácido acético 5N

Solución B: 0.8% de ácido sulfanílico en ácido acético 5N.

### Solución Bufferada de Nitrato-Zephiran

KNO <sub>3</sub>	2.0 g
Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	11.7 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.14 g
Cloruro de Zephiran (solución 17%)	1.2 ml
Agua destilada	200.0 ml

### Preparacion:

- Pesar y medir cuidadosamente todos los ingredientes.
- Adicionar 1.2 ml de cloruro de Zephiran a 200 ml de agua destilada.
- Adicionar los ingredientes secos y mezclarlos hasta disolverlos completamente.

### Procedimiento de la Prueba.

- a) Los hisopos son cubiertos por algunas colonias de la levadura a prueba.
- b) Para asegurar un adecuado contacto entre el organismo de prueba y el hisopo, éste se gira en el fondo de un tubo de ensaye limpio. Incubar el tubo con el hisopo por 10 minutos a 45°C.
- c) Remover el hisopo del tubo e introducirlo en un segundo tubo conteniendo las soluciones A y B (dos gotas de cada una).

Nota: El control positivo y negativo seran sometidos a prueba al mismo tiempo que las levaduras problema.

### Interpretación:

Los controles trabajados, deberán validar la prueba.

Positivo: se desarrolla en el hisopo un color rojo brillante.

Negativo: El hisopo retiene solo el color de los organismos probados (Campbell y Stewart, 1960).

5. Fermentación y asimilación de carbohidratos (Cuadro 11).

6. Formación de Micelio.

C. neoformans carece de la capacidad de formar un micelio verdadero, esta característica de identificación se comprueba en agar Clamidospora y agar Corn Meal.

7. Prueba de Patogenicidad en ratón.

Se inoculan ratones jóvenes, aproximadamente de tres semanas de edad, por vía intratecal, este es un método auxiliar en el diagnóstico de Cryptococcus neoformans, ya que esta levadura es la única especie en su género patógena para el ratón.

### Metodología:

- Preparar la suspensión de levaduras en solución salina fisiológica estéril de un cultivo de 48 horas de crecimiento. Se realiza un conteo celular en cámara de Newbauer, para conocer el número de levaduras a inocular. Se recomienda una dilución 1:1000.

- Utilizando una jeringa de insulina, aspirar 0.02 ml de la suspensión de las células.

- Anestesiarse al ratón con éter o cloroformo.

- Colocar los dedos índice y pulgar de la mano izquierda sobre las orejas para inmovilizar la cabeza.

- Limpiar la piel con alcohol.

- Un poco hacia la línea media a través del cráneo la aguja se inserta, lentamente, rotando la jeringa como un pequeño taladro entre el dedo pulgar e índice hasta que se perciba un pequeño estirón de la aguja.

- Empujar lentamente el émbolo de la jeringa para inocular 0.02 ml de la dilución.

- Repetir la inoculación por lo menos en tres ratones.

La infección se manifiesta entre los 8 y 15 días después de la inoculación, provocando en los ratones alteraciones en su comportamiento. La muerte instantánea o durante las primeras



48 horas se debe a traumatismos causados por la inoculación (Hernández, 1988).

El material biológico obtenido, se clasifica en partes iguales, para ser utilizado como sigue:

- a) Una parte para observación de cápsula y verificar la presencia del microorganismo.
- b) Segunda parte, crecimiento en Medio Níger y SDA.
- c) Una tercera parte para corte histopatológico.
- d) Y finalmente, se dejaron algunos cerebros para tener material biológico disponible para los alumnos de Micología Médica.

### 6.3 Resultados.

Con el objeto de verificar las pruebas de diferenciación de C. neoformans con otras levaduras patógenas, se probaron 11 cepas puras de C. neoformans, una cepa de C. albicans y una cepa de Rodotorula sp., siendo estas últimas los controles negativos para las pruebas a realizar. Cabe mencionar que estas cepas patrón fueron proporcionadas por el Dr. Cervantes Olivares (Laboratorio de Micología Médica, Unidad de Posgrado, FES Cuautitlán).

En la prueba de tinción con tinta china, se puede observar la levadura capsulada de C. neoformans, no encontrándose así en los controles negativos.

El desarrollo en Medio Níger fué el siguiente: se encontró crecimiento de las tres levaduras a prueba, mostrando C. neoformans una colonia de color café oscura, la cual nos da un parámetro definido para lograr diferenciarla de otras levaduras.

En la Prueba de Ureasa la reacción positiva para C. neoformans se observó como una coloración rosa-púrpura, efecto que no se encuentra en las otras levaduras.

Para la prueba de Asimilación y Fermentación de Carbohidratos (Cuadro 10).

Con respecto a la prueba de patogenicidad en ratón, los resultados fueron los siguientes: se utilizaron 15 ratones de tres semanas de edad, de los cuales siete se inocularon con

C. neoformans var. gatti (15,000 células/ml) y siete con C. neoformans var. neoformans (13,750 células/ml), dejando uno de los ratones como control negativo de la prueba. Al octavo día de la inoculación 2 de los 15 ratones murieron, y los demás fueron sacrificados al décimo día para la obtención del cerebro, en todos ellos se observó un aumento en el tamaño del mismo, así como una coloración blanquecina. Del material biológico procesado, se encontró la presencia de microorganismos capsulados en los 14 ratones inoculados con Criptococos al realizar la tinción de tinta china, también, se obtuvo crecimiento positivo tanto en el medio Níger como en SDA, verificándose por último la presencia del microorganismo por medio de cortes histopatológicos.

Los procedimientos a realizar por los alumnos en esta práctica, son los siguientes:

- a) Cultivo de material biológico (cerebro de ratón) en medios específicos.
- b) Observación de cápsula y producción de ureasa a partir de una cepa conocida de C. neoformans.
- c) Observación microscópica de cortes histológicos de cerebro de ratón positivos a C. neoformans.

CUADRO 11.

CARACTERISTICAS DE LAS ESPECIES DE CRYPTOCOCCUS MAS COMUNMENTE HALLADAS EN MUESTRAS CLINICAS

ORGANISMO	ASIMILACIONES										FERMENTACIONES					OTRAS REACCIONES							
	GLUCUCO BACCOS	MALICO BACCOS	SUCROSA BACCOS	GLICOLICO BACCOS	EMBOBICO BACCOS	CELBIOSO BACCOS	INOSITOL BACCOS	XILOSA	RAFINO SACAROSA	TRIFENO SACAROSA	DULCITOL	GLUCUCO BACCOS	GLICOLICO BACCOS	SUCROSA BACCOS	LACTICO BACCOS	GLICOLICO BACCOS	TREHALO SACAROSA	UREASA	NITRATO BACCOS	SUDOHIFAS	DIFEREN CIAL 37°C	TUBER CULINA L	CASAJE
<u>Cryptococcus</u> <u>neoformans</u>	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	R	+	-	+	
<u>C. uniguttulatus</u>	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	
<u>C. albidus var.</u> <u>albidus.</u>	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	
<u>C. laurentii</u>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
<u>C. luteolus</u>	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<u>C. albidus var.</u> <u>diffluens</u>	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+
<u>C. terreus</u>	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+
<u>C. gastricus</u>	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+

# **PRACTICA 7**

## **HISTOPATOLOGIA**

### **OBJETIVOS:**

**EL ALUMNO CONOCERA LAS  
TINCIONES ESPECIALES PARA  
HONGOS EMPLEADAS EN  
HISTOPATOLOGIA.**

**EL ALUMNO RECONOCERA LAS  
DIFERENTES ESTRUCTURAS  
MICOTICAS ENCONTRADAS EN  
TEJIDOS.**

## 7. Generalidades.

Entre los métodos utilizados para realizar el diagnóstico de micosis se encuentra el examen Histopatológico, que tiene una doble finalidad: la observación de la respuesta microscópica del tejido afectado y la detección del agente causal en tales lesiones.

