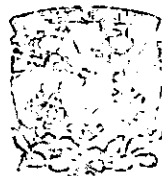


78



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES FACULTAD DE QUIMICA

ELABORACION DE UNA MICROMICOTECA DE LOS HONGOS CONTAMINANTES Y PATOGENOS DE IMPORTANCIA EDUCACIONAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

MARTHA PATRICIA NERI PAEZ

279886



MEXICO, D. F.

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente Prof. GUTIERREZ RAMOS ABEL.

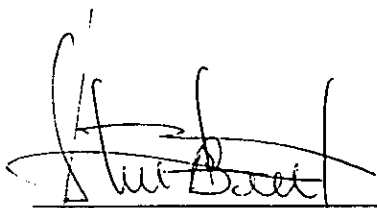
Vocal Prof. TSUZUKI REYES MARIA GUADALUPE.

Secretario Prof. BONIFAZ TRUJILLO JOSE ALEXANDRO.

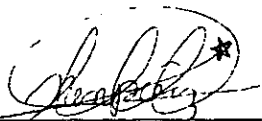
1er. Suplente Prof. GONZALEZ IBARRA MISAEI.

2do. Suplente Prof. HERNÁNDEZ GOMEZ LUCIANO.

Sitio donde se desarrolló el tema: Cepario, Edificio A, Laboratorio 1C, Facultad de Química.



José Alexandro Bonifaz Trujillo.
Asesor



Martha Patricia Neri Páez
Sustentante

Dedicatoria:

*A Dios el cual hace el milagro de la vida
y que me ha brindado la oportunidad de vivir*

*A mis padres que con cariño,
y amor guían mi camino*

*Gracias papá por que con mano firme
has forjado mi carácter que me ha ayudado
a tener confianza en todo lo que emprendo.*

*Gracias mamá por que con tus palabras
me has brindado el apoyo que más he
valorado y que en los tiempos difíciles
has sido mi fortaleza.*

*A mis hermanos, Edgar y Hugo
de los cuales he recibido
ese cariño invaluable.*

Agradecimientos:

*A la Facultad de Química, que me
brindó las herramientas necesarias
para hacerle frente a la vida.*

*A mis amigas de toda la vida
Sonia, Lilia y Jaqueline.*

*A mis amigos Bertín, Luis, Francisco,
Lety, Katy, Iris, Nallely, Marcos,
Valeria y Mary.*

*A mis maestros Miguel Angel y Rosalinda
de los cuales he aprendido mis primeras
letras y el valor de la amistad.*

*Al cepario de la Facultad de Química
por el apoyo recibido, en especial a los
profesores Luciano y Mariantonieta.*

*A los señores laboratoristas de los
laboratorios A1 y C1 por su cooperación
en la elaboración de ésta tesis.*

CONTENIDO:

<i>Introducción</i>	1
<i>Objetivo</i>	3
<i>Cap. I Antecedentes</i>	3
<i>Generalidades</i>	4
<i>Hongos contaminantes</i>	15
<i>Dermatofitos</i>	24
<i>Hongos levaduriformes</i>	28
<i>Hongos patógenos</i>	32
<i>Cap. II Materiales y métodos</i>	38
<i>A. Microorganismos</i>	38
<i>B. Medios y condiciones de cultivo</i>	40
<i>C. Técnica de microcultivo</i>	42
<i>D. Tinciones especiales</i>	44
<i>Cap. III Resultados</i>	45
<i>Cap. IV Discusión</i>	53
<i>Cap. V Conclusión</i>	55
<i>Anexo</i>	57
<i>Bibliografía</i>	61

Introducción:

Durante la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo se estudian materias básicas que sirven de apoyo para lograr comprender a materias más específicas; en ellas se enseña a utilizar a las matemáticas, a la física y a la computación como herramientas útiles para el desempeño de nuestro futuro desarrollo profesional, se enseña a trabajar con sustancias agresivas, a manipular a la materia en forma cualitativa y cuantitativa.

Más adelante se enseña la organización, estructura y funcionamiento de la unidad funcional básica de la vida, la célula, después se estudia cada uno de los órganos, aparatos y sistemas de lo que se encuentra constituido un ser humano, sus alteraciones fisiológicas por factores internos y externos, por lo que se estudian a los microorganismos que logran algunas de dichas alteraciones, aprendiendo como se desarrollan dependiendo del microambiente en el que se encuentran, por lo que es importante conocer como y donde se desarrollan, pudiendo interrumpir su crecimiento, previniendo o combatiendo dichas alteraciones, utilizando al microscopio como una de las herramientas necesarias para dicho estudio por lo que se conoce y se enseña a cuidarlo.

Algunos de estos microorganismos no son del todo perjudiciales al hombre, hay algunos que son aprovechados en su beneficio, ya sea en su vida cotidiana, a nivel médico o en forma industrial.

Una vez que se conoce ésta información básica, podemos ingresar al estudio de materias más específicas, dentro de las cuales se encuentra la Micología-que es una ciencia integral y vasta, y en particular la mayoría de los padecimientos que en esta ciencia se estudian, quedan en el área de la dermatología; sin embargo, tienen una gran importancia en las diversas especialidades, como la medicina interna, neumología, alergia, entre otras, en donde el QFB juega un papel muy importante en el diagnóstico diferencial de diversos padecimientos.

Las micosis son los padecimientos que se observan con mayor frecuencia, en nuestro país, sobre todo en ésta época en los que se observan grandes migraciones y constantes cambios ecológicos.

Cuando se inicia el estudio de los hongos no se cuenta con una vasta experiencia en cuanto a la preparación de laminillas se refiere, ya que solo se cuenta con la práctica adquirida en microbiología general; el cual no es suficiente para generar preparaciones que sirvan de soporte académico en el tiempo asignado al laboratorio de Micología ya que son necesarias preparaciones en laminillas que muestren claramente las características microscópicas de cada una de las cepas por lo cual la elaboración de ésta "Micro laminoteca" tiene como propósito dar un apoyo a la materia de Micología proporcionando una colección de laminillas de cada una de las cepas que se estudiarán a lo largo de todo el semestre, donde se podrán observar con claridad cada una de las estructuras y características más importantes.

Objetivo:

Preparar una laminoteca de los hongos contaminantes, filamentosos, levaduriformes, oportunistas y patógenos al hombre, para dar un apoyo a la enseñanza de la materia de Micología, en la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo.

Antecedente:

Por el momento no se tiene algún reporte de alguna otra institución que cuente con una micromicoteca como apoyo académico de este tipo lo cual no quiere decir que en algún laboratorio designado a la enseñanza de la Micología, no cuenten con un apoyo como este sin haberlo reportado

Objetivo:

Preparar una laminoteca de los hongos contaminantes, filamentosos, levaduriformes, oportunistas y patógenos al hombre, para dar un apoyo a la enseñanza de la materia de Micología, en la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo.

Antecedente:

Por el momento no se tiene algún reporte de alguna otra institución que cuente con una micromicoteca como apoyo académico de este tipo lo cual no quiere decir que en algún laboratorio designado a la enseñanza de la Micología, no cuenten con un apoyo como este sin haberlo reportado

Generalidades

Los hongos constituyen un complejo y fascinante grupo de organismos; viven en los medios más variados y sólo algunos son necesariamente parásitos de mamíferos, pero también hay patógenos de vegetales, insectos (entomógenos) o de otros hongos (micoparásitos). En seres humanos hay micosis como la tiña de pies y candidosis que se consideran micosis muy frecuentes.

Los hongos mejor conocidos por todos son los macroscópicos, denominados también setas u hongos macroscópicos, con tamaño, forma y color de lo más variado. Por la belleza que guardan los hongos, muchos se han usado con fines estético y ornamental. Son saprófitos o parásitos, es decir, pueden nutrirse de materia orgánica inerte o de organismos vivos. Cuando el parásito, en este caso el hongo, ocasiona una enfermedad declarada en cualquier individuo expuesto, se le llama patógeno. Algunos hongos se asocian con otro organismo para nutrirse mutuamente (simbiosis) como los líquenes, combinación de hongos y algas, así como las micorrizas, asociaciones de hongos y raíces de plantas, que sirven para incrementar la absorción de nutrientes del suelo.

Los hongos tienen gran importancia para conservar el equilibrio de la naturaleza, pues desintegran casi todos los restos orgánicos, reciclando los elementos químicos; intervienen en la producción de humus del suelo, muy importante para su fertilidad; algunos hongos se encuentran disponibles incluso para programas de control biológico.

Por sí mismos, los hongos sirven como alimento o se utilizan en la elaboración de otros; por ejemplo, pan, vino, cerveza (*Saccharomyces cerevisiae*) y quesos como el Roquefort y Camembert (*Penicillium roquefortii*, *P. camembertii*); se usan para producir salsa de soya (*Rhizopus oligosporum*), fermentar la mandioca o yuca (*Corynebacterium sp* y *Geotrichum candidum*) y producir tapioca; se utilizan en procesos industriales como la producción de ácido cítrico (*Aspergillus niger*); también sirven para elaborar antibióticos como la penicilina (*Penicillium notatum*, *P. chrysogenum*), las cefalosporinas (*Cephalosporium sp*), griseofulvina (*Penicillium griseofulvum*) y ácido fusídico (*Fusidium sp*, *Mucor sp*), así mismo producen hormonas y enzimas. Por sus usos en la industria se ha desarrollado mucho la ingeniería genética, sobre todo en levaduras (principalmente *S. cerevisiae*). Por otra parte, pueden ser una seria amenaza para los cultivos vegetales; pueden destruir maderas, pieles, telas, obras de arte, lubricantes, alimentos de consumo humano o animal (biodegradación). En la ganadería pueden ocasionar grandes pérdidas económicas por enfermedades digestivas, abortos, dermatosis o micosis sistémicas.

En los seres humanos la micopatología es variada. Al envenenamiento producido por la ingestión de hongos se llama micetismo. Se conoce como micotoxicosis a la alteración producida por la ingestión de alimentos que contienen metabolitos o sustancias precursoras de toxinas de hongos como las aflatoxinas (*Aspergillus flavus* y otros) que se desarrollan sobre maíz, cacahuates y otros sustratos utilizados como alimentos para seres humanos o animales; éstas son sustancias muy activas que pueden originar hepatomas en animales de laboratorio

y se cree que producen cáncer de hígado en seres humanos. También se pueden producir fenómenos alérgicos de hipersensibilidad en personas normales o atópicas, fundamentalmente asma y rinitis (*Penicillium, Aspergillus*). (1,2,3,4,5)

Los hongos son un grupo muy diverso de eucariontes con núcleos bien organizados, cuya membrana nuclear está bien definida.

Existen dos tipos de células fúngicas, las somáticas, que tienen núcleos muy pequeños y se dividen por mitosis, y las reproductoras, que tienen núcleos mucho más grandes y se dividen por meiosis. Casi siempre son pluricelulares, pero también hay unicelulares como la mayoría de las levaduras; poseen mitocondrias y sistema endomembranoso (retículo endoplásmico y aparato de Golgi).

La membrana celular basal está bien organizada y contiene gran cantidad de esteroides, particularmente ergosterol. La pared celular básicamente está formada por quitina (N-acetil glucosamina), celulosa, glucanas y mananas, estos compuestos dan rigidez a la célula y son de importancia en la taxonomía y propiedades antigénicas. No poseen cloroplastos, por lo que no son fotosintéticos; su nutrición es a base de absorción de sustancias orgánicas simples o elaboradas, realizándolo, ya sea como saprófitos o como parásitos. Debido a que no pueden manufacturar sus propios nutrientes son heterótrofos; su fuente primordial para su crecimiento y desarrollo es H₂O, sales de nitrógeno y de carbohidratos (glucosa, sacarosa y maltosa, entre otros) y necesitan de los iones inorgánicos más comunes, pueden sintetizar vitaminas que le son necesarias para el crecimiento y

su reproducción, pero hay especies que llegan a ser deficientes en éstas y las requieren tomar del medio externo. Para su crecimiento tienen un rango de

temperatura entre 20 y 30°C, mientras que los hongos oportunistas y patógenos pueden crecer entre 35 y 40°C. A diferencia de las bacterias los hongos son acidófilos, siendo el pH óptimo de 5.6 para la mayoría. (3,5)

Los hongos se clasifican en el reino *Fungae* siguiendo la siguiente distribución: (3,7,14,15,16)

TABLA 1.

