

9

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA**



**"AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE HONGOS A  
PARTIR DE PACIENTES INMUNODEPRIMIDOS EN  
UN CENTRO HOSPITALARIO DE LA CIUDAD  
DE MEXICO"**

**TESIS DE LICENCIATURA**

**QUE PRESENTA:  
ERIKA CORDOVA MARTINEZ  
PARA OBTENER EL GRADO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO**

**DIRECTORA DE TESIS: DRA. FRANCISCA HERNANDEZ HERNANDEZ**

**ASESORA: QBP MARIA LUISA DELGADO BRISEÑO**

**ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE MICOLOGIA  
MEDICA, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM Y EN EL LABORATORIO DEL  
HOSPITAL REGIONAL "GENERAL IGNACIO ZARAGOZA "ISSSTE.**



297289



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.

## DEDICATORIAS

A Jehová, por permitir la existencia de las personas y las circunstancias necesarias para concluir con este compromiso.

A mis padres, que por su inmenso amor soportaron todas las incomodidades y asumieron responsabilidades importantes que me correspondían.

A mi esposo Florencio, por apoyarme tanto como pudo y por cumplir con su promesa.

A mi hijo Fernando, por ser el principal móvil de este y todos mis propósitos.

A mi amiga-hermana Rosa, por estar siempre al pendiente de mi felicidad y del bienestar de mi familia en los momentos difíciles.

A mi tía Feli, por querer tanto a mi familia, por creer en mi casi como si fuera su hija.

A Francisca Hernández, que con paciencia y bondad compartió conmigo sus conocimientos y dirigió cada uno de mis pasos hasta el final de nuestro trabajo.

## AGRADECIMIENTOS

A Elva, por estar siempre dispuesta a ayudarme con mis dudas y por orientar mi camino a la superación.

A Rocío Álvarez, por la confianza, el apoyo y su compañía, que suavizaron situaciones inconvenientes para mi familia y para mi

A Edith Sánchez, Patricia Manzano, Rocío Castañon, Rafael Romero, Luis Javier Méndez que siempre colaboraron de buena manera con trabajo, sugerencias y asesoramientos.

Al Dr. Rubén López, por permitirme entrar a su laboratorio y a su vida profesional sin obstáculos.

A. Cristina Fragoso, que fue uno de los primeros eslabones en esta larga cadena de personas con profesionalismo y mucho corazón.

Al Dr. Schabib, por que a pesar de todo nos brindó su valioso apoyo.

Al QFB Antonio Gómez, por apoyar este trabajo y confiar en mi persona.

A Mauricio Rodríguez, que hizo a un lado otras actividades por ayudarnos con su habilidad fotográfica.

# INDICE

|                            | PAGINAS |
|----------------------------|---------|
| ANTECEDENTES               | 1       |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 19      |
| OBJETIVOS                  | 22      |
| HIPÓTESIS DE TRABAJO       | 23      |
| MATERIAL                   | 24      |
| METODOLOGÍA                | 29      |
| RESULTADOS                 | 37      |
| DISCUSIÓN                  | 46      |
| CONCLUSIONES               | 58      |
| PERSPECTIVAS               | 60      |
| BIBLIOGRAFÍA               | 62      |
| APÉNDICE A                 | 68      |
| APÉNDICE B                 | 74      |
| APÉNDICE C                 | 79      |
| APÉNDICE D                 | 81      |
| APÉNDICE E                 | 84      |
| APÉNDICE F                 | 86      |

## ANTECEDENTES

Los hongos son microorganismos de estructura celular eucariótica, simples y de gran adaptabilidad a diversos ambientes. Son importantes recicladores biológicos, principalmente de restos orgánicos. Su nutrición es heterotrófica, lisotrófica o absorbente. Carecen de cloroplastos y pigmentos asimiladores (clorofila) y dependen de una nutrición carbonada. No son móviles y tienen una pared celular rígida compuesta de polisacáridos, polipéptidos, quitina y raramente de celulosa. La membrana plasmática posee ergosterol como principal esteroide. En el espacio citoplásmico, contiene todas las organelas propias de una célula eucariótica, mitocondrias, ribosomas, retículo endoplásmico, mesosomas, núcleo, nucléolo y centriolo (1).

Dentro de los seres vivos, los hongos han sido ubicados en el reino Fungi (Whitaker, 1969), clasificación ampliamente aceptada por la comunidad científica en los últimos años. Sin embargo, recientemente D. L. Hawksworth propuso una clasificación en la que distribuye a los hongos en tres reinos: Chromista, Fungi y Protozoa. Los hongos clasificados en el reino Chromista se consideran atípicos, ya que no tienen la capacidad de ser fotosintéticos; sólo 2 hongos de este reino tienen importancia médica y son *Pythium insidiosum* y *Rhinosporidium seeberi*. La mayoría de los hongos de importancia médica pertenecen al reino Fungi, el cual está compuesto por organismos no fotosintéticos, que obtienen nutrientes por absorción y cuya pared celular contiene quitina y  $\beta$ -glucanas; este reino está conformado por los Phyla Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota y Zygomycota. Dentro del reino Protozoa, donde

están incluidos organismos predominantemente unicelulares plasmodiales o coloniales y fagotrópicos, no se encuentra incluida alguna especie que ataque al ser humano (2) .