En la evaluación macroscópica de los tejidos, las infecciones micóticas pueden ser confundidas con neoplasias ó con lesiones producidas por otros agentes y la posibilidad de la presencia de una micosis es considerada hasta que se realiza la observación microscópica de la muestra. Cuando se sospeche de una infección micótica es conveniente remitir la muestra al laboratorio, para realizar el aislamiento y el examen histopatológico.

El examen histopatológico de muestras de biopsias y necropsias es una excelente herramienta para el diagnóstico de las micosis.

Debido al tamaño, características morfológicas y propiedades tintoriales, que poseen los hongos. Estos pueden ser eficientemente estudiados en los tejidos.

La eficiencia del diagnóstico histopatológico de una enfermedad micótica depende de ciertos factores, tales como: el agente involucrado, un adecuado método de coloración, el uso de coloraciones apropiadas y la labor eficiente del histopatólogo.

La morfología del agente es, en general, lo suficientemente característica para emitir un diagnóstico seguro, como en el caso de histoplasmosis, paracoccidiodomicosis, blastomicosis lobomicosis, coccidiodomicosis, criptococosis, rinosporidiosis y adiospiromicosis.

Para algunas enfermedades micóticas, como la lobomicosis y la rinosporidiosis, el examen microscópico de cortes histológicos ó frotis, es la única manera de establecer el diagnóstico, debido a que el agente etiológico de estas enfermedades no ha podido ser aislado en medios artificiales de cultivo (Chandler et al., 1980).

Por otro lado, aunque las hifas, esporas y otras formas fúngicas están a menudo distorsionadas en los tejidos por la respuesta inflamatoria y pueden ser difíciles de identificar, usualmente se pueden distinguir dos estructuras básicas:

1) una forma micelial, caracterizada por la presencia de estructuras filamentosas llamadas hifas o pseudohifas, y 2) una estructura levaduriforme o "tisular" en la que sólo se pueden distinguir células en forma de levadura.

Algunos hongos producen sólo una estructura levaduriforme en los tejidos, otros sólo una forma micelial. Es poco frecuente el hallazgo de ambas estructuras en el mismo órgano. Los hongos dimórficos, se hallan virtualmente siempre en la forma de levadura cuando se observan en tejidos.

Las levaduras se pueden identificar presuntivamente en los cortes de tejidos observando: a) el tamaño de las células individuales, b) su disposición y ubicación, y c) el número y forma de unión de las yevas (blastosporas).

Los hongos que producen hifas en los tejidos pueden identificarse presuntivamente observando: a) diámetro de las hifas, b) presencia ó ausencia de septos, y c) presencia ó ausencia de pigmentación que sugiere un miembro del grupo de hongos oscuros o dematiáceos (Koneman et al., 1983).

#### 7.1 Métodos de tinción

La coloración de rutina usada en laboratorios de Histopatología es con Hematoxilina y Eosina (H&E) la cual permite observar el tejido afectado y los hongos pueden ser caracterizados como hialinos o dematiáceos. Algunos hongos como los Aspergillus y Zigomicetos se tiñen bien con Hematoxilina Eosina; mientras que otros hongos se tiñen pobremente o no se tiñen. En algunos casos, el contorno de las células fungales no teñidas puede observarse y la presencia de una infección por hongos puede ser establecido.

En algunos casos, sin embargo, los organismos son difícilmente distinguibles de los componentes tisulares y hongos en pequeños números pueden estar ocultos con esta tinción. Cuando esta tinción nos permite observar un tejido afectado por hongos, se recomienda enviar la muestra al laboratorio de Histopatología y solicitar alguna de las tinciones especiales para hongos, entre las que se encuentran: la de Gomory Metilamina de plata (GMS), la de Gridley para hongos (GF) y la del Acido Peryódico de Schiff (PAS), las cuales son procedimientos invaluable para delinear hongos y estudiar su morfología.

La mayoría de los hongos teñidos por estos métodos son observados claramente y resultan en un contraste muy adecuado en contraposición con los tejidos adyacentes que muestran una tinción ligeramente contrastante. Se considera que el procedimiento de GMS es el mejor dentro de las tinciones especiales para hongos ya que provee un mejor contraste y frecuentemente las células fungales teñidas son refractarias a los procedimientos de GF y PAS.

Deben tomarse precauciones para prevenir el sobreteñimiento de tejidos por el procedimiento de GMS, ya que eritrocitos y núcleos desnudos pueden teñirse y provocar la apariencia de levaduras o de células levaduriformes.

Entre las limitaciones de las tinciones especiales se encuentra que al enmascarar el color natural del hongo, y por ello no son utilizadas para determinar si los elementos fungales son hialinos o dematiáceos.

La combinación de tinciones como GMS-HE han sido utilizadas en laboratorios histopatológicos con éxito (Chandler et al., 1980).

## 7.2 Material Histopatológico con el que cuenta el laboratorio.

En los laboratorios de Micología es importante disponer de cortes histológicos con estructuras fúngicas, que sirvan de referencia para comparar formas sospechosas que puedan ser vistas en nuevos casos y como valiosa ayuda didáctica para estudios propios ó para enseñar a nuevos estudiantes. Para tales efectos el laboratorio de Micología Médica de la Coordinación de Estudios de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, U.N.A.M., cuenta con las siguientes preparaciones:

### 1. Dermatofitos

- a) Biopsia de piel teñida con PAS
- b) Escamas y pelo teñidos con PAS

### 2. Malazzesia furfur

- a) Canal auditivo teñida con Gomori, en donde es distinguible la fase levaduriforme de este agente. Estas levaduras se tiñen casi de color café.
- b) Canal auditivo teñido con PAS.

### 3. Candida ssp.

a) Riñón de conejo teñido con PAS, donde se logran observar estructuras, tales como: blastosporas, pseudomicelio, micelio, todos ellos en color púrpura.

b) Riñón teñido con HE, aquí se aprecia lesión granulomatosa conteniendo células epiteliales, células gigantes y neutrofilos. Las células fungales se tiñen pobremente dentro de las células gigantes.

c) Riñón teñido con Gran, donde se aprecian claramente las blastosporas y el pseudomicelio, ambos en color oscuro.