Reino	División	Subdivisión	Clase
<i>Fungae</i> o <i>Mycetae</i>	<i>Gymnomycota</i>	<i>Hongos acuáticos o inferiores</i>	<i>Zygomycetes</i> <i>Trichomycetes</i>
	<i>Mastigomycota</i>		
	<i>Amastigomycota</i>	<i>Ascomycotina</i>	<i>Ascomycetes</i>
		<i>Basidiomycotina</i> <i>Deuteromycotina</i>	<i>Basidiomycetes</i> <i>Deuteromycetes</i> o <i>Fungi imperfecti</i>

Los *Deuteromycetes* o *fungi imperfecti* son la clase de mayor interés médico, por incluir la mayor parte de hongos patógenos y oportunistas, por lo que se cita la siguiente tabla de clasificación: (3)

TABLA 2.

Clase	Subclase	Orden	Familia
<i>Deuteromycetes</i> o <i>Fungi imperfecti</i>	<i>Blastomycetidiæ</i>	<i>Sporobolomycetales</i>	
		<i>Cryptococcales</i>	<i>Cryptococaceae</i>
	<i>Coelomycetidiæ</i>	<i>Sphaeroidales</i>	
		<i>Melanconiales</i>	<i>Moniliaceae</i> <i>Dematiaceae</i> <i>Tuberculariaceae</i>
	<i>Hyphomycetidiæ</i>	<i>Agonomycetales</i> o <i>Mycelia sterilia</i>	

Estructuras somáticas

La mayoría de los hongos tanto macroscópicos como microscópicos, están formados por estructuras filamentosas, por lo tanto a su unidad funcional se le denomina hifa o filamento, y al conjunto de ellas micelio o talo.

Por su origen las hifas se dividen en dos tipos, en hifas verdaderas (en hongos filamentosos) y pseudohifas (en hongos levaduriformes).

Por su función el micelio se divide en vegetativo, que asegura el desarrollo, nutrición, fijación y edificación de la parte reproductora, y reproductivo, que es donde se forman los órganos, y estructuras de reproducción. Por su forma el micelio puede ser: filamentoso o unicelular (en levaduras). Por su diámetro puede ser macrosifonado o microsifonado; el micelio es pigmentado si posee un

pigmento del tipo melánico (hongos dematiáceos) o es hialino si carece de pigmento; el micelio es septado si tiene divisiones o es cenocítico si no las tiene.

Microscópicamente las hifas pueden observarse de diferente forma, ya sea en forma de zarcillo, espiral, cuerpos nodulares, candelabro fávico, pectinadas, rizoides, coremium o en forma de raqueta. (3,4,7,14,15,16)

Estructuras reproductoras

Los hongos siempre se reproducen por esporas, las cuales pueden ser sexuales o asexuales. Si no hay esporas se habla de micelio estéril.

La reproducción sexual o perfecta (hongos teleomorfos) tiene tres procesos: fusión de protoplasma de órganos sexuados o plasmogamia, fusión nuclear o cariogamia y meiosis. Puede ser heterotálica, cuando existen los sexos + (donadora) y - (receptora) en talos separados u homotálica cuando la reproducción perfecta se realiza en un solo talo. Las esporas sexuales son: Basidiosporas (unicelulares y haploides), zigosporas (unión de dos hifas sexuadas diferenciadas (+ y -) y ascosporas producidas por meiosis, y se forman a partir de una bolsa o asca que produce un número determinado y característico de esporas; las ascas pueden ser de cuatro tipos: ascostromas, apotecios, cleistotecios y peritecios.

La reproducción asexual o imperfecta es muy importante porque es la forma de propagación de la especie y es de gran utilidad para la tipificación de las especies de hongos, las formas de reproducción asexuada clasificadas

tradicionalmente son: talosporas (taloconidias), conidias y esporangiosporas (endoconidias).

Las taloconidias se dividen en cinco subgrupos: artrosporas (artroconidias), blastosporas (blastoconidias), clamidosporas (clamidoconidias), dictiosporas (dictioconidias) y aleuriosporas (aleuroconidias). Las conidias, pueden ser macro o microconidias y las endosporas son esporas que se encuentran dentro de una membrana o esporangio.

Los hongos poseen estructuras especializadas, la mayoría son las que tienen como función la formación de conidias (conidiogénesis), los principales ejemplos son: conidióforo, que es una prolongación del talo que genera a las conidias, el esterigma que es una pequeña ramificación de la hifa de donde nacen las esporas o conidias, la fiálide que es una estructura que nace del micelio, esporangióforo, hifa especializada que sostiene al esporangio, vesícula o prolongación del conidióforo y esporangio. (3,4,7,14,15,16)

Conidiogénesis

Las conidias pueden ser de origen blástico o tálico.

Blástico: durante el proceso de maduración hay un proceso de síntesis y lisis (neoformación) de la pared celular al momento de producir las conidias blásticas; se forma el septo después del proceso y ocurre una separación por esquizólisis.

Tálico: ocurre un proceso de transformación del material genético en el extremo a ser conidio; el septo se forma antes del proceso de división, ocurre la separación, la cual puede ser por rexólisis o esquizólisis.

Los conidios pueden ser, de acuerdo a su división:

Blásticos: levaduras.

Haloblásticos: participan las dos partes completas de la pared celular del hongo.

Enteroblásticos: participa la capa interna solamente durante la gemación y luego se regenera la doble pared.

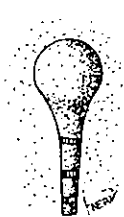
Tálicos: de micelio.

Halotálico: participan las dos partes de la pared.

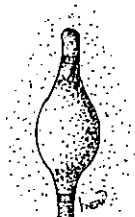
Haloártico: En la formación de éstos artículos existen las dos partes de la pared fúngica.

Enteroártico: Solamente participa la parte interior del filamento, la cual se fragmenta en conidios.

Tipos de conidios en relación a la posición de la célula conidiogénica:



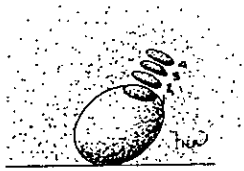
Terminal



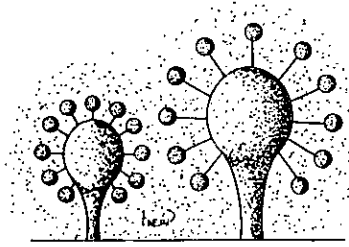
Intercalar



Basípeta (está en la base)

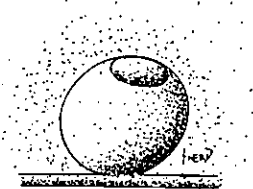


Acrópeta

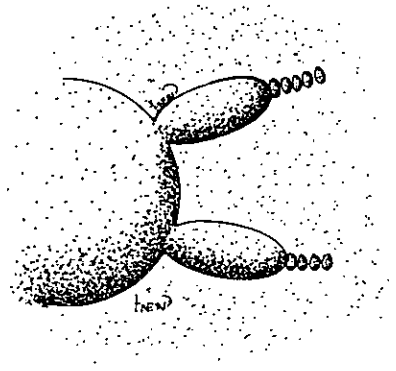


Sincrónogena
(maduran al mismo tiempo)

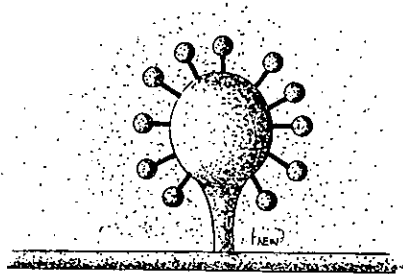
De acuerdo al orden de distribución del conidio en relación a otro conidios.



Solitarios

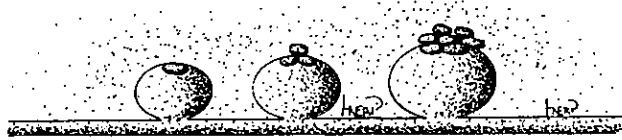


Catenulados (en cadena)



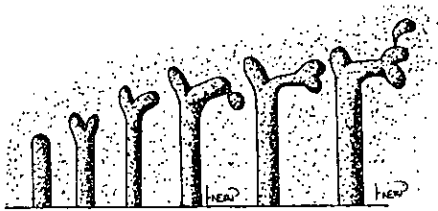
Botriosos (como racimos de uvas)

Relación de la célula conidiógena respecto al próximo conidio en formación:



Determinada: No le pasa nada (a la célula conidiógena) pero hay cambios morfológicos.

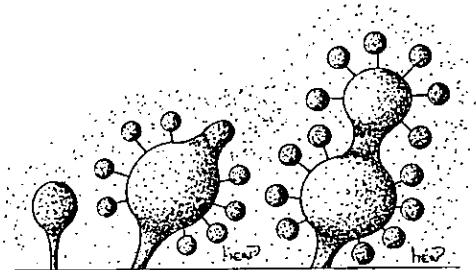
Proliferativa: Aumenta de volumen y pueden ser:



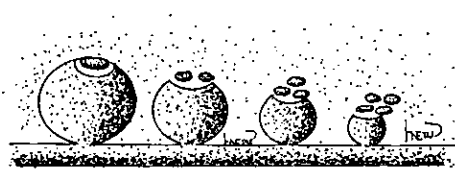
Simpodial (*Sporothrix schenckii*)



Basáuxica

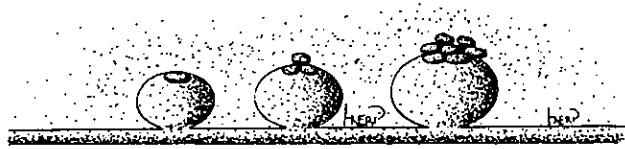


Percurrente



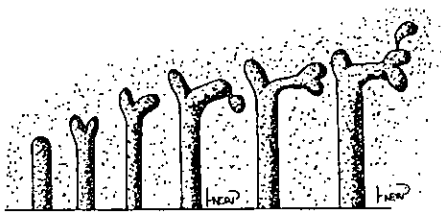
Retrogresiva: se hace pequeña

Relación de la célula conidiógena respecto al próximo conidio en formación:

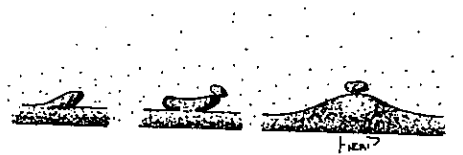


Determinada: No le pasa nada (a la célula conidiogénica) pero hay cambios morfológicos.