Los hongos son organismos ubicuos en la naturaleza en la que ocupan un importante nicho ecológico. Se encuentran en el suelo, el agua, sobre restos orgánicos, en plantas o animales, incluyendo al hombre (3). El hábitat natural de los hongos es el ambiente externo, donde se encuentran en su estado saprófito (micelio y propágulas) o sobre materia orgánica en descomposición. A partir de aquí, el hongo puede llegar a un hospedero vivo. Cuando lo hace, normalmente puede utilizar vías diferentes: inhalación a través del aparato respiratorio, por contacto directo con la piel o mucosas y traumática. Una vez que el hongo se encuentra en su nuevo hábitat, debe adaptarse a las condiciones que este le impone, particularmente a una temperatura mayor y a un ambiente tisular más reducido; además debe enfrentar los mecanismos defensivos del hospedero. No todos los hongos son capaces de sobrevivir en estas nuevas condiciones; aquellos que sí lo hacen sufren modificaciones importantes en su morfología, metabolismo, componentes de la pared celular, sistemas enzimáticos y *mecanismos de reproducción*. Este cambio, principalmente el morfológico que experimenta el hongo se conoce como dimorfismo, el cual representará a los diversos estados parasitarios que manifiestan los hongos en los tejidos afectados. Una fuente adicional de infección importante es la endógena. Algunos hongos viven como parte de la biota normal en el organismo humano y se tornan patógenos sólo si se dan condiciones particulares en el mismo hospedero (1).

Se han reconocido más de 100 especies de hongos como causantes de enfermedad humana; sólo algunas de ellas parecen depender del hospedero humano como parásitos y la mayoría solo lo infectan de forma accidental (3).

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), las micosis se han clasificado en superficiales, subcutáneas y sistémicas. Las micosis sistémicas son causadas por hongos patógenos verdaderos y por hongos considerados oportunistas (2).

Los hongos que producen las micosis superficiales tienen capacidad únicamente para afectar algunas capas de la epidermis, pelos y anexos, y estas infecciones se adquieren por contacto directo (4).

Las micosis subcutáneas son adquiridas por inoculación traumática y afectan a la piel como puerta de entrada, extendiéndose al tejido subcutáneo y con capacidad para invadir otros tejidos profundos, como el tejido muscular y el tejido óseo. Habitualmente no se observan diseminaciones por vía hematológica o linfática, con excepción de la esporotricosis (4).

Las micosis sistémicas se adquieren por inhalación y por lo tanto se localizan principalmente a nivel pulmonar de donde posteriormente tienden a diseminarse por vía hematológica a diferentes órganos y sistemas del cuerpo. Un grupo de hongos causantes de este tipo de micosis se denominan patógenos verdaderos o patógenos primarios porque cuentan con un elevado potencial de virulencia. Este tipo de micosis también puede estar causado por otro grupo de hongos denominados oportunistas los cuales requieren de estar en un medio que carezca de un estado inmunológico normal para comportarse como patógenos.

Existen otros padecimientos causados por algunas bacterias del grupo de los Actinomycetales y diversos *Corynebacterium*, así como ciertas algas aclorofílicas que se estudian en micología médica y se denominan falsas micosis o pseudomicosis (2,4).

A pesar de que en la actualidad hay más control de los padecimientos infecciosos, las enfermedades oportunistas lejos de desaparecer, se incrementan día a día. El oportunismo de los microorganismos se ve favorecido por el desarrollo de nuestra propia tecnología, como el surgimiento de nuevos y cada vez más potentes antibióticos, esteroides, citotóxicos, etc. o bien de procedimientos diagnósticos y quirúrgicos altamente invasivos (5). Es igualmente importante el aumento de la población de individuos inmunodeprimidos. El estado de inmunodepresión involucra diversas condiciones (Tabla 1): pacientes con trasplante de médula ósea y pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), quienes tienen defectos de uno o varios componentes del sistema inmune; pacientes con daños en varios órganos y que se encuentran en unidades de cuidados intensivos (UCI) por periodos prolongados, cuya inmunodepresión no es fácilmente definida. Sin embargo, estos pacientes representan un grupo blanco importante con infecciones fúngicas invasivas en muchos hospitales (6). El sistema de datos del National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) muestra que los hongos representan el 9% de todas las infecciones nosocomiales en E.U. Desde 1980 hasta 1990, la relación de infecciones fúngicas nosocomiales se incrementó de 2.0 a 3.8 infecciones por cada 1,000 pacientes reportados. La mortalidad por infecciones fúngicas oportunistas excede el 50% en muchos estudios y se ha reportado hasta de un 95% en pacientes con trasplante de médula ósea por infección con especies de *Aspergillus*. La mortalidad atribuida para pacientes con candidemia ha sido estimada en 38% (7)