### 4. Cryptococcus neoformans

a) Cerebro de ratón teñido con PAS, donde los Cryptococcus se colorean intensamente y algo del material que rodea las células (cápsula) es también teñido, se pueden observar células levaduriformes en gemación.

b) Cerebro de ratón teñido con Musicarmina de Mayer. Las células levaduriformes se observan de café oscuro, presentando un halo más claro que demuestra la presencia de la cápsula.

### 5. Aspergillus spp.

a) Tinción de PAS. Se notan bien teñidas las hifas de Aspergillus rodeados por el material luminoso denominado Splendore-Hoeppli.

b) Tinción de GMS. Se notan las hifas cortas teñidas intensamente y se muestran brazos dicotomos, en general, los brazos están orientados en la misma dirección.

c) Tricromica de Mason

d) PAS-Verde Luz

### 6. Coccidioides immitis

a) Tinción de GMS.- la pared de las esferulas maduras y sus endosporas se tiñen bien por GMS. Sin embargo, los contenidos de las endosporas no es tan claramente definido como en la tinción de PAS.



b) Tinción de HE.- se observa que largas esferulas intactas pueden empezar a ser fagocitadas por células gigantes. Cuando la pared de algunas esferulas está rota puede observarse que las endosporas están en proceso de liberación.

c) Tinción de PAS. La pared y contenidos internos de endosporas están bien teñidos. En contraste, la pared de las esferulas maduras no es teñida. PAS es excelente para demostrar C. immitis en tejido; la limitación es que no tiñe la pared de esferulas maduras.

#### 7. Zigomicetos.

a) Tinción de HE. Las hifas que producen estos hongos son de un diámetro grande y se tiñen bien con Hematoxilina. Se observa una zona estrecha de leucocitos polimorfonucleares (Chandler et al., 1980).

En esta práctica el alumno realizará observaciones microscópicas de cortes histopatológicos de diferentes tejidos positivos a infecciones por hongos.

# **PRACTICA 8 INMUNOLOGIA DE LAS MICOSIS**

## **OBJETIVO:**

**EL ALUMNO CONOCERA LOS  
METODOS INMUNOLOGICOS  
EMPLEADOS EN EL LABORATORIO  
PARA EL DIAGNOSTICO DE LAS  
MICOSIS.**

## 8. Generalidades.

Los hongos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, reconociéndose más de 250,000 especies, entre las cuales de 50 a 100 mil son patógenas. La patogenicidad de estos microorganismos es de naturaleza multifactorial y las características que deben reunirse para ejercer sus efectos patógenos sobre el huésped son los siguientes:

- a) colonizar la superficie de la piel.
- b) penetrar a los tejidos
- c) propagarse en el ambiente tisular
- d) resistir o interferir con los mecanismos de defensa.

Cuando la penetración es directa dentro de los tejidos del huésped, se manifiesta una mayor patogenicidad. La pérdida de la habilidad de los microorganismos para llevar a cabo cualquiera de estos pasos causan disminución de la virulencia. Algunos hongos presentan dimorfismo cuya manifestación depende de la especie y el medio de desarrollo (Valdespino, 1988).

La inmunidad natural hacia las enfermedades causadas por hongos resulta muy alta. La infección dependerá de una exposición suficiente del organismo involucrado y de la resistencia general del huésped. Esto está bien demostrado por dos categorías generales de enfermedades micóticas sistémicas. En la primera, la infección ocurre en el paciente que en una área endémica inhala un número suficiente de esporas. La mayoría de estas infecciones son asintomáticas y se resuelvan rápidamente, presentándose una resistencia específica a la reinfección. Solo en raras ocasiones la infección se torna seria (Rippon, 1974).

Por otro lado, infecciones oportunistas son causadas por organismos de baja virulencia presentes universalmente, cuyo establecimiento dependerá enteramente de la baja resistencia del huésped. Si el paciente se recupera de estas infecciones, se desarrolla una resistencia no específica.

Consideraciones meticolosas de signos, síntomas y datos epidemiológicos pueden resultar en un diagnóstico clínico adecuado de una enfermedad micótica; sin embargo, diagnósticos presuntivos deberán ser confirmados por cultivos estandar y procedimientos de laboratorio histológicos. Desafortunadamente, el diagnóstico de las infecciones micóticas no siempre puede ser a partir de ambos procedimientos.

Es por ello que los procedimientos inmunológicos pueden ser utilizados para dar una rápida y presuntiva evidencia de infección, siendo frecuentemente la primera evidencia de la existencia de una infección micótica. Se reconoce que la protección inmunológica a las infecciones por hongos esta mediada por la respuesta celular, mientras que la respuesta humoral sirve como un parámetro de diagnóstico. (Lennette, 1985).

Los tipos de pruebas inmunológicas comúnmente utilizadas para el diagnóstico y vigilancia de las micosis provocadas por hongos patógenos se muestran en el cuadro 12.

#### Materiales y Métodos.

##### Amortiguadores y Reactivos:

Buffer Salina Fosfatos	
Cloruro de sodio NaCl	8.0 g
Hidrógeno de Fosfato di-potásico K HPO	1.21 g
Dihidrógeno de Fosfato potásico KH PO	0.34 g
Agua de-ionizada	1000.00 ml

Los ingredientes son suspendidos en el agua y se mezclan hasta su total disolución. pH 7.2

##### Buffer de Veronal (Barbitone)

Acido di-etil barbitúrico (Barbitone)	
$(C_2H_5)_2C.CO.NH.CO.NH.CO$	3.32 g
Di-etil barbitone de sodio (Barbitone de sodio)	
$(C_2H_5)_2C.CO.NH.C.CONa$	25.52 g
Azida de sodio $NaN_3$	2.0 g
Agua de-ionizada	2000.0 ml

El Barbitone se disuelve en 200 ml de agua caliente de-ionizada, el barbitol de sodio se disuelve en la solución y se adiciona el agua restante, hasta completar los 2000 ml. El azida de sodio se adiciona como preservativo.

##### Solución Negro Amido

Negro de Amido (Naftaleno)	1.0 g
Metanol-ácido acético glacial-agua	5/1/4 partes

### Solucion para decolorar

Metanol	500.0 ml
Acido acético glacial	100.0 ml
Agua de-ionizada	400.0 ml

Los ingredientes son mezclados y se guardan en un frasco color ambár.

Cervantes. O.R.A. 1983.