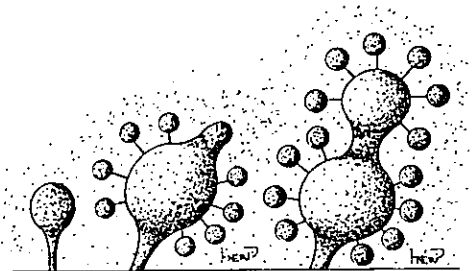
Proliferativa: Aumenta de volumen y pueden ser:



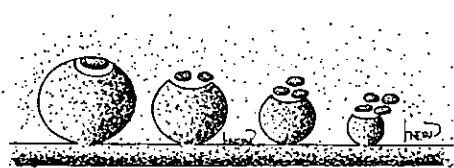
Simpodial (*Sporothrix schenckii*)



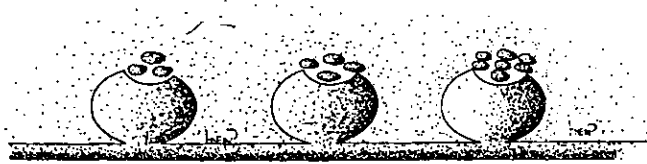
Basáuxica



Percurrente



Retrogresiva: se hace pequeña

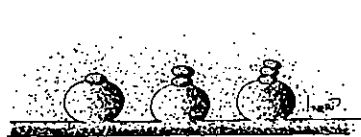


Estable: no le pasa nada

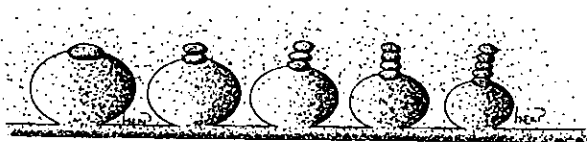
De acuerdo a características especiales (si existen éstas) de la célula conidiógena:



Porógena
(poroconidios)



Fialídica
(fialoconidios)



Anelídica (es retrogresivo)
(Aneloconidios)

Para el estudio de los hongos es importante conocer algunos conceptos como: dimorfismo fúngico que es el fenómeno por el cual un hongo pasa de una forma micelial a levaduriforme reversiblemente. Hongos bifásicos, que se refiere a aquellos hongos que presentan dos formas, una filamentosa (fase infectante) y a

diferencia de los hongos dimórficos, no presentan fase levaduriforme sino de otro tipo por ejemplo las células fumagoides de la cromomicosis o las esférulas de Coccidioides immitis (fase parasitaria). Pleomorfismo fúngico que es una transformación irreversible de una cepa que da un micelio blanco, algodonoso y estéril. (6)

Hongos contaminantes

Tradicionalmente se estudian en micología médica algunos padecimientos causados por bacterias del grupo de los Actinomyceales y de los Corynebacterium, así como también las infecciones por algunas algas aclorofilicas; a todas éstas se denominan falsas micosis o pseudomicosis; tal es el caso del micetoma actinomicético, la actinomicosis, la nocardiosis, el eritrasma, la tricomicosis.

En este apartado se incluyen los hongos contaminantes y actinomicetos más importantes de nuestro medio, llamados así por que son los microorganismos que contaminan con mayor frecuencia reactivos, medios de cultivo, sueros y diversas muestras clínicas, pudiendo ser, algunos, agentes oportunistas, siempre y cuando estén en contacto con un huésped inmunocomprometido. (24,27,28,29)

Las micosis oportunistas son de distribución cosmopolita, pueden ser benignas o muy graves dependiendo de las condiciones inmunológicas.

metabólicas o nutricionales del huésped; son cada vez más frecuentes y pueden afectar cualquier tejido del organismo.

A continuación se hará una descripción general de las características macro y microscópicas de cada uno de estos hongos observados como contaminantes con mayor frecuencia. (Todos crecen en un periodo de 5 a 7 días a 28°C en medio estándar de Sabouraud agar.)

Hongos que presentan micelio hialino

Aspergillus clavatus.- Macroscópicamente es un hongo de aspecto granuloso o pulverulento, de color verde, con un ligero halo blanco micelial, que tiende a cubrir todo el medio de cultivo.

Microscópicamente su micelio vegetativo es macrosifonado, septado y hialino, mientras que su micelio reproductivo es tabicado y hialino, su reproducción asexual es a base de microconidias. Presenta una cabeza aspergilar, compuesta de conidióforos largos, vesículas en forma de clava de donde nacen una serie de esterigmas y no presenta fase sexuada. (23)

Aspergillus fumigatus.- Macroscópicamente es un hongo de aspecto polvoso, aterciopelado y seco de color verde, con un halo micelial blanco alrededor, que tiende a llenar todo el medio de cultivo.

Microscópicamente su micelio vegetativo es macrosifonado, septado y hialino, mientras que su micelio reproductivo, es macrosifonado, cenocítico y

hialino. Su reproducción asexual es a base de microconidias redondas. Presenta una cabeza aspergilar compuesta por conidióforos cortos, vesículas semirredondas de las que nacen en un ángulo de 180° una sola serie de esterigmas y no presenta fase sexual.

Es un hongo oportunista que produce principalmente aspergilosis pulmonar, diseminada, cutánea, ótica, oftálmica y estados de hipersensibilidad inmunológica (o alergias). Es uno de los agentes etiológicos de la queratitis micótica o úlcera corneal iniciada por lo regular por traumatismos y/o tratamientos con antibacterianos y esteroides. (25)

Aspergillus niger.- Macroscópicamente es un hongo de aspecto pulverulento de color blanco-amarillento al inicio, y posteriormente se transforma a negro, que tiende a llenar todo el medio de cultivo.

Microscópicamente su micelio vegetativo es igual que su micelio reproductivo: macrosifonado tabicado y hialino. Su reproducción asexual es a base de microconidias redondas o elípticas. Presenta una cabeza aspergilar compuesta por conidióforos largos, vesículas redondas, de donde nacen alrededor, en un ángulo de 360°, dos series de esterigmas y no presenta fase sexual.

Es un hongo oportunista que produce principalmente aspergilosis pulmonar, diseminada, cutánea, ótica, oftálmica y estados de hipersensibilidad inmunológica (o alergias). A nivel industrial es principalmente importante en la obtención de ácido cítrico a partir de glucosa, además de producir ácido oxálico y proteasas.

(21,22,25,26)

Aspergillus terreus .- Macroscópicamente es un hongo de aspecto granuloso o pulverulento, de color inicialmente blanco y posteriormente beige que tiende a llenar todo el medio de cultivo.

Microscópicamente su micelio es macrosifonado, septado y hialino. Su reproducción asexual es a base de microconidias redondas. Presenta una cabeza aspergilar compuesta por conidióforos largos, vesículas redondas, de donde nacen en un ángulo de 180° dos series de esterigmas y no presenta fase sexuada.

Es un hongo oportunista que produce principalmente onicomycosis (aspergilosis cutánea) afectando las uñas de los pies con mayor frecuencia. (6)

Fusarium sp .- Macroscópicamente es un hongo de aspecto velloso, seco, se adhiere a las paredes del tubo, de color inicialmente blanco y posteriormente toma tonalidades naranja o violeta-lila que tienden a llenar todo el medio de cultivo, presenta un pigmento de color naranja o violeta difusible al medio.

Microscópicamente su micelio es macrosifonado, septado y hialino, organizado en ocasiones en coremium (asociación de hifas delgadas formando un paquete "haz de trigo"). Su reproducción asexual es a base de macro y microconidias fusiformes. Sus estructuras especializadas son conidióforos delgados y no presenta fase sexuada.

Es el principal agente etiológico de la queratitis micótica o úlcera corneal, infección de tipo subaguda que genera inflamación y ulceración de la córnea iniciada por lo regular por traumatismos y/o tratamientos con antibacterianos y esteroides. Es también causante de micetoma y un hongo oportunista que puede

producir aspergilosis pulmonar (Fusarium vasinfectum) en pacientes con antecedentes de micosis alérgica broncopulmonar y asma). (3)

Geotrichum sp. - Macroscópicamente es un hongo de aspecto veloso, húmedo, plano, de color blanco-amarillento que tiende a llenar todo el medio de cultivo.

Microscópicamente su micelio es macrosifonado, septado y hialino. Su reproducción asexual es a base de artroconidias que se fragmentan del micelio. Para algunas especies, su fase sexuada es a base de ascosporas, y se le denomina Endomyces sp.

Es un hongo oportunista que genera geotricosis, afectando pulmones, intestinos y raramente boca y piel. La especie que genera esta micosis oportunista es G. candidum (3)

Monilia sp. - Macroscópicamente es un hongo de aspecto veloso, polvoso y seco de color amarillo-naranja, pero algunas cepas son de color blanco-amarillento, que tiende a llenar todo el medio de cultivo, presenta un pigmento naranja poco difusible en el medio.

Microscópicamente su micelio es macrosifonado, septado y hialino; presenta una membrana gruesa refringente. Su reproducción asexual es a base de artroconidias de membranas gruesas y refringentes, artro-blastoconidias, y no presenta reproducción sexual. Su importancia radica en que es un hongo que contamina muy fácilmente medios de cultivo, y diversos productos biológicos. (3)

Penicillium sp .- Macroscópicamente es un hongo de aspecto polvoso, aterciopelado y plano de color verde, con un halo blanquecino en la periferia que tiende a llenar todo el medio de cultivo.

Microscópicamente su micelio es macrosifonado, septado y hialino. Su reproducción asexual es mediante microconidias redondas. Sus estructuras especializadas son conidióforos largos y esterigmas, que dependiendo de la especie son entre 3 y 6. Algunas especies tienen una reproducción sexual a base de ascosporas.

Es un hongo de una gran importancia a nivel industrial, ya que algunas de sus especies son utilizadas para la maduración de los quesos como es el caso de P. camembertii (queso camembert) y de P. roquefortii (queso roquefort) así como en la producción de penicilina por P. chrysogenum. Otras especies más son utilizadas para la producción de amilasas, pectinasas, pectasas, ácido kójico, ácido oxálico y de lípidos. (1,2)

Rhizopus sp .- Macroscópicamente es un hongo de aspecto veloso-algodonoso, seco, de color inicialmente blanco y posteriormente toma un color gris oscuro que tiende a llenar todo el medio de cultivo.

Microscópicamente su micelio es macrosifonado, septado y hialino presentando rizoides y estolones. Su reproducción asexual es a base de esporangiosporas o endosporas redondas. Sus estructuras especializadas son esporangios.

Alguna de sus especies son agentes etiológicos de la mucormicosis dando cuadros agudos rinocerebrales, pulmonares, de mal pronóstico, que cursan con

trombosis, invasión vascular e infartos. Se presenta principalmente en pacientes diabéticos descompensados e inmunosuprimidos. (3)

Scopulariopsis sp .- Macroscópicamente es un hongo de aspecto aterciopelado, polvoso, seco y cerebriforme de color inicialmente blanco y posteriormente beige que tiende a llenar todo el medio de cultivo. Es un hongo pleomórfico.

Microscópicamente su micelio es macrosifonado, septado y hialino. Su reproducción asexual es por medio de microconidios redondos y espiculares (como limones). Sus estructuras especializadas son conidióforos cortos y esterigmas, que dependiendo de la especie van de 1 a 4, y no presentan fase sexual.

Es un hongo oportunista que provoca onicomycosis que es una manifestación similar a la tiña de las uñas, es un padecimiento propio de personas con problemas circulatorios y/o posteriores a traumatismos, también puede causar infecciones pulmonares, ambas son micosis muy raras. (3)

Hongos dematiáceos

Alternaria sp .- Macroscópicamente es un hongo de aspecto aterciopelado, seco, de color negro que tiende a cubrir todo el medio de cultivo.

Microscópicamente su micelio es macrosifonado, septado y obscuro, formando cuerpos nodulares, su reproducción asexual es por medio de dictioconidias dispuestas en cadenas. No presenta fase sexual. (3,7)

Cladosporium sp .- Macroscópicamente es un hongo de aspecto aterciopelado, seco con algunos surcos, de colonias planas, de color verde obscuro que tiende a llenar todo el medio de cultivo, presenta un pigmento negro difusible al medio.

Microscópicamente su micelio es macrosifonado, septado y obscuro; en algunas cepas se presentan cuerpos nodulares. Su reproducción asexual es a base de microconidias, dispuestas en hormodendrum (conidias superpuestas una encima de la otra dando la apariencia de "nopales"), y no presenta fase sexual.

Es el agente etiológico de la faeohifomicosis (cladosporiosis cerebral) produciendo abscesos cerebrales es una micosis muy rara, y la especie que produce esta micosis es C. bantianum. (3,7)

Helminthosporium sp .- Macroscópicamente es un hongo de aspecto veloso, seco, ligeramente aterciopelado, plano y en ocasiones se cubre con un velo blanco, es de color negro con ciertas tonalidades de café obscuro, que tiende a llenar todo el medio de cultivo, presenta un pigmento negro que difunde al medio.

Microscópicamente su micelio es macrosifonado, septado y obscuro que en ocasiones presenta cuerpos nodulares. Su reproducción asexual es a base de macroconidias alargadas, con ambos extremos romos, presentando varios

septos.. Sus estructuras especializadas son conidióforos cortos, y no presenta reproducción sexual (3)

Actinomicetos

Streptomyces sp .- Es una bacteria filamentosa (actinomiceto) que macroscópicamente tiene un aspecto acuminado, seco y con surcos, de color blanco-beige, tomando en ocasiones tonalidades grisáceas, como característica especial esta bacteria despiden un olor a humedad. Algunas especies presentan un pigmento café-ocre difusible en el medio.