**Tabla 1. Factores de riesgo que favorecen las infecciones fúngicas.**

- 
- Pacientes hematológicos (leucemias, linfomas)
  - Transplantes (médula ósea, órganos sólidos)
  - Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
  - Neutropenia asociada a enfermedades o drogas
  - Enfermedades vasculares de la colágena (cuando son tratadas con drogas inmunodepresoras)
  - Pacientes en UCI con cirugía o perforación gastrointestinal, cateter venoso central, nutrición parenteral total, antibióticos de amplio espectro, quemaduras, daño multiorgánico o recién nacidos.
  - *Diabetes mellitus* con cetoacidosis
  - Terapia de quelación de hierro con deferoxina
  - Enfermedades crónicas granulomatosas
  - Corticoesteroides
  - Agentes quimioterapéuticos para cáncer
  - Ciclosporinas.
- 

El fenómeno de oportunismo está estrechamente relacionado con los factores predisponentes asociados al hospedero; sin embargo, también se deben presentar ciertas condiciones del hongo mismo así como del ambiente o microambiente.

Para que un hongo pueda comportarse como oportunista debe contar con ciertas características:

- Crecer a una temperatura de 37 ° C ó más.
- Realizar un cambio bioquímico, debido a que las condiciones nutricionales del hospedero son ricas; por tanto se requiere de producción de nuevas enzimas, adaptarse a un medio que por lo general presenta un menor potencial de reducción y un pH neutro.
- Realizar un cambio morfológico casi siempre con tendencia a la simplificación
- Entrar en contacto con el hospedero. Hay algunos casos en los que no se requiere de un contacto exógeno debido a que ciertos hongos pertenecen a la biota normal del cuerpo, por lo tanto este tipo de enfermedades son de origen endógeno, como es el caso de la candidosis, la actinomicosis y la geotricosis (5).

Castañón-Olivares y cols., realizaron un estudio en un Hospital de Neumología con 240 pacientes. De todos ellos, apoyándose en la valoración clínica y en los parámetros de laboratorio, lograron diagnosticar candidosis pulmonar en 57 pacientes (23.7%), siendo la micosis oportunista de mayor frecuencia (10).

En un estudio realizado por Manzano Gayosso y cols. en donde se reportó la frecuencia de los aislamientos de levaduras a partir de diferentes productos biológicos de pacientes atendidos en un hospital de la ciudad de México durante un año, se encontró que *Candida albicans* producía el 72.3% de los casos de infección, seguida por *C. glabrata* (13.4%) y *C. parapsilosis* (8%) (11).

En un hospital de especialidades de la ciudad de México, Méndez-Tovar y cols realizaron un estudio retrospectivo dividido en dos periodos: 1967-1977 con 15429 pacientes y 1993-1997 con 5998 pacientes. Durante el primer periodo en 3161 pacientes se diagnóstico alguna micosis, presentandose la candidosis en 381 casos (superficiales y profundas); en el segundo periodo, el diagnóstico de micosis fue establecido en 1881 pacientes, de los cuales 355 presentaron candidosis en sus diferentes variedades clínicas, ocupando de esta manera el primer lugar dentro de las micosis oportunistas en esos años (12).

Dentro del grupo de los pacientes con SIDA se ha observado la incidencia de infecciones por *Candida* que son resistentes a los tratamientos antifúngicos utilizados rutinariamente. Debido a esto los estudios epidemiológicos se han orientado a la determinación de la resistencia a antifúngicos como un factor emergente de virulencia en algunas especies de *Candida*. Tal es el caso de *Candida dubliniensis*, que está asociada principalmente con casos de candidosis bucal en pacientes infectados con el VIH o que han desarrollado SIDA y que son resistentes al tratamiento. Los aislamientos

1998. Las cepas fueron obtenidas de pacientes atendidos en diversos centros hospitalarios de la ciudad de México. *C. neoformans* fue el agente predominante (97.15%), seguido de *C. albidus* y *C. uniguttulatus*. El 92.5 % de las cepas fueron aisladas a partir de líquido cefalorraquídeo y las restantes provinieron de médula ósea, sangre, ganglio, esputo, lavado broncoalveolar y biopsia de hígado (14).

Aunque menos común que la candidosis, la aspergilosis es una micosis que también amenaza a los pacientes inmunodeprimidos. La exposición a *Aspergillus* sp. ocurre comunmente, ya que éstos organismos crecen en una gran variedad de materia orgánica y sus conidios son fácilmente dispersados en el ambiente. Aunque la exposición es universal, la infección invasiva no es común y ocurre únicamente en individuos inmunodeprimidos. Los brotes han sido descritos en trasplante de médula ósea, trasplante de órganos sólidos y pacientes con leucemia asociados con la construcción y/o sistema de ventilación contaminados con *Aspergillus*. Las especies de *Aspergillus* más implicadas como causa de enfermedades invasivas son *Aspergillus fumigatus* y *A. flavus* (6). En un estudio realizado por Bazan Mora y col. en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias por un período de un año (1991-1992), se encontró que de 306 pacientes, 13 presentaron micosis pulmonar y de éstos, 2 desarrollaron aspergilosis por *Aspergillus fumigatus* y en otro paciente no se logró determinar la especie (15).