### METODOS

#### 8.1 PRUEBAS DE INMUNIDAD HUNORAL:

##### AGLUTINACION.

Las reacciones de aglutinación y de precipitación son la base de la mayor parte de las técnicas comúnmente empleadas en el laboratorio de Inmunología. Mientras que las reacciones de precipitación son medibles en cantidad y son fáciles de ejecutar, las técnicas de aglutinación son sólo semicuantitativas. La aglutinación de los antígenos nativos insolubles ó de las partículas recubiertas por el antígeno puede evaluarse a simple vista con ó sin la ayuda del microscopio. Ventajas importantes de las reacciones de aglutinación son su alto grado de sensibilidad y enorme variedad de substancias identificables a través del uso de partículas que están recubiertas por antígeno ó por anticuerpo.

**CUADRO 12. PRUEBAS INMUNOLOGICAS  
COMUNMENTE USADAS EN EL DIAGNOSTICO  
DE MICOSIS**

MICOSIS	HUMORAL						CELULAR
	DD	FC	AF	ACF	PI	CIE	ID
ASPERGILOSIS	+	+	(+)		(+)	(+)	+
BLASTOMICOSIS	(+)	+					+
CANDIDOSIS	+	(+)	(+)	(+)	(+)	+	+
CROMOMICOSIS	(+)						
COCCIDIODOMICOSIS	+	+	(+)		(+)	(+)	+
CRYPTOCOCOSIS			(+)	(+)	+		
HISTOPLASMOSIS	+	+	(+)		+	(+)	+
MICETOMA	(+)						
PARACOCCIDIOMICOSIS	(+)	(+)				(+)	(+)
FICOMICOSIS	(+)					(+)	
ESPOROTRICOSIS	(+)	(+)	(+)				(+)

DD = DOBLE DIFUSION; FC = FIJACION DE COMPLEMENTO; AF = ANTICUERPOS FLUORESCENTES;  
ACF = AGLUTINACION DE CELULAS FUNGALES; IP = AGLUTINACION DE PARTICULA INERTE;  
CIE = CONTRAINMUNOELECTROFORESIS; ID = INTRADERMOREACCION.

+ = ACCESIBLE EN FORMA COMERCIAL

(+)= ACCESIBLE SOLO EN LABORATORIOS DE REFERENCIA O ESPECIALES.

MAYO, 1975.

Las reacciones de aglutinación pueden clasificarse en directas e indirectas (pasivas). En la técnica directa simple, un antígeno celular ó de partículas insolubles es aglutinado directamente por el anticuerpo. La aglutinación pasiva se refiere a la aglutinación de las células recubiertas de antígeno ó a las partículas inertes que son portadoras pasivas de antígenos solubles. Se tienen ejemplos de lo anterior en la fijación del látex para descubrir el factor reumatoide y la aglutinación de eritrocitos recubiertos de DNA, para la identificación de los anticuerpos anti-DNA. De manera alterna, el antígeno puede ser localizado recubriendo partículas de látex ó eritrocitos con anticuerpo purificado y practicando la llamada aglutinación revertida. Otra categoría de aglutinación involucra la aglutinación espontánea de los eritrocitos por ciertos virus (Stites et al., 1983).

#### **Técnica de aglutinación en placa.**

Las pruebas de aglutinación en placa (reacción rápida) son técnicas inmunológicas empleadas en los laboratorios como rutina para dar un diagnóstico más adecuado.

Los anticuerpos específicos para antígenos situados sobre la superficie de las células, de la índole de hongos, producen "aglutinación" ó conglomeración de células al añadirlos a una suspensión de las mismas (Weiser et al., 1977).

Ahora bien, así como los anticuerpos bivalentes pueden fijar antígenos solubles para dar complejos insolubles que precipitan, los anticuerpos también pueden establecer enlaces cruzados con las partículas antigénicas, con lo cual éstas se aglutinan ó forman grumos. Se puede conseguir aglutinación mezclando con un antisuero una suspensión de partículas antigénicas, por ejemplo levaduras. El anticuerpo se combina rápidamente con las partículas pero la aglutinación es un fenómeno mucho más lento, y la adherencia entre partículas sólo se produce cuando dichas partículas entran en contacto.

Si se añade a una suspensión de partículas antigénicas un exceso de anticuerpos, se ve que al igual que en las reacciones de precipitación, cada partícula puede quedar tan cubierta de anticuerpos que ya no hay aglutinación. Esta falta de reacción en caso de concentraciones altas de anticuerpos se llama fenómeno de prozona. Otra posible causa del fenómeno de prozona es la presencia de anticuerpos que no causan aglutinación, incluso cuando quedan unidos a las partículas.

Estos anticuerpos no aglutinantes reciben también el nombre de anticuerpos incompletos. La razón por la cual carecen de actividad aglutinante no se esclareció satisfactoriamente: tal vez los determinantes antigénicos con los cuales reaccionan se encuentren en zonas profundas de la capa que cubre la partícula, tan profundas, de hecho, que no pueda existir enlace cruzado.

Otra posibilidad es que estos anticuerpos sólo tengan movimientos limitados a nivel de su región de bisagra, con lo cual resultaría funcionalmente "monovalentes" (Tizard, 1982).

#### **INMUNODIFUSION. Simple y Doble en agar.**

La inmunodifusión en gel se pueda definir como una reacción de precipitación en un medio semisólido, en que la difusión de un antígeno y de su anticuerpo homólogo da como resultado la formación de líneas ó bandas de precipitación visibles en el lugar en donde se encuentran las concentraciones óptimas del antígeno y del anticuerpo.

En este tipo de reacciones intervienen las propiedades físicas e inmuoquímicas del sistema. Así, tenemos que la velocidad de difusión para un antígeno, ó para una población de anticuerpos, dependerá de:

a) La concentración de moléculas; por ejemplo en la inmunodifusión doble, cuando las concentraciones de los reactantes son equivalentes y sus pesos moleculares son similares, las bandas de precipitación tienen forma recta y se encuentran equidistantes de los pozos. Si no hay equivalencia en la concentración, el sistema ó los sistemas precipitantes se forman más cerca del pozo con aquel reactante cuya concentración sea menor; es decir, la velocidad de difusión es proporcional a la concentración.

b) La temperatura, ya que una temperatura elevada acelera la difusión.

c) El tamaño de las moléculas. Las moléculas más pequeñas difunden más rápido que las grandes; es decir, la velocidad de difusión es inversamente proporcional al peso molecular.

d) La forma de las moléculas. Las redondas se mueven más rápido que las de otras formas.

e) La viscosidad del medio. La velocidad de difusión de las moléculas decrece al aumentar la viscosidad del medio.



La difusión del antígeno puede alterarse además por adsorción ó reacción con el medio. La estructura del medio influye sobre el máximo tamaño de partícula que puede difundir a través de él. Usando concentraciones bajas de agar, se obtienen poros grandes que permiten la difusión de moléculas de gran tamaño, en tanto que las concentraciones altas proporcionan poros pequeños que restringen el movimiento de las moléculas grandes.

La presencia de más de una banda de precipitación en la prueba de inmunodifusión en gel, significa la existencia de varios sistemas antígeno-anticuerpo, es decir, una banda representa un solo sistema (Morilla y Bautista, 1986).