Microscópicamente su micelio es microsifonado, septado y hialino. Su reproducción es a base de formas cocoides y bacilares, produce algunas esporas de resistencia y es una bacteria Gram positiva y no ácido alcohol resistente.

Es uno de los agentes etiológicos del micetoma, aunque también tienen una gran importancia industrial en la producción de antibióticos. (30,31,32)

TABLA 3.

ESPECIES DE MAYOR IMPORTANCIA

ESPECIE	IMPORTANCIA	ESPECIE	IMPORTANCIA
<u>S. somaliensis</u>	agente etiológico del micetoma	<u>S. erythreus</u>	productor de eritromicina
<u>S. paraguayensis</u>	agente etiológico del micetoma	<u>S. Indicus</u>	productor de neomicina
<u>S. griseus</u>	productor de estreptomina.	<u>S. aureofaciens</u>	productor de cloranfenicol
<u>S. venezuelae</u>	productor de cloromicetina	<u>S. nodosus</u>	productor de anfotericina B
<u>S. rimosus</u>	productor de terramicina	<u>S. noursei</u>	productor de nistatina

Dermatofitos

Una de las clasificaciones clínicas más conocidas y aceptadas es, la que divide a las micosis en superficiales, subcutáneas, sistémicas y oportunistas. En las tres primeras predomina un criterio topográfico; sin embargo, las micosis

oportunistas pueden localizarse en múltiples regiones corporales. Los hongos que producen las micosis superficiales tienen capacidad únicamente para afectar la capa córnea de la piel y sus anexos (pelos y uñas). En las micosis subcutáneas los agentes etiológicos generalmente penetran por la piel a través de una solución de continuidad, extendiéndose posteriormente a tejido celular subcutáneo y, en ocasiones invaden otros tejidos profundos como el muscular y el óseo; son raras las diseminaciones hematógenas o linfáticas.

En este apartado se incluyen los dermatofitos más frecuentes como agentes etiológicos de tiñas de piel, uñas y pelos, que excepcionalmente invaden tejidos profundos, son hongos que se reproducen asexualmente a base de macro y microaleuroconidias, su reproducción sexual es a base de ascas y ascosporas caracterizándose por formar gimnoascos, su única diferencia son las hifas del peridio y solamente *Epidermophyton floccosum* no presenta reproducción sexual.

Las micosis superficiales ocasionadas por hongos parásitos de la queratina (dermatofitos) comprenden tres géneros: *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*. Infectan piel y anexos. Son micosis cosmopolitas que predominan en zonas tropicales. Afectan a sujetos de cualquier edad, raza o sexo, así como de

cualquier medio socioeconómico u ocupación. Las tiñas se clasifican según su localización en: (3,4,33,34,35,43)

- tiña de la cabeza *Tinea capitis*
- tiña del cuerpo *Tinea corporis*
- tiña imbricada *Tokelau*
- tiña inguinal *Tinea cruris*
- tiña de la mano *Tinea manum*
- tiña de los pies *Tinea pedis*
- tiña de las uñas *Tinea unguium*

A continuación se describen las características microscópicas de cada uno de los géneros que comprenden los dermatofitos.

Trichophyton sp

Se caracteriza por presentar abundantes microaleuroconidias con diversas formas: piriformes, esféricas y claviformes. Tienen pocas macroaleuroconidias en forma de clava o "puro" de paredes lisas y delgadas, con septos transversales de diversos diámetros dependiendo de la especie.

Las macroconidias en algunas especies pueden no presentarse, y se requieren de algunos medios de cultivo especiales para estimular su formación. Los dermatofitos aislados con mayor frecuencia son: *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*

como agentes etiológicos de la tiña de los pies, ingle, uñas y cuerpo, mientras que *T. tonsurans* es un agente etiológico de tiña de la cabeza y del cuerpo.

(3,7,34,36,37,38,39,40,42)

Microsporum sp

Se caracteriza por presentar abundantes macroaleuroconidias con diversas formas: fusiformes, claviformes, ovales, etc. con paredes gruesas, tienen septos transversales, que dependiendo de la especie son 5 o 15, generan escasas microaleuroconidias de aspecto piriforme, que en ocasiones pueden estar ausentes, por lo que se requieren de medios de cultivo especiales para estimular su producción (papa-zanahoria). Los dermatofitos más frecuentes en los aislamientos son: *Microsporum canis* como agente etiológico de la tiña de la cabeza y del cuerpo, mientras que *Microsporum gypseum* como agente etiológico de tiñas de los pies y cuerpo. (3,7,34,36,37,38,39,40,45)

Epidermophyton sp

Se caracteriza por presentar macroaleuroconidias en forma de bastos o clavas, de paredes gruesas y lisas, con 3 o 4 tabiques transversales. Las macroaleuroconidias pueden nacer de manera independiente, o bien varias de un mismo punto, como "racimos". No presentan microaleuroconidias. Existe una sola especie: E. Floccosum. Es el agente etiológico de tiña de los pies, ingle y uñas; nunca parasita el pelo. (3,7,41)

Exophiala werneckii O Phaeoannellomyces werneckii

Es un hongo levaduriforme dematiáceo, agente etiológico de la tiña negra que es una infección asintomática de curso crónico caracterizado por la formación de manchas hiperpigmentadas, preferentemente en las palmas de las manos. Crece en forma de esporas de color café e hifas tabicadas, ramificadas y en ocasiones con clamidioconidias y acúmulos de blastoconidias, se desarrolla lentamente a temperatura ambiente. Al inicio (una semana) la colonia es de aspecto cremoso, negra, limitada y adherida al medio, observándose en este periodo su fase levaduriforme, posteriormente las colonias empiezan a modificarse apareciendo hifas aéreas que dan un aspecto aterciopelado, el pigmento cambia a un color verde oscuro, observándose en éste periodo su fase filamentosa; presenta micelio grueso, tabicado, conidióforos con una gran cantidad de conidias arborescentes. (3,7,47)

Hongos levaduriformes

En este apartado se incluyen los hongos levaduriformes de mayor importancia a nivel clínico (hongos oportunistas) e industrial.

Hongos oportunistas

Son hongos saprófitos inócuos, que en condiciones normales no generan enfermedades al hombre, pero si se encuentran en contacto con huéspedes inmunocomprometidos o que hayan sufrido algún tipo de alteración fisiológica pueden generar algún tipo de micosis, aunque para que exista una micosis por este tipo de hongos, se deben presentar las condiciones necesarias tanto del huésped, como del hongo mismo. Entre los agentes etiológicos se pueden encontrar: *Candida albicans* y *Criptococcus neoformans*. A continuación se hará una descripción general de las características mas importantes de estos dos agentes etiológicos. (3,9,48)

Candida albicans

El género *Candida* incluye un variado número de especies, pero solamente algunas de ellas pueden ser oportunistas, sobresaliendo *C. albicans*, el agente etiológico más frecuente de la candidosis. Una de las propiedades de este género es la producción de pseudomicelio y la diferenciación entre las especies se realiza

fundamentalmente por pruebas bioquímicas basadas en la fermentación y utilización de carbohidratos, zimograma y auxonograma respectivamente.

En general todo el género presenta colonias limitadas, planas, cremosas, opacas, generalmente lisas, aunque algunas veces se presentan rugosas, de color blanco o blanco-amarillento. Es posible ver formaciones de pseudomicelio que se introducen en el agar.

Todas las especies se reproducen por blastoconidias, formando gemas de la mitad de su tamaño, también presenta pseudohifas cortas o largas, las que determinan el grado de patogenicidad, y generalmente se tiñen bien con azul de algodón y Wright; aunque no se rigen por el Gram, generalmente son positivas, llegando a cambiar cuando las colonias envejecen.

A continuación se mencionarán algunas de las especies del género Candida:

De mayor frecuencia

C. albicans
C. parapsilosis
C. tropicalis
C. krusei
C. glabrata *

De menor frecuencia

C. guilliermondii
C. pseudotropicalis
C. zeylanoides
C. stellatoidea
C. lusitanae

*Candida glabrata; también llamada Torulopsis o Torulaglabrata; Es otra especie del género Candida que inicialmente no era incluida en éste género ya que no se reproduce por blastoconidias, no forma gemas ni presenta pseudohifas; que son las características del género, pero genéticamente se ha encontrado gran similitud por lo que se clasifica en éste género. (3,7,49)

Cryptococcus neoformans

Es el agente etiológico de la criptococosis que es una micosis caracterizada por afectar inicialmente pulmones y posteriormente se disemina a piel y vísceras, prefiriendo al SNC. El hábitat más frecuente de esta levadura es el guano de algunas aves como palomas, pichones, gallinas, etc., por lo que la vía de entrada es principalmente respiratoria. Como característica especial este hongo presenta una cápsula que es la responsable de su virulencia.

Es un hongo que se cultiva principalmente en medio Sabouraud aunque se obtiene una diferenciación de la especie en medio de alpiste negro dando colonias pigmentadas café-marrón, obteniendo un buen desarrollo a los tres días a temperatura ambiente o a 37°C. Las colonias son limitadas, mucoides, convexas, de color blanco amarillento. Al microscopio se observan blastoconidias capsuladas de la mitad de su tamaño, la cápsula llega a ser 3 veces el tamaño de la levadura, raramente forma pseudomicelio o clamidoconidias y en suero no genera tubos ni brotes germinativos. (3,7,50,51,52,53,54)

Hongos industriales

Son utilizados principalmente en la vinificación y en la cervecería por presentar fermentación alcohólica, transformando principalmente a la glucosa, galactosa, maltosa y sacarosa. El género *Saccharomyces* es el más utilizado en la industria cervecera por su alta capacidad de fermentación alcohólica (principalmente *S. cerevisiae*), mientras que *Hansenula* tiene una tolerancia menor al alcohol por lo que produce una delgada película en la superficie de los vinos y de ahí su importancia, ya que es una levadura de tipo oxidativa produciendo ésteres en vez de alcohol.

S. cerevisiae es considerada como una herramienta muy importante dentro de la biología molecular y la ingeniería genética, por ser el primer genoma eucariótico del cual se conoce la secuencia completa de su DNA, ayudando así a conocer la secuencia del DNA humano.

En general estos géneros presentan colonias limitadas, convexas, lisas, cremosas y opacas, de color blanco-amarillento sin pigmento al reverso del cultivo. Se reproducen asexualmente mediante blastoconidias, y sexualmente por ascosporas dispuestas en pares. (1,2,12,55)

Hongos patógenos

Las micosis sistémicas se localizan por lo regular en forma primaria a nivel pulmonar y posteriormente tienden a diseminarse por vía hematológica a diferentes sistemas, órganos y tejidos del cuerpo; estas micosis suelen ser graves y mortales.

Los hongos que producen tanto las micosis subcutáneas como las sistémicas, viven libres en la naturaleza y en áreas geográficas mas o menos delimitadas, las primeras se adquieren por penetración a través de heridas en la piel y las segundas por inhalación; son de predominio rural y no contagiosas.

En este apartado se incluyen los hongos patógenos más importantes como agentes etiológicos de cromomicosis, esporotricosis y de micetoma. A continuación se hará una descripción general de las características mas importantes de éstos agentes etiológicos, así como de la patogenia correspondiente. (3,7,58)

Cromomicosis

Es una micosis subcutánea o profunda de curso crónico, causado por hongos dematiáceos u hongo negro, principalmente *Fonsecaea pedrosoi* y

Phialophora verrucosa Afecta piel y tejido interno; se localiza en extremidades, especialmente inferiores y sobre todo en el pie. Se caracteriza por nódulos, verrugosidades y atrofia, de evolución crónica. El parásito se presenta como células fumagoides.