La relación entre las infecciones por especies de *Aspergillus* y los pacientes infectados por VIH es difícil de establecer. En la definición inicial de SIDA publicada por el Center for Disease Control (CDC) en 1983, las infecciones por especies de *Aspergillus* fueron incluidas como marcadoras de SIDA. Sin embargo en las subsecuentes revisiones de las guías para la definición del SIDA del CDC, se

eliminaron a las infecciones causadas por *Aspergillus*, ya que el número de pacientes infectados reportados fue pequeño. Por otra parte la patogénesis aceptada para la aspergilosis invasiva no involucra la inmunidad mediada por células, sino que está asociada con la depleción de neutrófilos y de la proporción monocitos/macrófagos. Sin embargo hay reportes recientes de nuevos focos de infecciones por especies de *Aspergillus* entre los pacientes infectados por VIH. Esta asociación aparece especialmente entre individuos que tienen factores de riesgo para infecciones por especies de *Aspergillus* como granulocitopenia, administración de glucocorticoides o agentes antimicrobianos de amplio espectro. Mientras que la mayoría de los pacientes infectados por VIH con aspergilosis caen en estos grupos de riesgo, en un gran número de pacientes no se detecta un factor de riesgo claramente definido (9).

La infección con organismos pertenecientes al orden Mucorales (Zigomicetos) en individuos inmunodeprimidos causan padecimientos rinocerebrales, pulmonares, o infecciones diseminadas severas. Los organismos causantes de zigomicosis (*Rhizopus* spp. y con menor frecuencia, *Mucor* spp. y *Absidia* spp) son rutinariamente encontrados en el medio ambiente. A pesar de su exposición común, la infección es rara y ocurre solamente en hospederos inmunodeprimidos o en aquellos con otros factores de riesgo específicos. En la población que no está infectada por el VIH, los típicos factores de predisposición para una zigomicosis incluyen: cetoacidosis diabética, neutropenia, leucemia, terapia inmunodepresiva para transplante de órganos, falla renal y tratamiento con desferrioxamina. En la infección por VIH, el uso de drogas intravenosas es un importante factor de riesgo para zigomicosis en estos pacientes (16).

La población de pacientes inmunodeprimidos no solo está expuesta a la infección por hongos oportunistas como los que se han descrito hasta ahora; también tiene el riesgo de contraer una infección por hongos patógenos como: *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii* y *Paracoccidioides brasiliensis* (17).

El primer reporte de histoplasmosis diseminada progresiva (HDP) fue publicado en 1983; después otras infecciones oportunistas asociadas con el VIH han sido descritas en las áreas endémicas para *H. capsulatum*. La incidencia de HDP en personas infectadas con VIH varía de un lugar a otro. En Houston y Dallas, Texas, el límite del área endémica de histoplasmosis, la incidencia es aproximadamente del 5%; en Indianapolis e Indiana es del 27%. En nuestro país, el INDRE informó de 33 casos de histoplasmosis en 6914 pacientes hasta diciembre de 1991. En el Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubiran", se informó de 21 casos de histoplasmosis diseminada en 365 pacientes con SIDA atendidos en el periodo de 1983 a 1990; y el Centro Médico La Raza (IMSS), reportó 34 casos de los 1300 casos con SIDA atendidos hasta 1992 (18).

La coccidioidomicosis es una infección fungica causada por *Coccidioides immitis*; es endémica en el suroeste de los Estados Unidos y norte de México. La infección coccidioidal es mortal y ha sido encontrada en pacientes infectados con VIH, como ocurre en otras personas con defectos en su inmunidad celular como los transplantados (6,9).

En cuanto a la blastomicosis se puede decir que es una complicación poco común en las personas con VIH. Además de los pocos casos aislados reportados, sólo 15 pacientes han presentado ésta asociación. Muchos de los casos fueron reportados

en el área endémica del hongo; sin embargo varios individuos han desarrollado blastomicosis fuera de dicha área. Mientras que todos estos pacientes han tenido residencia en áreas conocidas como endémicas en el pasado, ellos estuvieron lejos de las fuentes potenciales de infección por varios años. Esta aparente reactivación tardía de focos latentes de blastomicosis pueden ocurrir cuando la inmunidad del hospedero disminuye progresivamente debido a la infección por VIH. Patrones similares se han observado en otras micosis endémicas (9).

*Sporothrix schenckii*, es un hongo dimórfico que frecuentemente causa enfermedades linfocutáneas después de la inoculación por traumatismo en piel. En raras ocasiones este microorganismo puede causar enfermedad pulmonar, diseminada, y del sistema nervioso central. Son pocos los datos de infección por *S. schenckii* que han sido reportados como complicación en pacientes con VIH. Los pacientes que desarrollan la enfermedad diseminada tienen afectada la piel, articulaciones, pulmones ó médula ósea (9).

Dependiendo del tipo y severidad del compromiso de las defensas del hospedero, los pacientes inmunodeprimidos pueden desarrollar una infección por variedades poco comunes de hongos. Entre ellos se encuentra *Penicillium marneffeii* el cual ha causado infección pulmonar en pacientes con SIDA y con antecedentes de drogadicción que radican o han viajado al sudeste asiático, área endémica de este hongo (6).