Las técnicas de difusión en gel pueden clasificarse en difusiones simple ó doble. En la difusión simple un reactante, generalmente en solución líquida, difunde en una solución gelificada del reactante complementario.

En la doble difusión, tanto la solución de antígeno como la de anticuerpo se separan inicialmente por una zona de gel, en la que posteriormente ambos reactantes difunden, y al ponerse en contacto, producirán una banda de precipitación cuando estén en la relación óptima. Si la concentración de Ag y Ac colocados en los reservorios es la que corresponde a la zona de equivalencia, la banda de precipitación estará situada aproximadamente en la distancia media que separa dichos reservorios. Cuando hay exceso de Ag o de Ac, la banda de precipitación formada estará próxima al reservorio del anticuerpo o del antígeno, respectivamente.

Este método resulta muy interesante porque permite identificar las bandas de precipitación mediante el empleo simultáneo, en el mismo esquema de reacción, de antígenos y anticuerpos conocidos. Originariamente Ouchterlony describió, de acuerdo a este hecho, tres tipos de reacciones. Las cuales fueron denominadas como reacciones de identidad, no identidad e identidad parcial (figura 8).

La difusión doble, en placa es un excelente método cualitativo para el estudio de la homogeneidad de antígenos y anticuerpos purificados. Resulta útil también para la búsqueda de impurezas, lo cual está limitado por la concentración en que las mismas se encuentren presentes, ya que la precipitación se hace visible cuando los reactivos exceden valores mínimos. Para obviar este inconveniente, en la práctica se emplean generalmente altas concentraciones de

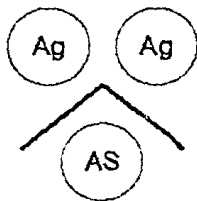
Ag y Ac, que si bien no resultan útiles para el sistema principal, pues deja de estar en las condiciones óptimas, permiten aumentar la concentración de la impureza y asegurar su precipitación (Margni, 1977).

#### Procedimiento para Inmunodifusión Doble:

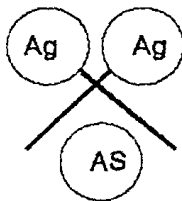
1. Disolver 1.5 g de agar purificado en 50 ml de agua destilada, añadir 50 ml de buffer Veronal caliente (56°C) con azida de sodio ya incorporada al buffer .
2. Vaciar en cajas Petri grandes (8.5 cm) 10 ml del medio para cada caja, utilizando una mesa ó tabla nivel.
3. Dejar solidificar, para lograr que el agar quede firme, se puede refrigerar por espacio de cinco minutos a 4°C aproximadamente.
4. Por cada caja, tener tres patrones y hacer los pozos con oradador (figura 9).
5. Los patrones se marcan con azul de alsacia.
6. Los orificios hechos en el agar se llenan con el antígeno en el centro y los antisueros alrededor, ó viceversa. Se recomienda anotar en un papel el esquema seguido.
7. Las cajas se colocan en una cámara húmeda y se incuba a temperatura ambiente 7 días para lograr las líneas de precipitación.
8. Después de los 7 días las placas se retiran de la caja Petri, y se dejan remojando en la Solución de Buffer Salina Fosfatos por espacio de 24 horas.
9. A las 24 horas, la solución se cambia por PBS (Solución Salina Fosfatos), limpia o nueva.
10. A las 24 horas la solución de PBS, se cambia por agua destilada y las placas se dejan aquí 48 horas.
11. Por último se colocan las placas en placas de vidrio y se colocan en una estufa para secar. Se tiñen con solución de Negro de Amido (figura 10).

NOTA: Se utiliza la solución de Salina Fosfatos, para evitar la lectura de falsos positivos (Cervantes, 1983).

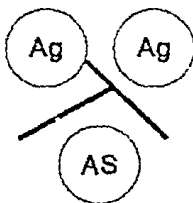
FIGURA 8. TIPOS DE PATRONES  
PRODUCIDOS EN LA INMUNODIFUSION  
DOBLE



IDENTIDAD



NO IDENTIDAD

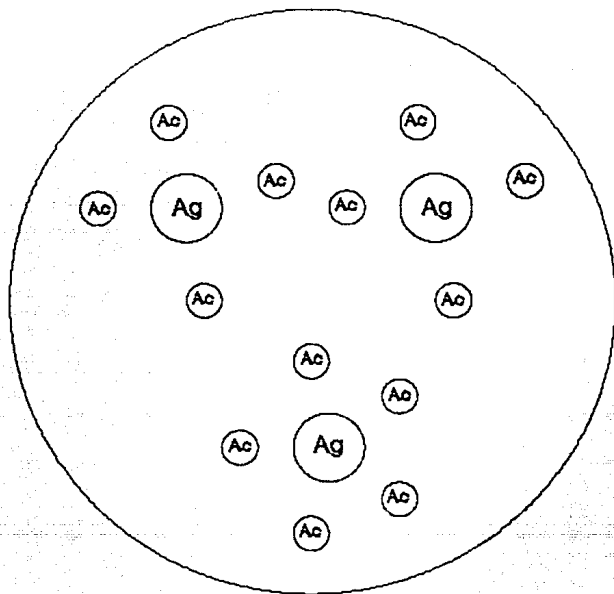


IDENTIDAD  
PARCIAL

AS• ANTISUERO

Ag• ANTIGENO

FIGURA 9.PATRON DE LA DOBLE DIFUSION EN PLACA



## ELECTROFORESIS.

Se conoce como electroforesis al movimiento de partículas cargadas bajo la influencia de un campo eléctrico. Cuando una mezcla de partículas ó moléculas que tienen diferente carga neta y diferente tamaño se colocan en un campo eléctrico uniforme, las moléculas se mueven con diferentes velocidades y como resultado ocurre una separación de estas sustancias. La velocidad de migración de una sustancia en un campo eléctrico depende de varios factores tales como carga y tamaño de la partícula, pH, fuerza iónica, viscosidad del medio y además temperatura e intensidad del campo eléctrico.

## CONTRAINMUNOELECTROFORESIS.

Está técnica es más sensible, rápida y requiere menor cantidad de reactivos, en comparación con la Inmunolectroforesis. La desventaja de esta prueba consiste en que solamente se puede usar con antígenos cargados negativamente.

En esta prueba, tanto el antígeno como el anticuerpo simultáneamente son sometidos a la acción de un campo eléctrico en un gel de agar con pH 8.6; en estas condiciones, los anticuerpos casi no tienen carga y por consiguiente no deberían tener movimiento electroforético; sin embargo, se desplazan hacia el polo negativo (cátodo) a causa del movimiento electroendosmótico (figura 11).