Las diversas especies causantes de cromomicosis viven en la naturaleza, en el suelo, vegetales y sobre todo en la pulpa de la madera. Habitan en lugares de climas húmedos y cálidos, la vía de entrada principal es cutánea a través de traumatismos con astillas de madera, por lo que con mayor frecuencia son afectados los campesinos. (3,7)

Fonsecaea pedrosoi Se desarrolla aproximadamente entre 3 a 4 semanas, presenta colonias pardas o negras, vellosas, aterciopeladas, limitadas, a veces con surcos y rugosidades radiales, al reverso se observa un pigmento negro-ocre que difunde lentamente a través del medio.

Microscópicamente se observan numerosos hifas pigmentadas, gruesas y tabicadas, en ocasiones con cuerpos nodulares. Tiene tres tipos de reproducción asexual: la más común es por hormodendrum (estructuras similares a los "nopales"; por filídes, donde una célula base o conidiógena sostiene esporas elípticas asemejando a un "florero"; y la tercera por acroteca, donde al final de una hifa o conidióforo se disponen alternativamente las conidias. (3,7,57)

Phialophora verrucosa desarrolla lentamente de 3 a 4 semanas, presentando colonias planas, limitadas, de color oscuro o negro, vellosas, aterciopeladas y en ocasiones se cubre de un ligero velo de color blanco; al reverso se observa pigmento negro poco difusible.

Microscópicamente se observa un abundante micelio macrosifonado, septado y obscuro. Tiene una sola forma de reproducción a base de fiálides. (3,7)

Esporotricosis

Es una micosis subcutánea o profunda, producida por un hongo dimórfico denominado *Sporothrix schenckii*, de curso subagudo o crónico. Primordialmente afecta piel y sistema linfático en forma de lesiones gomosas que dan lugar a lesiones fijas verrugosas o linfangíticas; en raras ocasiones es extracutánea o sistémica por lo que se presenta en huesos, articulaciones y otros órganos. En inmunodeprimidos el hongo se comporta como oportunista.

Es un hongo que vive en el suelo, detritus vegetal, madera, hojas y ramas ya secas o frescas; generalmente habita en climas templados y húmedos, la vía de entrada principal es cutánea a través de traumatismos y escoriaciones con material contaminado, como paja o zacate, por lo que se clasifica como una enfermedad ocupacional, presentándose en campesinos, amas de casa, niños de edad escolar, cultivadores y vendedores de flores, cazadores, mineros, pescadores, empacadores de vidrio y loza, etc. Debido al polimorfismo de la esporotricosis, existen muchas clasificaciones clínicas como lo son: cutáneo-linfática, cutáneo-fija, cutáneo-superficial, cutáneo-hematógena, osteo-articular, pulmonar y sistémica.

La fase filamentosa se obtiene a 28°C en medio de Sabouraud y micoseal agar. Las colonias se desarrollan rápidamente, al inicio (3 a 4 días) se presentan

limitadas, de aspecto membranoso, radiadas y de color blanquecino, posteriormente se desarrolla micelio aéreo y la colonia se hace acuminada, pero conservando su aspecto mucoso, el color se torna café oscuro y dependiendo de los diversos medios y de la cepa en sí, puede no llegar a pigmentar.

Microscópicamente se observan hifas muy delgadas, septadas, ramificadas y hialinas. Su reproducción asexual es a base de conidias ovoides o piriformes, que se forman de dos maneras, algunas nacen de un conidióforo disponiéndose alrededor de él, de manera que presenta un aspecto de "flores de durazno o margaritas", y las otras nacen directamente de las hifas (simpodulosporas y radulosporas, respectivamente). Cuando las conidias se desprenden, se hacen más gruesas, de forma triangular y son las agrupaciones de éstas las que forman el pigmento de la colonia.

La fase levaduriforme se obtiene a 37°C en medios ricos en nutrientes, tales como gelosa sangre y BHI agar, puede estimularse su crecimiento agregando 5% de CO₂. El desarrollo se obtiene de 3 a 5 días presentándose colonias cremosas, blanco amarillentas, ligeramente acumuladas y bastante similares a las colonias bacterianas.

Microscópicamente se observan células levaduriformes, ovoides o alargadas, en ocasiones presentan fragmentos de micelio, como residuo del mismo dimorfismo. (3,7,58,59,60)

Micetoma

Se le conoce también como pie de Madura o maduromicosis. Es un síndrome anatomoclínico de tipo inflamatorio crónico, que depende de inoculación traumática exógena de hongos o actinomicetos aerobios y se denomina eumicetoma o actinomicetoma. Afecta piel, tejido celular, a menudo huesos y en ocasiones vísceras. La localización más frecuente es el pie y está constituido por aumento de volumen, deformación de la región que afecta y con lesiones de aspecto nodular, fistulizadas, de donde drena un exudado filante, seroso o purulento que contiene las formas parasitarias denominadas "granos"; los agentes etiológicos más importantes son: *Nocardia brasiliensis*, *Nocardia asteroides* y *Actinomyces madure* , y en casos muy raros *Candida tropicalis*.

(3,7,61,64,65,66,67,68)

Los hongos y actinomicetos productores de micetoma viven en el detritus vegetal, madera, diversas plantas, se relacionan con las espinas, generalmente habitan en climas subtropical y tropical (comprendidas en áreas vecinas al trópico de Cáncer), la vía de entrada principal es cutánea a través de traumatismos provocados por espinas, astillas, clavos, piedras, mordedura de reptiles, etc., por lo que la zona localizada es más frecuente en los pies. Es un padecimiento propio de campesinos, obreros, mecánicos, amas de casa y personas que trabajan en condiciones rudimentarias, sin protección de zapatos cerrados.

Granos tipo Nocardia son microsifonados, de color blanco o blanco amarillento, de forma multilobulada dando un aspecto "arriñonado" o como "fetos", pueden presentar numerosas clavos en la periferia.

Crece en medio Sabouraud y extracto de levadura agar, es inhibido por el cloramfenicol. Las colonias se desarrollan entre 10-12 días a temperatura ambiente, son de tamaño limitado, secas, de color naranja y raras veces con tonalidades blancas, de forma acuminada, surcada y de consistencia suave; al reverso no presenta pigmento y también despiden olor característico a humedad. (62)

Granos de A. madure son microsifonados, visibles a simple vista (1 a 5 mm), de color blanco amarillento, de forma redonda irregular y de consistencia blanda.

Microscópicamente se observan lobulados y en algunas partes de su periferia tienen pseudoclavas o flecos.

Crece en medios ricos como BHI agar, para su primo-aislamiento, a 37°C. Las colonias se desarrollan entre 20 y 40 días. En resiembras se adaptan al Sabouraud agar a temperatura ambiente. Las colonias son pequeñas, limitadas, de color blanco amarillento, húmedas, de consistencia suave, ligeramente acuminadas y cerebriformes; no producen pigmentos.

Microscópicamente se observan microorganismos Gram positivos, no son ácido alcohol resistentes (AAR); tienen una gran cantidad de filamentos microsifonados, septados, y que en ocasiones se fragmentan en formas bacilares y cocoides. (61)

Material y métodos:

A) microorganismos

Para conformar esta microlaminoteca se utilizaron diferentes cepas, proporcionados por el cepario de la Facultad de Química UNAM y por el Departamento de Micología del Hospital General de México las cuales se dividieron en los siguientes grupos:

a) Actinomicetos y Hongos contaminantes:

Alternaria sp

Aspergillus clavatus

Aspergillus fumigatus

Aspergillus niger

Aspergillus terreus

Cladosporium sp

Fusarium sp

Geotrichum sp

Helminthosporium sp

Monilia sp

Penicillium sp

Rhizopus sp

Scopulariopsis sp

Streptomyces sp

b) Dermatofitos y hongos de micosis superficiales:

Epidermophyton floccosum

Microsporum canis

Microsporum gypseum

Trichophyton mentagrophytes

Trichophyton rubrum

Trichophyton tonsurans

i) Dematiaceos.-

Exophiala werneckii o Phaeoannellomyces werneckii fase levaduriforme

Exophiala werneckii o Phaeoannellomyces werneckii fase filamentosa

c) Hongos levaduriformes:

Candida albicans

Cryptococcus neoformans

Hansenula sp

Saccharomyces bayanus

Saccharomyces cerevisiae

d) Hongos patógenos y actinomicetos de micosis subcutáneas:

Fonsecaea pedrosoi

Phialophora verrucosa

Sporothrix schenckii

i) Actinomicetos.-

Nocardia asteroides

Actinomyces madure

B) medios y condiciones de cultivo

Todos los hongos fueron mantenidos y activados en medio de Sabouraud agar^(ANEXO) y para el microcultivo se utilizaron diferentes medios de cultivo, dependiendo de la clase del hongo:

a) Para los hongos contaminantes y actinomicetos se utilizó el medio de Sabouraud agar, la incubación fué de 28°C por un periodo de 5 a 7 días.

b) Para los dermatofitos se usó el medio Borelli^(ANEXO) y se incubó a 28°C por un periodo de 15 a 20 días. (10,33,63)

i) Dematiaceos

Exophiala werneckii se cultivó en medio de Sabouraud agar a 28°C por un periodo de 4 a 5 días para observar su fase levaduriforme. Para observar

su fase filamentosa se incubó bajo las mismas condiciones, por un periodo de 15 a 20 días.

c) Para los hongos levaduriformes se utilizaron los siguientes medios:

i) producción de ascosporas

Hansenula sp se sembró en un trozo de zanahoria esterilizada incubándose de 10 a 15 días a 28°C.

Saccharomyces bayanus y Saccharomyces cerevisiae se sembraron en medio de agar acetato incubándose de 10 a 15 días a 28°C.

Candida albicans y Cryptococcus neoformans se sembraron en medio de Sabouraud agar incubándose 5 días a 28°C.

d) Para los hongos patógenos y actinomicetos de micosis subcutáneas se utilizaron los siguientes medios:

i) Fonseca pedrosoi , Phialophora verrucosa y Sporothrix schenckii se sembraron en medio de Sabouraud agar a 28°C por un periodo de 15 a 20 días.

ii) Actinomicetos:

Nocardia asteroides y Actinomyces madure se sembraron en medio de Sabouraud agar, incubándose 5 días a 28°C.

. Técnica de Gram

Se realizaron tinciones de Gram a las siguientes cepas: *Candida albicans*, *Nocardia asteroides* y *Actinomyces madure* para lo cual se tomó una asada y se realizó un frotis fijándolo directamente a la flama. Se cubrieron las preparaciones con el colorante primario, cristal violeta, durante un minuto, se lavó ligeramente con agua y se cubrió la preparación con lugol, por un minuto, se lavó nuevamente con agua y se decoloró con alcohol acetona. De nuevo se lavó con agua y se cubrió la preparación con el colorante de contraste, safranina por un minuto más y se lavaron con agua dejando secar las preparaciones al aire. (ANEXO)

C) Técnica de microcultivo:

a) Microcultivo Se sembraron por técnica de microcultivo los hongos contaminantes, los dermatofitos y los hongos patógenos de micosis subcutáneas, utilizando cajas Petri estériles con portaobjetos (pares) y triángulo de vidrio en cada caja.

En área estéril se fragmentó, con ayuda de un bisturí previamente flameado, el medio de cultivo contenido en la caja Petri, en cuadros de aproximadamente 1 x 0.5 cm y se colocaron 1 o 2 cubos de agar (ver apartado referente a medios de cultivo y condiciones) en uno de los portaobjetos.

Con una asa micológica esterilizada a la flama y fria, se tomó una asada del cultivo de alguno de los hongos y se sembró con el asa los cuatro lados del cubo de agar. Se colocó el segundo portaobjetos sobre el medio de cultivo y se agregó a la caja Petri de 10 a 15 mL de agua glicerizada (5%) estéril cuidando de no derramar sobre los portaobjetos. Se selló la caja Petri con cinta adhesiva y se incubó según las condiciones para cada clase de hongo.

b) tinción Una vez transcurrido el tiempo de incubación se separaron con cuidado los portaobjetos y se retiró el agar con la ayuda de un bisturí, y se fijó la preparación con 1 o 2 gotas de metanol hasta evaporación.

Se colocó un trozo de papel filtro sobre la preparación y se cubrió con eritrocina durante 8 minutos con calentamiento directo a la flama, para lo cual se utilizaron unas pinzas para crisol y un poco de algodón empapado con etanol.