El grupo de hongos conocidos como dematiáceos están en el medio ambiente como saprobios y causan una serie de infecciones en los individuos inmunodeprimidos. En los pacientes sometidos al trasplante de órganos sólidos, se desarrollan nódulos subcutáneos indoloros causados por microorganismos como *Exophiala*, *Alternaria*, o

*Phialophora* que son usualmente encontrados en el suelo o en vegetales en estado de descomposición (6).

*Fusarium*, un hongo común del suelo, ha surgido como una importante causa de infección en pacientes neutropénicos. A pesar de que es común en el medio ambiente, la exposición de pacientes inmunodeprimidos a este organismo es rara y la fusariosis permanece como una infección poco frecuente que imita en muchas características clínicas e histológicas a la aspergilosis (6)

*Trichosporon beigellii*, un hongo de aspecto levaduriforme que ha sido aislado del tracto gastrointestinal, causa fungemia e infección diseminada en muchos pacientes neutropénicos y en aquellos que reciben terapia corticoesteroide (6).

## **LOS HONGOS COMO BIOTA NORMAL**

Los hifomicetos, en forma de conidios ó de cortas ramificaciones miceliales, pueden estar presentes en las superficies del cuerpo ó en el tracto alimenticio del humano. Algunos dermatofitos, particularmente los aislamientos antropofílicos de *Trichophyton mentagrophytes*, pueden residir en los pliegues interdigitales de los pies como una tiña oculta. Pero en general los hongos filamentosos no constituyen una biota normal permanente en las superficies del cuerpo humano.

En un estudio prospectivo de la colonización de la piel, Henney y cols. aislaron 69 especies de hongos filamentosos por un periodo de 175 días pero el 71 por ciento no fue aislado más de dos veces. En contraste, muchos blastomicetos (hongos levaduriformes) constituyen parte de la biota normal de las superficies de la piel, mucosa oral, tracto intestinal y mucosa vaginal de manera regular y universal. Las especies involucradas y el número presente varían según sea la superficie del cuerpo,

pero puede hacerse un balance de la población en un nicho ecológico particular en individuos sanos. La ropa ajustada y el uso de antibióticos tópicos oclusivos son las principales causas del incremento de la biota normal de levaduras en varias superficies del cuerpo. Algunas especies son simbioses animales obligados y no forman una población estable lejos del cuerpo de un animal (por ejemplo: *Malassezia furfur* y *M. pachydermatis*). Otros son simbioses facultativos incidentales que regularmente se encuentran en la biota normal pero en pequeñas cantidades (*C. kefyr* (antes *C. pseudotropicalis*), *Rhodotorula* sp, *Trichosporon beigelii*). También han sido recuperadas del cuerpo sano *Saccharomyces*, *Endomycopsis*, *Leucosporidium*, el alga incolora *Prototheca* y *C. neoformans* (Tabla 2). En muchas fuentes sobre la incidencia de levaduras a partir de piel sana de la región anogenital, alrededor de la boca, en la vagina, el oído externo y otras regiones del cuerpo se han reportado los aislamientos de las especies enlistadas en la Tabla 3, que pueden considerarse como integrantes regulares de la biota normal en el ser humano (8).

**Tabla 2. Tipo de simbiosis entre el huésped y los hongos de la biota normal.**

---

**Simbioses cutáneas**

**Obligados**

*Malassezia furfur*  
*M. pachydermatis*

**Facultativos**

*Candida guilliermondii*  
*Torulopsis glabrata*  
*C. parapsilosis*  
*C. krusei*  
*C. seudotropicalis*  
*Rhodotorula* sp.  
*Geotrichum* sp.  
*Trichosporon beigelii*  
*Sarcinosporon inkin*

**Incidentales**

*Prototheca* sp.  
*Cryptococcus* sp.  
*Saccharomyces* sp.  
*Pichia* sp.

---

**Tabla 3. Levaduras que forman parte de la biota normal humana (6).**

---

|                         |  |                  |  |
|-------------------------|--|------------------|--|
| <b>Boca</b>             | <i>C. albicans</i><br><i>C. tropicalis</i><br><i>C. krusei</i><br><i>Trichosporon beigelii</i><br><i>Geotrichum</i> sp.      | <b>Piel</b>      | <i>C. kefyri</i><br><i>Rhodotorula</i> sp.<br><i>T. beigelii</i><br><i>T. glabrata</i><br><i>C. parapsilosis</i><br><i>C. guilliermondii</i> |
| <b>Mucosa anorectal</b> | <i>C. albicans</i><br><i>Torulopsis glabrata</i><br><i>C. tropicalis</i><br><i>Geotrichum</i> sp.<br><i>Trichosporon</i> sp. | <b>Garaganta</b> | <i>C. albicans</i><br><i>T. glabrata</i><br><i>T. beigelii</i>   |
| <b>Vagina</b>           | <i>C. albicans</i><br><i>T. glabrata</i><br><i>C. tropicalis</i><br><i>C. parapsilosis</i>                                   |                  |  |
| <b>Oído</b>             | <i>C. robusta</i><br><i>C. rhagii</i><br><i>C. parapsilosis</i><br><i>C. guilliermondii</i>                                  |                  |  |

---

Es posible que en los cultivos de productos biológicos de pacientes con alguna patología, sean recuperados hongos ubicuos o que forman parte de la biota normal. como es el caso de *Candida albicans*. Sin embargo, el hecho de obtener un cultivo positivo con el desarrollo de alguno de estos hongos (de especímenes no estériles) no nos indica forzosamente que estén causando una micosis, por esto es importante la correlación de los aspectos clínicos y micológicos para establecer un diagnóstico (5).