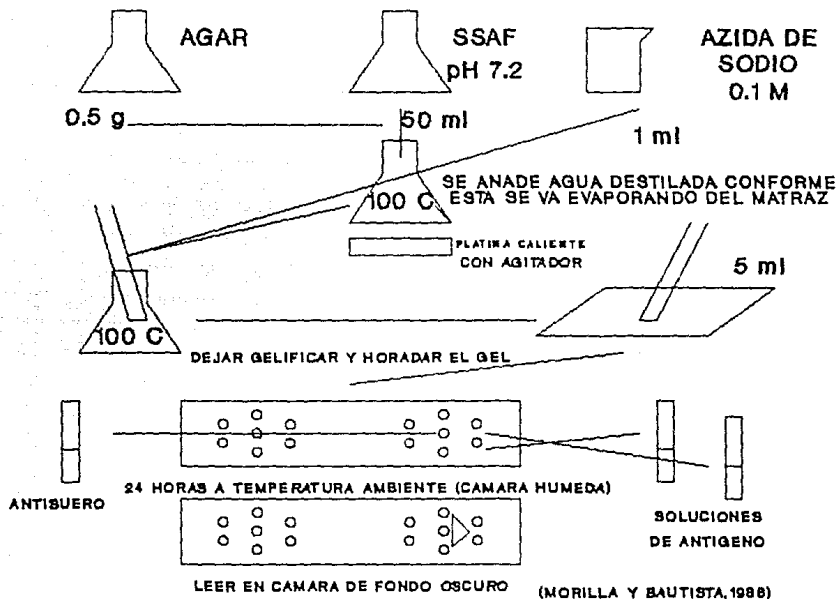
Al mismo tiempo, el antígeno de carga negativa debido a la corriente eléctrica, se dirige hacia el polo positivo (ánodo). En esta forma el antígeno y el anticuerpo se encuentran y reaccionan formando una línea de precipitación (Morilla y Bautista, 1986).

### Procedimiento:

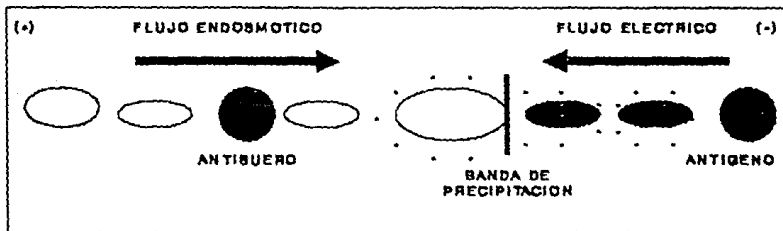
Se coloca una pequeña cantidad de agar purificado en el soporte de plástico para fijar siete portaobjetos ( ). Posteriormente se cubren con 40 ml de agar purificado, se dejan solidificar y se refrigeran a 4°C para obtener una adecuada firmeza del agar.

En cada portaobjetos se hacen perforaciones en el agar de 3 mm de diámetro y con una separación de 5 mm entre cada par (figura 12).

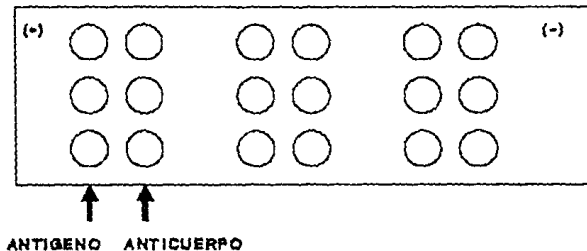
**FIGURA 10. PROCEDIMIENTO DE DOBLE DIFUSION EN GEL**



**FIGURA 11. FUNDAMENTO CONTRAINMUNOELECTROFORESIS**



**FIGURA 12. PATRON DE PERFORACIONES PARA LA PRUEBA DE CONTRAINMUNOELECTROFORESIS.**



(MORILLA Y BAUTISTA.1986).

Las perforaciones se van llenando con los reactivos correspondientes utilizando pipetas Pasteur. La placa se coloca en una cámara para electroforesis, la cual contiene 500 ml de la solución Buffer Veronal por cada compartimiento, con el suero al ánodo y los antígenos al cátodo. Debe evitarse el contacto del gel con el electrolito, se debe tener una corriente de 2 mA aproximadamente 50 minutos. Después, las placas son enfriadas a 4°C por 15 minutos para leer las líneas de precipitación, con cuidado se remueven las placas del soporte de plástico, finalmente se lavan y se tiñen (Cervantes, 1983).

#### FIJACION DE COMPLEMENTO.

Si se forman complejos inmunes sobre las superficies de los eritrocitos, las membranas de los globulos rojos son destruidas y hay hemólisis. Se puede aprovechar esta reacción para medir la cifra de anticuerpos en un suero. Entre las pruebas de este tipo, la más importante es la prueba hemolítica de fijación del complemento (PFC). La PFC es una de las técnicas inmunológicas de más amplia aplicación. Una vez preparados y estandarizados los reactivos necesarios, la PFC permite identificar muchas interacciones inmunes. El punto final de la reacción es fácil de leer, a diferencia de las pruebas de hemaglutinación, no se depende de la precipitación de los eritrocitos; por otro lado, es menos probable el fenómeno de prozona. Además, la prueba de fijación de complemento no requiere disponer de suspensiones purificadas de antígenos, razón por la cual se utiliza frecuentemente para una serie de diagnósticos. El más grave inconveniente de esta prueba es su complejidad, sobre todo respecto a la estandarización y preparación de los reactivos (Figura 13), (Tizard, 1982).

#### INMUNOFLUORESCENCIA

Es frecuente el empleo de fluorocromos para el marcado de anticuerpos; el colorante más utilizado es probablemente el isotiocianato de fluoresceína (ITCF). El ITCF es un compuesto amarillo, que se combina fácilmente con las inmunoglobulinas y no altera su capacidad de reacción. Cuando se expone a luz ultravioleta de 290 a 145 micrometros de longitud de onda, emite luz verde visible, de aproximadamente 525 micrometros.

Las inmunoglobulinas marcadas con ITCF pueden utilizarse en diversas técnicas, entre las cuales destacan las pruebas directas e indirectas de anticuerpos fluorescentes.

#### Prueba Directa de Anticuerpos Fluorescentes.



Esta prueba permite reconocer la presencia de un antígeno. Es posible marcar con ITCF el anticuerpo correspondiente a un antígeno dado, por ejemplo una bacteria, hongo o un virus. Un corte de tejido o un frotis que contenga dicho microorganismo se incuba en presencia del antisuero marcado, después de lo cual se lava para eliminar el anticuerpo que no fue fijado.