Transcurrido el tiempo de coloración, se retiró el trozo de papel filtro, y se colocó el portaobjetos en una caja de Koplín, sumergiendose, primero en acetona, después en xilol-acetona y finalmente en xilol por 8 minutos en cada solvente. Después a la preparación se le puso una gota de bálsamo de Canadá y se colocó un cubreobjetos, fijando así la preparación. (3. ANEXO)

D) Tinciones especiales.

a) Tinción de ascosporas Del desarrollo del medio de agar acetato o de la zanahoria, se realizaron frotis, fijándolos directamente a la flama. Sobre las preparaciones se colocaron trozos de papel filtro y se cubrieron con fucsina básica, calentando durante 10 min. con vapor de agua. Se lavaron con agua, para quitar el exceso de colorante y después se decoloraron con alcohol ácido y se dejaron secar. Una vez secas las preparaciones se realizaron frotis con tinta China como si fueran frotis de sangre. Después a las preparaciones se les puso una gota de bálsamo de Canadá y se colocó un cubreobjetos fijando así la preparación. (3,

ANEXO)

b) Tinción negativa para *Cryptococcus neoformans* Se fijó el frotis directamente a la flama y se tiñó con fucsina básica durante un minuto (sin calentamiento). Se lavó con agua destilada el exceso de colorante y se dejó secar.

Una vez secas las preparaciones se realizaron frotis con tinta China como si fueran frotis de sangre. Después a las preparaciones se les puso una gota de bálsamo de Canadá y se colocó un cubreobjetos fijando así la preparación. (3,

ANEXO)

Resultados:

Esta microlaminoteca está conformada por 31 cepas de diferentes hongos realizándose 20 laminillas de cada una de ellas, proporcionando finalmente una colección de 640 laminillas. A continuación se describen los grupos en los cuales se dividieron éstas diferentes cepas:

a) Actinomicetos y Hongos contaminantes:

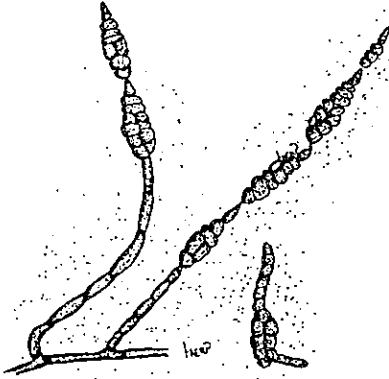
Total de laminillas: 280

Medio de cultivo utilizado: estándar de Sabouraud.

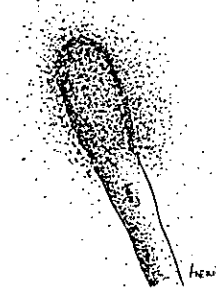
Técnica: Microcultivo

Tinción: con eritrocina

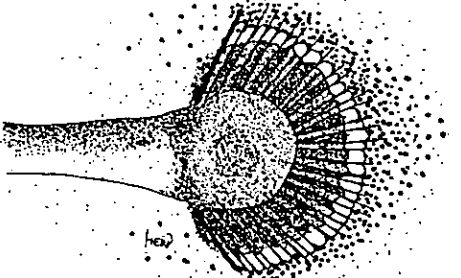
* : Cepas que presentaron problemas para su cultivo.



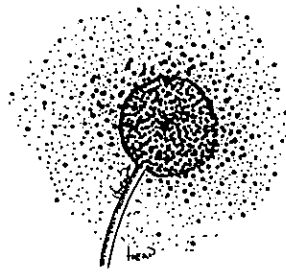
Alternaria sp



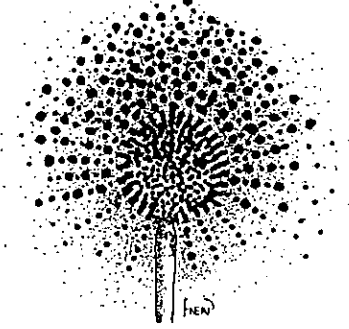
*Aspergillus clavatus



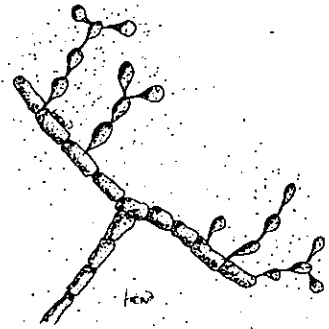
Aspergillus fumigatus



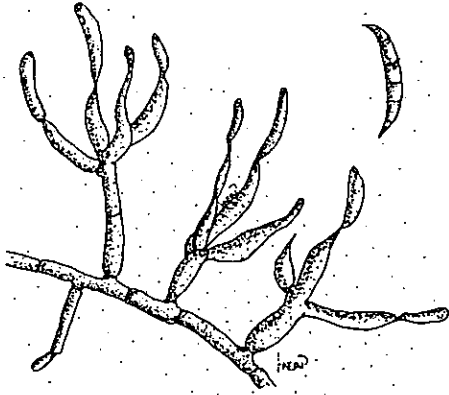
*Aspergillus niger



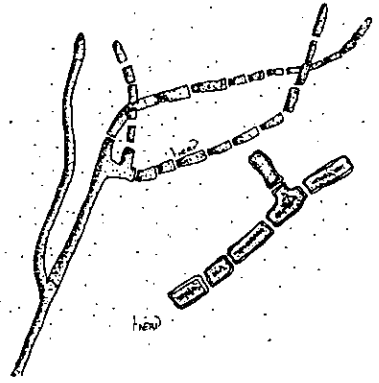
Aspergillus terreus



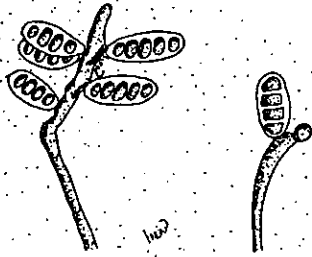
Cladosporium sp



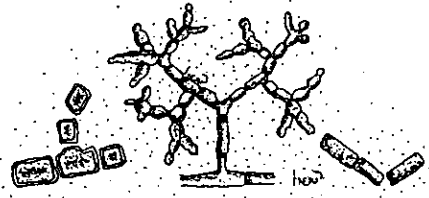
**Fusarium sp*



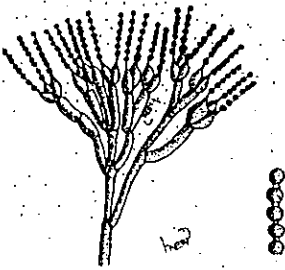
Geotrichum sp



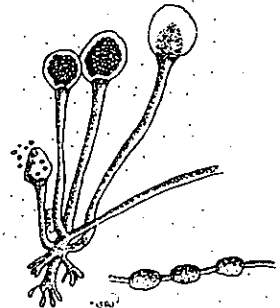
Helminthosporium sp



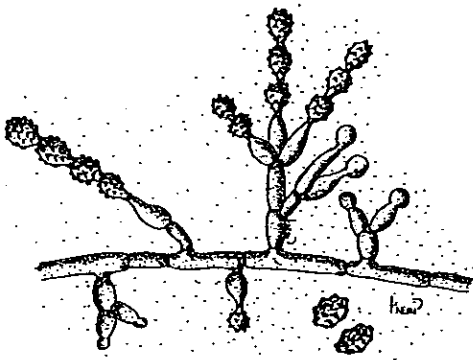
**Monilia sp*



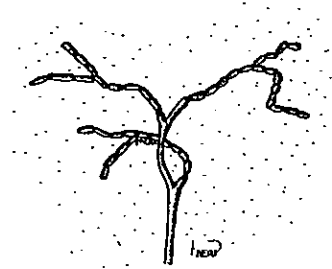
Penicillium sp



**Rhizopus sp*



Scopulariopsis sp



Streptomyces sp

b) Dermatofitos y hongos de micosis superficiales:

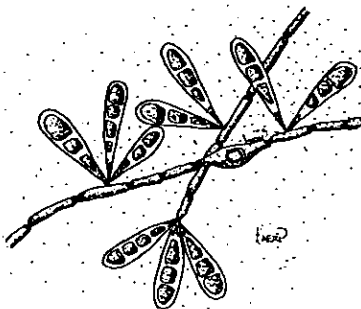
Total de laminillas: 160

Medio de cultivo utilizado: Borelli.

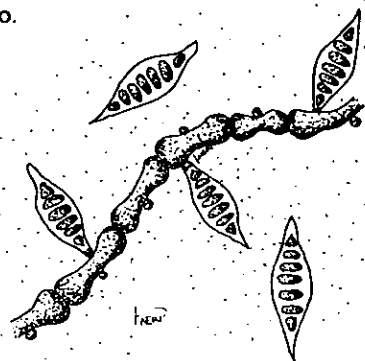
Técnica: Microcultivo

Tinción: con eritrocina

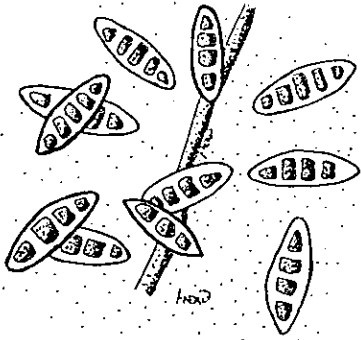
* : Cepas que presentaron problemas para su cultivo.



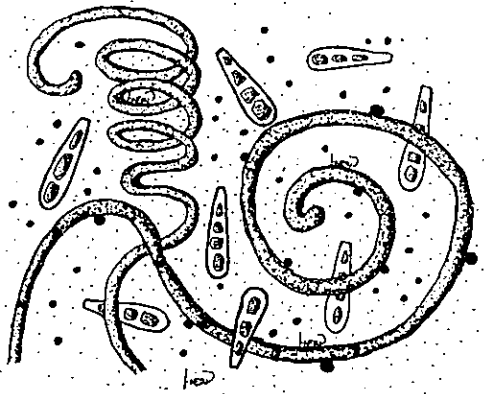
*Epidermophyton floccosum



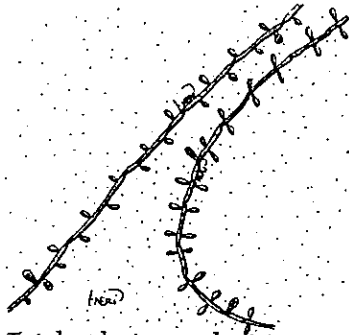
Microsporum canis



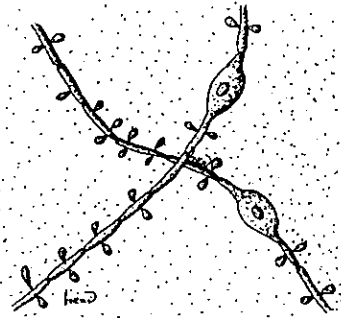
*Microsporium gypseum



*Trichophyton mentagrophytes

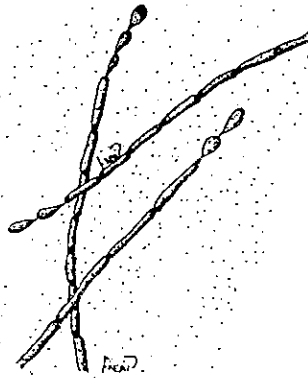


Trichophyton rubrum



Trichophyton tonsurans

i) Dematiaceos.-



Exophiala werneckii o Phaeoannellomyces werneckii

c) Hongos levaduriformes:

Total de laminillas: 100

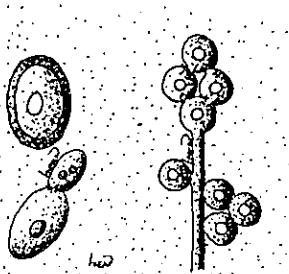
Medio de cultivo utilizado: *,** estándar de Sabouraud.