Durante la década pasada se incrementaron significativamente los reportes de infecciones sistémicas y de mucosas causadas por especies del género *Candida*. Los principales agentes fueron *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, y *C. lusitanae*; ocasionalmente fueron aisladas *C. guilliermondii*, *C. kefyri*, *C. famata*, *C. haemulonii*, *C. holmii*, *C. inconspicua*, *C. norvegensis*, *C. rugosa*, *C. utilis*, *C.*

**Tabla 4. Criterios para evaluar la importancia clínica del aislamiento de un hongo ubicuo ó de biota normal.**

|  |
|--|
| <b>MICROSCÓPICAMENTE</b>   |
| <ul style="list-style-type: none"><li>• Cantidad de estructuras micóticas observadas tanto en los exámenes directos, así como en las tinciones.</li></ul>  |
| <b>MACROSCÓPICAMENTE</b>   |
| <ul style="list-style-type: none"><li>• Cantidad de colonias desarrolladas en el medio de cultivo.</li><li>• Reincidencia de una especie de hongo en muestras seriadas de un mismo paciente.</li></ul> |

La confirmación de una micosis deberá estar auxiliado tanto en los resultados microbiológicos (Vitek, tubo germinativo, microcultivo, determinación de clamidosporas, etc.) como en los proporcionados por otros estudios como: inmunofluorescencia, precipitación en capilar, inmunodifusión, contrainmunolectroforesis, aglutinación de partículas de latex, R.F.C. (Reacción de fijación de complemento), E.L.I.S.A (Enzyme-linked immunosorbent assay), e intradermoreacciones; y los estudios de gabinete como tomografía axial computarizada, ecograma y estudio radiológico (23).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Varios factores han contribuido al incremento de la incidencia de infecciones micóticas en las últimas dos décadas. Una de ellas es el aumento de la población inmunodeprimida como son las personas con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), con transplante de órganos, con quimioterapia mielotóxica, con alteraciones hematológicas (leucemia, linfomas), con diabetes, con neutropenia asociada a medicamentos inmunodepresores (ciclosporinas, corticoesteroides, etc.) e incluso personas con abuso de antibióticos de amplio espectro, particularmente aquellos que se encuentran en unidades de cuidados intensivos.

Las micosis representan una causa importante de mortalidad en la población mexicana inmunosuprimida. Aunque la candidosis sigue siendo la infección fúngica más frecuente en dicha población, también existe el riesgo de que los individuos susceptibles adquieran infecciones por otros hongos patógenos oportunistas como son *Pneumocystis carinii*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Malassezia*, *Aspergillus*, *Penicillium*, etc., e incluso micosis endémicas como la histoplasmosis y la coccidioidomicosis. Además muchos hongos patógenos son resistentes a los agentes antifúngicos actualmente disponibles, lo cual favorece el aumento de la mortalidad en este grupo de pacientes.

Ya que en nuestro país han sido realizados pocos estudios integrales respecto a las infecciones micóticas en estos pacientes, se considera que para tomar medidas terapéuticas y especialmente preventivas respecto a las micosis, es necesario conocer la incidencia con la que éstas se están presentando en los

centros de atención hospitalaria. Como primer paso se requiere de conocer la frecuencia con que los pacientes inmunodeprimidos con alguna patología, infecciosa o no, están además expuestos a hongos potencialmente causantes de infecciones severas.

Para el presente trabajo se ha elegido al Hospital Regional "General Ignacio Zaragoza" debido a que atiende a la mayor población de pacientes con VIH-SIDA del ISSSTE en el D.F.; además de que atiende a una considerable población de casos con hemopatías malignas y otros pacientes oncológicos críticos cuya inmunodepresión se ve agravada por quimioterapia colateral directamente inmunodepresora. En este centro hospitalario, López-Alvarez, Jefe del Departamento de Microbiología (datos no publicados), realizó un estudio prospectivo para conocer la incidencia de micosis en los pacientes atendidos en el laboratorio de microbiología en el período de 1995 a 1999, en el que encontró los datos que aparecen en la Tabla 5:

**Tabla 5. Hongos aislados de pacientes del Hospital Regional "General Ignacio Zaragoza", ISSSTE (1995-1999).**

| MICROORGANISMO                        | NÚMERO DE AISLAMIENTOS |
|---------------------------------------|------------------------|
| <i>Aspergillus spp</i>                | 16                     |
| <i>Histoplasma capsulatum</i>         | 13                     |
| <i>Cryptococcus neoformans</i>        | 9                      |
| <i>Penicillium spp.</i>               | 8                      |
| <i>Trichophyton rubrum</i>            | 4                      |
| <i>Rhizopus spp.</i>                  | 2                      |
| <i>Geotrichum spp.</i>                | 2                      |
| * <i>Nocardia spp.</i> (actinomycete) | 2                      |
| <i>Trichosporon sp.</i>               | 1                      |
| Total                                 | 57                     |