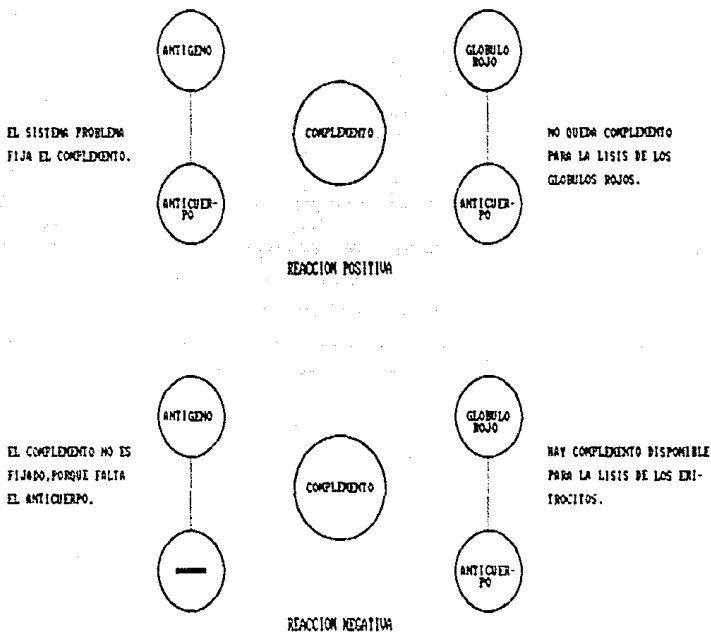
La observación en campo obscuro bajo un microscopio provisto de luz ultravioleta, muestra una intensa fluorescencia a nivel de las partículas antigénicas que fijaron el anticuerpo marcado.

Prueba Indirecta de anticuerpos fluorescentes. La prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes permite identificar y medir los anticuerpos en el suero, o los antígenos en los tejidos o en los cultivos de células. Cuando se busca un anticuerpo el antígeno se utiliza bajo forma de un frotis, un corte de tejido o un cultivo de células. El antígeno se incuba en presencia de un suero que pueda contener anticuerpos contra dicho antígeno, y el suero se lava luego, dejando los anticuerpos unidos con el antígeno. Es posible observar estos anticuerpos fijados incubando el frotis con un suero antiglobulina marcado con ITCF. Luego se quita la antiglobulina por lavado, y se examina el frotis; la fluorescencia indica que había anticuerpos específicos en el suero problema. Su cantidad se establece por estudio de diluciones crecientes de suero frente a un número variable de preparado antigénico.

La prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes tiene varias ventajas sobre la técnica directa. Puesto que cada molécula de anticuerpo unida al antígeno puede a su vez fijar varias moléculas marcadas de antiglobulina, la fluorescencia resulta mucho mayor que en la prueba directa. Asimismo, utilizando sueros antiglobulina propios de cada variedad de inmunoglobulina, es posible saber qué clase de anticuerpo específico se encuentra presente en el suero (Tizard, 1982).

FIGURA 13.

## FUNDAMENTO DE LA PRUEBA DE FIJACION DE COMPLEMENTO



## 8.2 PRUEBAS DE INMUNIDAD CELULAR.

### REACCION CUTANEA DE HIPERSENSIBILIDAD TARDIA

La hipersensibilidad tardía cutánea puede ser medida en el hombre o los animales de laboratorio utilizando numerosas sustancias antigénicas. En general, las pruebas sirven para evaluar dos tipos de respuestas específicas e inespecíficas. En las primeras se busca conocer la sensibilización previa del sujeto hacia el antígeno en cuestión; en las segundas, la capacidad del mismo de responder frente a antígenos (conocidos o totalmente nuevos) con una reacción de inmunidad celular.

Este tipo de prueba puede ser de utilidad diagnóstica solamente o tener también un valor pronóstico en el caso de enfermedades infecciosas, como por ejemplo: tuberculosis, lepra, Chagas, micosis varias, etc. En el caso de enfermedades alérgicas, la prueba cutánea es por ahora indispensable antes de la administración de medicamentos sospechosos en individuos alérgicos aun si ser segura en todos los casos.

Otra utilidad que se da a este tipo de pruebas, es que permiten el estudio de las áreas endémicas, aunque su valor diagnóstico de infección actual se limita a los siguientes casos: 1) cuando se comprueba en lactantes; 2) cuando se asiste al viraje de la reacción de negativa a positiva y 3) cuando aparece en una persona que no ha habitado anteriormente en zona endémica y que no presenta reacciones fuertemente positivas con otros antígenos fúngicos.

Entre las ventajas que se tienen es que pueden comprobar reacciones cruzadas entre los diversos agentes causales de micosis sistémica a causa de la existencia de antígenos semejantes. Sin embargo, las pruebas son más intensas con el antígeno homólogo: por lo tanto, es aconsejable realizar las intradermoreacciones con todos ellos y considerar positivo sólo a aquel que proporciona la pápula más extensa. La frecuencia de las reacciones cruzadas disminuye con el empleo de antígenos diluidos; por ello se aconseja utilizar la dilución óptima, que es la mínima concentración del reactivo que proporciona un elevado porcentaje de pruebas cutáneas positivas en sujetos que sufrieron la infección y en animales infectados experimentalmente.

Por otro lado, los estudios histológicos de las pruebas cutáneas positivas han demostrado que el infiltrado está

constituido por cúmulos de células mononucleares, en especial linfocitos, que se agrupan alrededor de los vasos sanguíneos y los anexos cutáneos, tanto en la dermis como en la hipodermis; se observa además vasodilatación y edema. Con la paracoccidioidina y, en algunos casos, con la coccidioidina, se comprobó eosinofilia.

En las formas evolutivas de las micosis sistémicas, el resultado de las intradermoreacciones tiene gran interés pronóstico, pues su negatividad es índice de gravedad y de tendencia a la diseminación hematógena.

En la coccidioidomicosis se ha demostrado que el empleo de diversas diluciones de coccidioidina hace de la reacción cutánea una prueba, en cierta forma cuantitativa, que permite medir la hipersensibilidad, la cual guarda un estrecho paralelismo con la capacidad del sujeto para resistir la infección (Margni, 1977).

#### Procedimiento para Pruebas Cutáneas (Intradermoreacción):

1. Los antígenos a utilizar se aconseja liofilizarlos y guardarlos a 4°C y reconstituirlos poco antes de su uso.
2. Para la administración intradérmica, usar jeringa de insulina con 0.2 ml del antígeno.
3. Medir previamente el grosor de la piel a inocular con la ayuda del Vernier.
4. Aplicar el antígeno subcutáneamente
5. Las intradermoreacciones son leídas a las 24, 48 y 72 horas y su resultado se expresa en milímetros del área de induración.

Actualmente se aconseja realizar una primera lectura entre las 2 y 6 horas, para excluir cualquier posibilidad de un resultado falso-positivo; igualmente, hay casos raros en que estas pruebas se tornan positivas 4 o 5 días después de su realización.

Estas reacciones de hipersensibilidad retardada se hacen presentes entre los 15 y los 40 días siguientes a la infección, se mantienen positivas muchos años, habitualmente toda la vida, pero con frecuencia declinan después de los 60 años. La reacción cutánea positiva indica, por lo tanto, infección actual o pasada (Margni, 1977).

### 8.3 RESULTADOS

De las técnicas antes mencionadas, se probaron las siguientes: Inmunodifusión Doble, Aglutinación de células Fungales y Contraimmunoelectroforesis.