*** un trozo de zanahoria esterilizada.

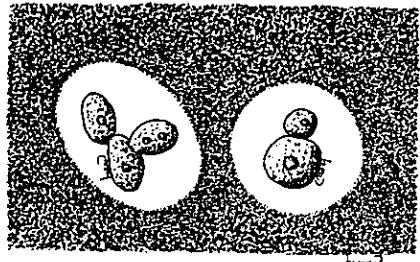
**** medio de agar acetato.

Técnica: *,**,***,**** frotis fijándolo directamente a la flama.

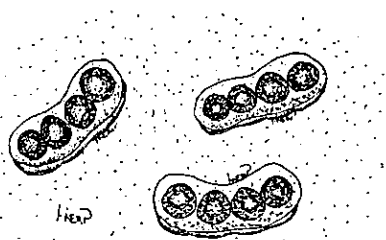
Tinción: * Gram, **negativa, *** y **** de ascosporas.



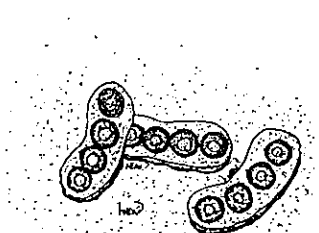
* *Candida albicans*



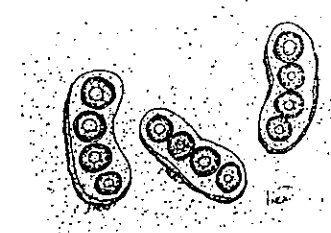
** *Cryptococcus neoformans*



*** *Hansenula sp*



**** Saccharomyces bayanus



**** Saccharomyces cerevisiae

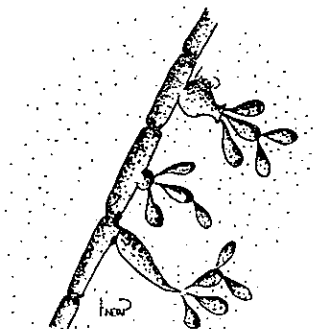
d) Hongos patógenos y actinomicetos de micosis subcutáneas:

Total de laminillas: 100

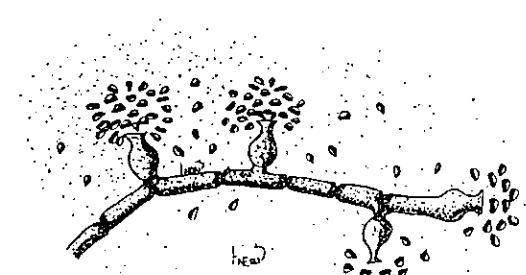
Medio de cultivo utilizado: estándar de Sabouraud.

Técnica: Microcultivo, * frotis fijándolo directamente a la flama.

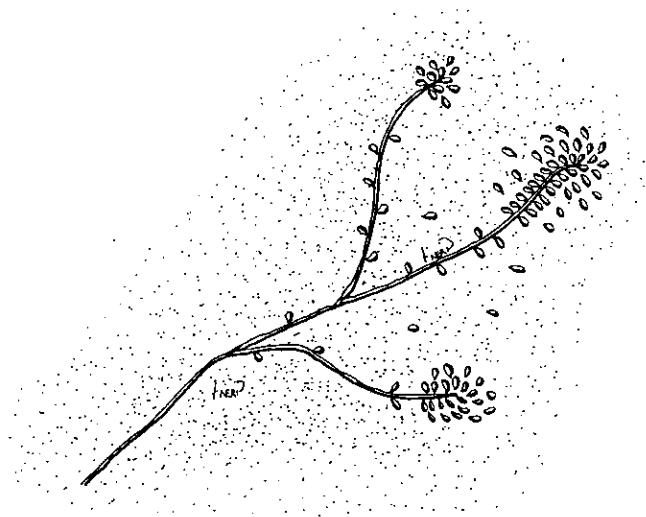
Tinción: con eritrocina, * Gram.



Fonsecaea pedrosoi

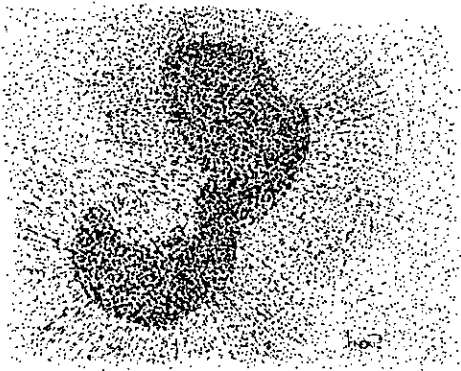


Phialophora verrucosa

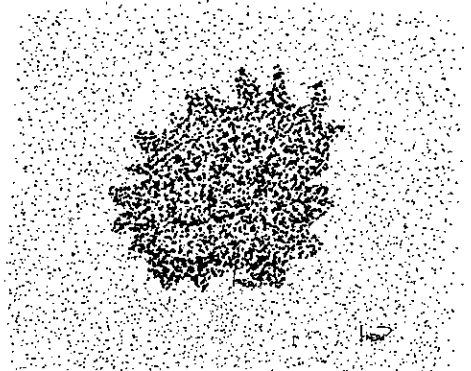


Sporothrix schenckii

ii) Actinomicetos.-



* *Nocardia asteroides*



* *Actinomadura madure*

Discusión:

Algunas cepas presentaron dificultades para su desarrollo, las cuales se describen a continuación.

*Aspergillus clavatus y Aspergillus niger a pesar de ser hongos contaminantes, y por tanto fáciles de desarrollar, en la observación al microscopio no se ven con claridad las cabezas aspergílares, ni las microconidias que los caracterizan, esto es porque al ser su desarrollo rápido y abundante, dichas estructuras se desarrollan de una forma desordenada y apelmazada dando finalmente serias dificultades para su observación. A. niger y Monillia sp son hongos sumamente contaminantes y para trabajar con ellos se deben de tomar algunas precauciones, como lo es trabajar éstos hongos en forma separada, es decir en un solo día, o bien que sean las últimas cepas, ya que de no ser así se corre el riesgo de sufrir serias contaminaciones, principalmente con los hongos de un desarrollo más lento, esto se debe principalmente a las características físicas de estos hongos, poseen conidias fácilmente liberables y volátiles.

*Fusarium sp Debido a que es una cepa de múltiples resiembras, con facilidad se pierde el equilibrio de macro y microconidias, haciendo que predominen estas últimas, de manera que sólo observamos un 10-15% de macroconidias; por lo tanto para tener una colección con una adecuada forma de reproducción, deben sembrarse cepas de primoaislamiento.

En los dermatofitos, Epidermophyton floccosum, Microsporum gypseum y Trichophyton mentagrophytes se enfrentó el problema del pleomorfismo fúngico, ya que inicialmente estos hongos fueron cultivados en medio de PZ agar (papa-zanahoria), pero el desarrollo fue nulo o muy lento (20-25 días) presentándose con frecuencia sólo un micelio blanco, algodonoso y estéril, ya que al revisar al microscopio estas laminillas no se logró encontrar ninguna estructura de reproducción, por lo que se decidió cambiar de medio de cultivo de PZ agar a medio de Borelli, obteniendo así un mejor desarrollo y en un menor tiempo (15-20 días), encontrándose una cantidad satisfactoria de macro y microaleuroconidias. Estos hongos por ser de desarrollo más lento presentaron frecuentemente problemas de contaminación con hongos contaminantes, principalmente con A. niger.

Los hongos levaduriformes que presentaron dificultad fueron los ascosporados: Saccharomyces cerevisiae y S. bayanus, ya que en los medios de cultivo donde inicialmente se sembraron (zanahoria y medio V8 respectivamente) no se obtuvieron ascosporas, por lo que se decidió cambiar al medio de agar acetato, observándose así, una mejor producción en el mismo tiempo estipulado para su desarrollo, mientras que Hansenula sp., no presentó ningún problema para producir ascosporas al inducir su desarrollo en la zanahoria.

El resto de las cepas no presentaron dificultades para su desarrollo, utilizando el medio de cultivo estándar de Sabouraud, y las características microscópicas del resto de las cepas se observan claramente ya que las tinciones realizadas fueron por Gram, tinción con tinta china y tinción de ascosporas, donde

se utilizaron frotis tomados directos del cultivo y no requirió de algún paso adicional. (8,10,17,18,19,20,44)

Algo que comentar es que las tinciones con eritrocina son muy complicadas, laboriosas y tediosas, así como que los reactivos utilizados para su elaboración son tóxicos (eritrocina, xilol, acetona), el tiempo para realizar esta tinción es largo, así como para la siembra de cada una de las cepas se tiene que tomar las debidas precauciones para no sufrir algún tipo de contaminación.

Conclusión:

Considerando que para el estudio de la Micología es de importancia que se cuente con laminillas que muestren claramente las estructuras de las que constan los hongos de importancia educacional, esta tesis cumple con el objetivo planteado proporcionando una laminoteca de los hongos contaminantes y patógenos que se estudiarán en la materia de Micología.

Se constató la capacidad que tienen los dermatofitos para pleomorfizar si se tiene alguna variación en la temperatura de incubación o se cambia de medio de cultivo ya que se observó una gran variación en los tiempos de desarrollo así como en la producción de estructuras de reproducción al cambiar el medio de cultivo.

se utilizaron frotis tomados directos del cultivo y no requirió de algún paso adicional. (8,10,17,18,19,20,44)

Algo que comentar es que las tinciones con eritrocina son muy complicadas, laboriosas y tediosas, así como que los reactivos utilizados para su elaboración son tóxicos (eritrocina, xilol, acetona), el tiempo para realizar esta tinción es largo, así como para la siembra de cada una de las cepas se tiene que tomar las debidas precauciones para no sufrir algún tipo de contaminación.

Conclusión:

Considerando que para el estudio de la Micología es de importancia que se cuente con laminillas que muestren claramente las estructuras de las que constan los hongos de importancia educacional, esta tesis cumple con el objetivo planteado proporcionando una laminoteca de los hongos contaminantes y patógenos que se estudiarán en la materia de Micología.

Se constató la capacidad que tienen los dermatofitos para pleomorfizar si se tiene alguna variación en la temperatura de incubación o se cambia de medio de cultivo ya que se observó una gran variación en los tiempos de desarrollo así como en la producción de estructuras de reproducción al cambiar el medio de cultivo.

En cuanto a las levaduras ascospóridas se comprobó que el medio de cultivo tiene influencia para la producción de éstas estructuras de reproducción.

Para evitar problemas de contaminación es importante tomar medidas de precaución al trabajar con hongos que tienen desarrollos a diferentes tiempos ya que esto ocasiona que los hongos contaminantes tomen ventaja con respecto a los de desarrollo más lento ocasionando serios problemas de contaminación.

Para observar con claridad las características específicas de un hongo, en especial los contaminantes y dermatofitos, se obtienen mejores resultados de una cepa proveniente de un primo aislamiento que de una proporcionada de un cepario, ya que las características estructurales macro y microscópicas tienen una gran variación; observándose las características típicas descritas en la literatura en las cepas provenientes de un primo aislamiento y no en las provenientes de un cepario.

ANEXO

MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y COLORANTES

Sabouraud agar:

Dextrosa 20 g, Peptona 10 g, Agar bacteriológico 20g,

Agua destilada 1000 ml. pH 6.5

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.

USO: medio de cultivo estándar para cultivos.

Agar acetato:

Agar 16 g. Acetato de sodio 5 g. Agua destilada 1000 ml. PH 6.5-7

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.

USO: producción de ascosporas de *Saccharomyces* incubar a 30°C por 7 días o 28°C por 10-15 días.

Medio de Borelli:

Harina de trigo 14 g. Leche descremada 14 g. Miel de abeja 7 g. Agar bacteriológico 14 g. Agua destilada 1000 ml. pH 6.5

Vaciar en tubos y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min. Resuspender en vortex e inclinar los tubos.

USO: estimula la fructificación de los dermatofitos.

Papa zanahoria agar (PZ-agar):

Pulpa de zanahoria 20 g. Pulpa de papa 20 g. Agar bacteriológico 16 g. Agua destilada 1000 ml.

Preparación: las pulpas maceradas se hierven a fuego lento por 45-30 min., posteriormente se filtra a través de una gasa y se le adiciona al filtrado la cantidad necesaria de agua para completar a 1000 ml y se agrega el agar. PH 6.5-7

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.