La principal contribución derivada del trabajo de la Q. López consiste en el conocimiento de la frecuencia aproximada con que los hongos están asociados a infecciones ó condiciones patológicas en pacientes atendidos en el Hospital Regional "General Ignacio Zaragoza" del ISSSTE. Esta información ha sido la piedra angular del presente trabajo, el cual está enfocado a determinar el grado de participación de los hongos en la patología asociada a la inmunodepresión de los pacientes atendidos en ese hospital de la ciudad de México. La información obtenida será de gran utilidad para detectar tempranamente las infecciones micóticas reales ó potenciales en esos pacientes, administrar un tratamiento oportuno y particularmente aplicar las medidas preventivas más convenientes.

## OBJETIVOS

- Aislar los hongos que se encuentran en los diferentes especímenes recibidos de pacientes inmunosuprimidos en el laboratorio de Microbiología del Hospital Regional “General Ignacio Zaragoza”, ISSSTE en el período que abarca de junio de 1999 a marzo del 2000.
- Identificar hasta género y especie cada uno de los aislamientos obtenidos en base a su morfología macro ó microscópica y con pruebas especiales.
- Relacionar la presencia de los diferentes hongos aislados con la patología que presentan los pacientes inmunodeprimidos

## HIPÓTESIS DE TRABAJO

- Del espécimen del paciente inmunodeprimido podrán aislarse diferentes hongos, de los cuales se hallaran con más frecuencia los hongos conocidos como contaminantes que son potencialmente patógenos, y en segundo lugar estarán los hongos comúnmente conocidos como oportunistas.
- Las especies de hongos aislados y su frecuencia estarán directamente relacionadas con el origen del espécimen procesado, tanto en el caso de los hongos considerados oportunistas como en el de los hongos contaminantes.
- Aplicando algunos criterios de importancia clínica, se podrá relacionar la presencia de ciertos hongos con una probable participación en la patología del paciente

# MATERIAL

## Material biológico:

Se procesaron las muestras enviadas al laboratorio de Microbiología del Hospital Regional "General Ignacio Zaragoza" de junio de 1999 a marzo del 2000, provenientes de pacientes con las siguientes características.

## **Grupo problema:**

Pacientes hospitalizados o ambulatorios infectados con VIH-SIDA, hemopatías malignas, oncológicos, diabéticos, con terapia inmunodepresora, así como neutropénicos de grado variable

## **Criterios de inclusión:**

Características del hospedero: Pacientes hospitalizados o no con VIH-SIDA, hemopatías malignas, oncológicos, diabéticos, con terapia inmunodepresora, así como neutropénicos de grado variable.

Características de la muestra: Los especímenes procesados fueron esputo, sangre, orina, médula ósea, líquido cefalorraquídeo, líquido de lavado gástrico, exudados (vaginal, ótico, oftálmico, faríngeo, heridas) y tejido de biopsia, los cuales contaban con identificación completa, diagnóstico presuntivo y origen corporal de la muestra.

## **Criterios de exclusión:**

Del hospedero: Que no cuente con ninguna de las características del grupo problema.

De las muestras: Especímenes mal etiquetados, que no cuenten con diagnóstico presuntivo, en el caso de las muestras de sangre y médula ósea que no estén

coagulados, que la cantidad sea escasa o que este en duda si pertenecen al grupo problema.

**Material de laboratorio:**

Cajas Petri (de vidrio y desechables)

Tubos de ensayo (13 X 100)

Tubos de ensayo con tapón de rosca (15 X 150)

Probetas (1000 ml, 500ml, 10ml)

Matraces Erlenmeyer (2000 ml, 1000 ml, 125 ml, 25 ml)

Frascos para antibiótico (10 ml )

Gárgolas para frascos antibióticos

Gradillas para tubos (13 X 100 y de 15 X 150)

Canastillas para esterilización

Pipetas Pasteur

Pipetas graduadas (1 ml, 5 ml, 10 ml)

Cubreobjetos

Portaobjetos

Asa bacteriológica y micológica

Tubos McFarland

Bulbo para pipeta Pasteur

Perilla de succión

Mechero Bunsen

Mechero Fisher

Filtros Millipore (Millex-HA, SLHA 025 OS)

Jeringas desechables estériles (1 ml, 10 ml, 20 ml)

Pinzas de disección

Tijeras

Papel aluminio

Papel estraza

Algodón

Gasas

Tapones metálicos para tubo de ensayo (13 X 100)

Cinta testigo

**Equipo de laboratorio:**

Campana de flujo laminar (VECO®)

Mechero eléctrico (Sigma)

Balanza analítica (SCIENTECH SA 80)

Balanza Granataria (OHAUS)

Autoclave

Microscopio (ZEISS 1,25X)

Centrífuga (SOLBAT)

Incubadora

Refrigerador (Bendix)