Inmunodifusión Doble.- los antígenos utilizados fueron A. fumigatus, C. albicans cepa B y C. albicans cepa A y los antisueros correspondientes, obtenidos ambos en el laboratorio de Micología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Campo I. U.N.A.M. De acuerdo al resultado de las placas, se logro observar que estos antígenos y antisueros funcionan adecuadamente.

Aglutinación de células fungales.- la realización de esta prueba requirió de: 1) suero hiperinmune contra C. albicans, 2) suspensión de levaduras de C. albicans y 3) suero negativo. La aglutinación se llevó a cabo en portaobjetos limpios al poner en contacto el suero hiperinmune y la suspensión de levaduras. El utilizar un suero negativo nos sirvió como control negativo con el objeto de verificar la diferencia entre una placa que presenta aglutinación y una placa que no la presenta.

Contraimmunoelectroforesis.- para esta prueba se utilizaron antígenos de Aspergillus fumigatus (somático y metabólico), C. albicans y los antisueros correspondientes. Se realizaron 63 patrones distintos, obtenidos de las diferentes combinaciones que logramos hacer con estos antígenos y antisueros.

Las pruebas anteriores son las que los alumnos de la materia llevarán a cabo en esta práctica, incluyendo la prueba de intradermoreacción.

# BIBLIOGRAFIA

## BIBLIOGRAFIA

- Ajello, L.; Georg, K.L.; Kaplan, W. and Kaufman, L.: Laboratory Manual for Medical Mycology. Public Health Service, U.S.A. 1975.
- Alexopoulos, C.J. Introducción a la Micología. Ed. Universitaria. 2a. edición. Buenos Aires. 1976.
- Barnett, J.A.; Payne, R.W. and Yarrow, D.: Yeast: Characteristics and Identification. Cambridge University Press. Gran Bretaña. 1983.
- Bonifaz, A. Micología Médica Básica. Ed. Francisco Mendez Cervantes. Mexico. 1990.
- Booth, Methods in Microbiology. Academic Press. London. 1971.
- Campbell, C.M. and Stewart, L.J. The Medical Mycology. John Wiley and Sons. INC. U.S.A. 1980.
- Cervantes, O.R.A. Studies on antigens of Aspergillus, their use in Veterinary Mycology. University of Glasgow. 1983.
- Chandler, W.F.; Kaplan, W. and Ajello, L.A. Colour Atlas and Textbook of the Histopathology of Mycotic Diseases. Wolfe Medical Publications, London. 1980.
- Dawson, O.C. Identification of Candida albicans in primary culture. Sabouraudia. Journal of the International Society for Human and Animal Mycology. 1 (1). 214-219. 1961.
- Divo, A. Microbiología Médica. 2a. edición. Interamericana. Mexico. 1971.
- Garcia, T.R. y Cordoba, P.R. Manual Ilustrado de técnicas de laboratorio utilizados en Bacteriología y Micología Veterinaria. ISBN. Mexico. 1988.
- Hernández, G. Ma. R. Biotipificación de cepas de Filobasidiella (cryptococcus) neoformans y gatti, aislados a partir de casos clínicos humanos. Tesis Lic. Q.F.B. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. U.N.A.M. 1988.

- Hernández, C. S.; Martínez, M. L.J. Evaluación del medio de cultivo Bismuto-Glicina-Glucosa levadura (BI-GGY) y agar Sulfito Bismuto para la identificación de especies del género *Candida* más comunes en el humano. Tesis Lic. Q.F.B. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. U.N.A.M. 1985.
- Instituto Politecnico Nacional. Manual de Micología Médica. Mexico. 1975.
- Jawets, E.; Melnick, J.L.; Adelberg, E.A. Microbiología Médica. 12a. edicion. Ed. El Manual Moderno. Mexico, D.F. 1987.
- Jungerman, F.P.; Schwartzaman, M.R. Micología Médica Veterinaria. Ed. Continental, S.A. Mexico. 1977.
- Kazuo, I. Recent Advances in Medical and Veterinary Mycology. Ed. University Park Press. Tokyo. 1975.
- Koneman, E.W.; Allen, S.D.; Dowell, V.R.; Sommers, H.M. Diagnóstico Microbiológico (Texto y Atlas Color).Ed. Médica Panamericana. Mexico. 1983.
- Laskin, A.I. and Lechevalier, H.A. Handbook of Microbiology CRC Press. U.S.A. 1963.
- Lennette, E.H. Manual of Clinical Microbiology. 4a.edicion. Ed. American Society for Microbiology. Washington, D.C. U.S.A. 1985.
- Manual Bioxon
- Margni, A.R. Inmunología e Inmunoquímica. 3a. edición. Ed. Panamericana. Buenos Aires.
- Morilla, G.A. y Bautista, R.C. Manual de Inmunología. Ed. Diana. Mexico. 1986. 52-53, 64-66.
- Odds, F.C. *Candida* and Candidosis. Ed. Leicester University. London. 1979.
- Odds, F.C. and Abbott, A.B. A simple System for the presumptive identification of *Candida albicans* and differentiation of strains within the species. Sabouradia. December, 1980. 18 (4). 301-317.



- Rendón, R. M. C.J. Aislamiento de Cryptococcus neoformans a partir de excretas de paloma y gallina. Tesis Lic. Q.F.B. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. U.N.A.M. 1986.
- Rebell, G. and Taplin, D. Dermatophytes, Their recognition and identification. 2a. edición. University of Miami Press. U.S.A. 1974.
- Rippon, J.W. Medical Mycology the Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes. Ed. W. B. Saunders Company. U.S.A. 1974.
- Roberts, G.D.; Horstmeier, C.D.; Land, G.A. and Foxworth, J.H. Rapid Urea Broth Test for Yeast. Journal of Clinical Microbiology. June. 1978. 7 (6). 584-588.
- Stites, P.D.; Stobo, D.J.; Fundenberg, H.H.; Wells, V.J. Inmunología Básica y Clínica. 4a. edición. Ed. El Manual Moderno, S.A. de C.V. Mexico. 1983. 366-367, 3875-377.
- Tizard, R.I. Inmunología Veterinaria. Ed. Interamericana. Mexico. 1982. 136-138, 335-336.
- Valdespino, P.A. Extracción del principal Ag de pared celular de C. albicans y preparación del suero hiperinmune para su diagnóstico. Tesis Lic. Q.F.B. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. U.N.A.M. 1988.
- Webster, J. Introduction to Fungi. 2a. edición. ED. Cambridge University. Inglaterra. 1986.
- Weiser, S.R.; Myrvik, N.Q.; Pearsall, N.N. Inmunología. Ed. Interamericana, S.A. Mexico. 1977. 117-118.
- Zimmons, B.L. and Roberts, G.D. Rapid Selective Urease Test for presumptive Identification of Cryptococcus neoformans. Journal of Clinical Microbiology. September, 1979. 10 (3) 380-381.