USO: medio de conservación y de esporulación.

Medio V8 agar:

Filtrado de jugo V8 500 ml. Extracto de levadura 10 g. Agar bacteriológico 20 g. Agua destilada 500 ml. pH 6.5-7

Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 min.

USO: medio de aislamiento e identificación de levaduras y producción de ascosporas.

Agua glicerizada:

Agua destilada 150 ml. Glicerina 7.5 ml.

USO: Material utilizado para mantener la humedad en el microcultivo

Eritrocina:

Eritrocina 1 g. Alcohol etílico 1 ml. Agua destilada 98 ml.

Preparación: disolver el colorante en el alcohol etílico, posteriormente agregar el agua destilada.

USO: como colorante de microcultivos.

Acetona:

USO: reactivo de decoloración para microcultivos.

Xilol-acetona:

Xilol 500 ml. Acetona 500 ml.

USO: reactivo de decoloración para microcultivos.

Xilol:

USO: reactivo de decoloración para microcultivos.

Fucsina básica:

Solución A: Fucsina básica 4 g. Alcohol etílico 20 ml.

Solución B: Fenol 8 ml. Agua destilada 100 ml.

Preparación: dejar reposar la solución A por 24 hrs., posteriormente agregar la solución B y filtrar.

USO: colorante en la tinción de ascosporas.

Alcohol ácido:

Acido sulfúrico 0.5 ml. Alcohol etílico 96% 100 ml.

USO: decolorante en la tinción de ascosporas.

Solución de cristal violeta:

Solución A: cristal violeta 2 g. Alcohol etílico 96% 20 ml.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Solución B: Oxalato de amonio 0.9 g. Agua destilada 80 ml.

Preparación: mezclar la solución A y B y dejar reposar por 24 hrs; filtrar.

USO: colorante primario de Gram.

Lugol:

Yodo 1 g. Yoduro de potasio 2 g. Agua destilada 300 ml.

USO: mordente en la tinción de Gram.

Alcohol-acetona:

Alcohol etílico 80 ml. Acetona 20 ml.

USO: decolorante en la tinción de Gram.

Safranina:

Solución A: Safranina 25 g. Alcohol etílico 100 ml.

Solución B: 10 ml de solución A. Agua destilada 90 ml.

USO: colorante secundario en la tinción de Gram.

Bibliografía:

1. Sánchez Marroquín A. *Principios de Microbiología Industrial*. Editorial Química . S.A. México DF. 1961.
2. Rhodes A, Derek L, Fletcher, et al. *Principles of Industrial Microbiology*. 2º Ed. UK. 1966.
3. Bonifaz A. *Micología Médica Básica*. Méndez editores. México DF. 1990
4. Tay J, Gutierrez M. *Microbiología y Parasitología Médicas*. 2º edición. Méndez editores SA de CV. México 1994
5. Brock T, Smith DW, Madigan MT. *Microbiología*. 4º edición Prentice-Hall Hispanoamericana S.A. México 1987.
6. *Memorias del segundo Diplomado de Micología Médica* Junio 15 - Julio 10 1998, Facultad de Medicina UNAM, Departamento de Microbiología y Parasitología; Laboratorio de Micología Médica.
7. Arenas R. *Micología Médica Ilustrada*. Primera edición. Interamericana. McGraw-Hill. México 1993.
8. Fragoso López C. *Conservación en solución salina estéril de hongos de interés para la enseñanza*. TESIS de licenciatura, Facultad de Química UNAM. 1982.
9. Jimenez Aviña M. E. *Estudio de las infecciones micóticas en pacientes HIV positivos*. TESIS de licenciatura, Facultad de Química UNAM. 1991.
10. Sikorski-R; Peters-R. (1997) *Selecting the needle*. Science, 277: 975

11. Burge HA. (1992) *Classification of the fungi*. Clin Rev Allergy, 10: 153-63
12. Botstein-D; Chervitz-SA; Cherry-JM. (1997) *Yeast as a model organism*; Science, 277:1259-60.
13. O'Donnell K; Peterson SW. (1992) *Isolation, preservation, and taxonomy*. Biotechnology, 21: 7-39
14. Heath IB. (1988) *Recommendations for future taxonomic studies of gut fungi*. Biosystems, 21: 417-8
15. Hawksworth DL. (1989) *Taxonomic stability [letter]*. Nature, 337: 416
16. McGinnis MR. (1980) *Recent taxonomic developments and changes in medical mycology*. Annu Rev Microbiol, 34: 109-35
17. Fujikawa H; Aketagawa J; Nakazato M; Wauke T; et al. (1999) *Growth of moulds inoculated into commercial mineral water*. Lett Appl Microbiol, 28:211-5
18. Hawksworth DL. (1984) *Fungi in culture [letter]* Nature, 310: 18
19. Inglis GD; Boland GJ. (1992) *Evaluation of filamentous fungi isolated from petals of bean and rapeseed for suppression of white mold*; Can J Microbiol, 38: 124-9
20. De Hoog GS; Gueho E. (1985) *A plea for the preservation of opportunistic fungal isolates*. Diagn Microbiol Infect Dis, 3: 369-72
21. Blackmon JA. (1981) *Aspergillus niger [letter]*; Am J Clin Pathol, 76: 506
22. Nguyen TK; Martinkova L; Seichert L; Machek F. (1992) *Citric acid production by Aspergillus niger using media containing low concentration of glucose or corn starch*. Folia Microbiol. 37: 433-41

23. Buchi G; Kitaura Y; Yuan SS; Wright HE; et al. (1973) *Letter: structure of cytochalasin E, a toxic metabolite of Aspergillus clavatus*. J Am Chem Soc, 95: 5423-5
24. Hesseltine CW; Shotwell OL; Ellis JJ; et al. (1966) *Aflatoxin formation by Aspergillus flavus*. Bacteriol Rev, 30: 795-805
25. Berka RM; Dunn-Coleman N; Ward M. (1992) *Industrial enzymes from Aspergillus species*. Biotechnology, 23:155-202
26. Gharei M. (1985) *Fermentative production of polysaccharides by Aspergillus*. Indian J Exp Biol, 23: 347-8
27. Kivanc M. (1992) *Fungal contamination of Kashar cheese in Turkey*. Nahrung, 36:578-83
28. Requejo H. (1975) *Micoflora atmosferica de la ciudad de Trujillo (Perú). III. Géneros aislados durante el año de 1971*. Mycopathologia, 56: 15-20
29. Herman LG. (1980) *Fungi as agents of airborne contagion*; Ann N Y Acad Sci, 353: 115
30. Morrissey JP; Osbourn AE. (1999) *Fungal Resistance to Plant Antibiotics as a Mechanism of Pathogenesis*. Microbiol Mol. Biol, 63: 708-24
31. Sinha RK; Nandi PN. (1968) *Anew antibacterial agent produced by Streptomyces sp.* Experientia, 24:795-6
32. McGinnis MR; Hilger AE. (1971) *A key to the genera of medically important fungi* Mycopathol Mycol Appl, 45:269-83
33. López R. (1980) *Isolation of dermatophytes from different natural source*. Fifth Int. Conf. On the Mycoses. Caracas, 205-10

34. Bonifaz A, (1988). *Aspectos micológicos de las micosis más frecuentes en México*.
Medicine, 19: 2380-85
35. Vanbreuseghem R. (1977) *Modern classification of dermatophytes*
Dermatologica, 155: 1-6
36. Matsumoto T; Ajello L. (1987). *Current taxonomic concepts pertaining to the
dermatophytes and related fungi*. Int J Dermatol, 26: 491-99
37. Bentley-Phillips CB. (1977) *Fungal infections of the skin*. Nurs Times, 73:suppl21-
4
38. Hay RJ. (1992) *Fungal Skin infections*. Arch Dis Child, 67: 1065-7
39. Macura Ab. (1993) *Dermatophyte infections*. Int J Dermatol, 32: 313-23
40. Smoker A. (1999) *Fungal infections*. Nurs Stand, 13:48-52
41. Lavallo P. (1968). *Granuloma por Epidermophyton floccosum*. Dermatología Rev.
Mex, 12: 369
42. Leeming-JG; Elliott-TS; (1995) *The emergence of Trichophyton tonsurans tinea
capitis in Birmingham, UK*; Br J Dermatol 133: 929-31
43. Howard RM; Frieden IJ. (1999) *Dermatophyte infections in children*. Adv Pediatr
Infect Dis, 14:73-107
44. Aly R; (1994) *Culture media for growing dermatophytes* ; J Am Acad Dermatol 31:
107-8.
45. Mancianti F. (1998) *Comments on Microsporum canis [letter]*. Med Mycol, 36: 247-
8
46. Zaias N. (1985). *Onychomycosis* . Dermatol Clin, 3: 445-60

47. Arenas R; Woo G. (1981). *Hongos negros. Panorama actual*. Dermatología Rev Mex, 25: 243-54
48. Bonifaz A. (1985). *Los hongos oportunistas, un problema de nuestros días*. Rev Med Hospital Gral Mex S.S., 47: 511-16
49. Sullivan DJ; Henman MC; Moran GP; O'Neill LC; et al. (1996) *Molecular genetic approaches to identification, epidemiology and taxonomy of non-albicans Candida species*. J Med Microbiol, 44: 399-408
50. Dykstra MA; Friedman L; Murphy JW. (1977) *Capsule size of Cryptococcus neoformans: control and relationship to virulence*. Infect Immun, 16:129-35
51. Loaliza-Loeza MS. (1988). *Criptococosis*. Infectología, 8: 387-95
52. Bonifaz A., Flores MP., Araiza J. (1996) *Criptococosis y su diagnóstico de laboratorio* Lab-Acta, 8:37-43
53. Bertout S; Renaud F; Swinne D; Mallié M; Bastide JM; (1999) *Genetic Multilocus Studies of Different Strains of Cryptococcus neoformans: Taxonomy and Genetic Structure*; J Clin Micro 37:715-20
54. Bubb WA; Wright LC; Cagney M; Santangelo RT; et al. (1999) *Heteronuclear NMR studies of metabolites produced by Cryptococcus neoformans in culture media: Identification of possible virulence factors*. Magn Reson Med, 42:442-453
55. Naumov GI; Nikonenko TA; Kondrat'eva VI. (1994) *Taxonomic identification of Saccharomyces from yeast genetic stock centers of the University of California*. Genetika, 30: 45-8
56. Novales J. (1983). *Histopatología de las micosis profundas*. Dermatol Rev Mex, 27: 128-55

57. Carrion AL; Silva-Hutner M. (1971) *Taxonomic criteria for the fungi of chromoblastomycosis with reference to Fonsecaea pedrosoi*. Int J Dermatol, 10: 35-43
58. Saúl A. (1972). *Esporotricosis*. Dermat Rev Mex, 16:82-84
59. Lavalle P; Mariat F. (1983). *Sporotrichosis*. Bull Inst Pasteur, 81: 295-322
60. Torres-Guerrero H. (1999) *Ploidy study in Sporothrix schenckii*. Fungal Genet Biol, 27: 49-54
61. Smego RA Jr; Foglia G. (1998) *Actinomycosis*. Clin Infect Dis, 26: 1255-61
62. González-Ochoa A. (1973). *Virulence of Nocardia*. Can J Microbiol, 19: 901-3
63. Calam CT. (1964) *The selection, improvement, and preservation of micro-organisms*. Prog Ind Microbiol, 5:1-53
64. Bezes H. (1966) *Surgical aspect of mycetomas*. Cah Coll Med Hop Paris, 7: 67-9
65. Gokhale BB. (1981) *Epidemiology of mycetoma*. Hindustan Antibiot Bull, 23:18-24
66. Lindtjorn B. (1984) *Mycetoma [letter]*. Ethiop Med J, 22: 70
67. Bouree P; Aube C. (1988) *Mycetomas*. Soins, 518:19-22
68. Hay RJ; Mahgoub ES; Leon G; al-Sogair S; et al. (1992) *Mycetoma*. J Med Vet Mycol, 30 suppl 1: 41-9