Engargoladora (ALDRICH® cat N° Z11424-3)

Micrómetro (ZEISS)

Micropipetas 1000, 200, 50, 10  $\mu$ L

Cloruro de potasio KCl (Monterrey)

Sulfato ferroso  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Monterrey)

Fosfato de potasio monobásico  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Mallinckrodt)

Alpiste negro ó semilla de Níger (*Guizotia abyssinica*)

Tween 80 (Sigma)

Azúcares:

Glucosa anhidra (MONTERREY)

Sacarosa (J.T. BAKER)

Maltosa monohidratada (Merck)

D-Manitol (Baltimore Biological Laboratory)

D(+)-Xilosa (Merck)

Rafinosa pentahidratada (Merck)

Dulcitol (DIFCO)

Adonitol, ribitol (Merck)

D-Trehalosa dihidratada (Aldrich)

L(+)-Ramnosa monohidratada (Merck)

myo-Inositol (Merck)

Lactosa monohidratada (Merck)

D-Celobiosa (Aldrich)

Eritritol

$\alpha$ -D-Melobiosa hidratada (Aldrich)

D(+)-Galactosa (Merck)

## METODOLOGÍA

Una vez seleccionada la muestra de acuerdo a los criterios de inclusión, se llevó a cabo el siguiente procedimiento para llegar a la identificación de género y especie de cada uno de los aislamientos.

1. Las muestras fueron procesadas dependiendo del tipo de espécimen. El tejido de biopsia fue macerado en un mortero con solución salina estéril para seccionar el tejido lo mejor posible; también se realizó una impronta presionando entre 2 portaobjetos un pequeño fragmento del tejido. Las muestras de médula ósea, sangre, líquido cefalorraquídeo (LCR) y orina fueron centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos; en el caso de la orina y el LCR se utilizó el sedimento para el resto del procedimiento, y de la médula ósea y sangre se utilizó la capa de leucocitos. Las muestras de esputo se trataron con NaOH al 10 % para eliminar la consistencia filante de dicho espécimen, pero este procedimiento solo se aplicó a una pequeña parte de la muestra ya que el NaOH puede afectar el desarrollo de los hongos que pudieran encontrarse en el espécimen.
2. De cada muestra se realizó un examen directo con tinta china y otro con KOH al 15%, así como un frotis con tinción de Gram para la búsqueda de estructuras micóticas, tomando en cuenta la cantidad en la que se encontraban de manera semicuantitativa (abundantes, moderadas, escasas).
3. La misma muestra, ya fuera LCR, sangre, médula ósea, esputo, orina, etc fue cultivada en agar dextrosa Sabouraud con y sin antibióticos (SA y SS

- Crecimiento en SA por 48 hrs. entre 25 y 30°C
  - Crecimiento a 37°C en SS
  - Formación de tubo germinativo en suero incubando la levadura a 37°C por 3 hrs.
  - Formación de clamidoconidios en agar harina de maíz-tween 80 (AHM) incubando por 72 hrs. a 30°C.
2. Si el aislamiento resultaba positivo a todas las pruebas anteriores fue identificado como *Candida albicans*. Estas cepas fueron cultivadas en agar Níger (AN) por 72 hrs. a 30°C; si la cepa desarrollaba clamidoconidios en este medio fue considerada como *Candida dubliniensis*, y si no, quedaba clasificada como *Candida albicans*.
  3. Si el aislamiento resultaba negativo a una ó más de las pruebas iniciales se identificaba por medio de auxanograma y zimograma (otras especies de *Candida* ú otros géneros).
  4. En el caso de que el aislamiento presentara capsula en el examen directo con tinta china, se cultivó en los medios de urea hasta 72 hrs. a 37°C, y agar Níger simplificado (ANS) por 72 hrs. a 30°C. Si la cepa era positiva a estas pruebas se consideraba como *Cryptococcus neoformans* y se inoculó en el medio de glicina-canavanina-azul de bromotimol por 48 hrs. a 30°C para la determinación de variedad; cuando el aislamiento se desarrollaba en dicho medio y había cambio de color en el mismo, la cepa correspondía a *Cryptococcus neoformans* var. *gatti*, de lo contrario se consideró como variedad *neoformans*.

5. Si la cepa resultaba negativa al medio de ANS y positiva a urea se inoculaba en el auxanograma para la determinación de otras especies de *Cryptococcus* ó *Rhodotorula*.
6. Las cepas que por morfología macro y microscópica orientaban a otro género, como *Trichosporon*, fueron sometidas a un auxanograma y/o zimograma para la determinación de la especie.

## **IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS**

En el caso de los hongos filamentosos, a través del examen directo con cinta adhesiva y contrastado con azul de algodón se logró determinar el género fúngico. Una vez conocido el género se procedió a cultivar cada hongo en los medios y condiciones apropiadas para su identificación hasta especie utilizando como apoyo bibliográfico el manual de John I. Pitt (1979) para el género *Penicillium* (24), el manual de Kenneth B. Y Raper D. (1977) para el género *Aspergillus* (25) y para el resto de los géneros el manual de Samson R. et. al. (1984) (26)

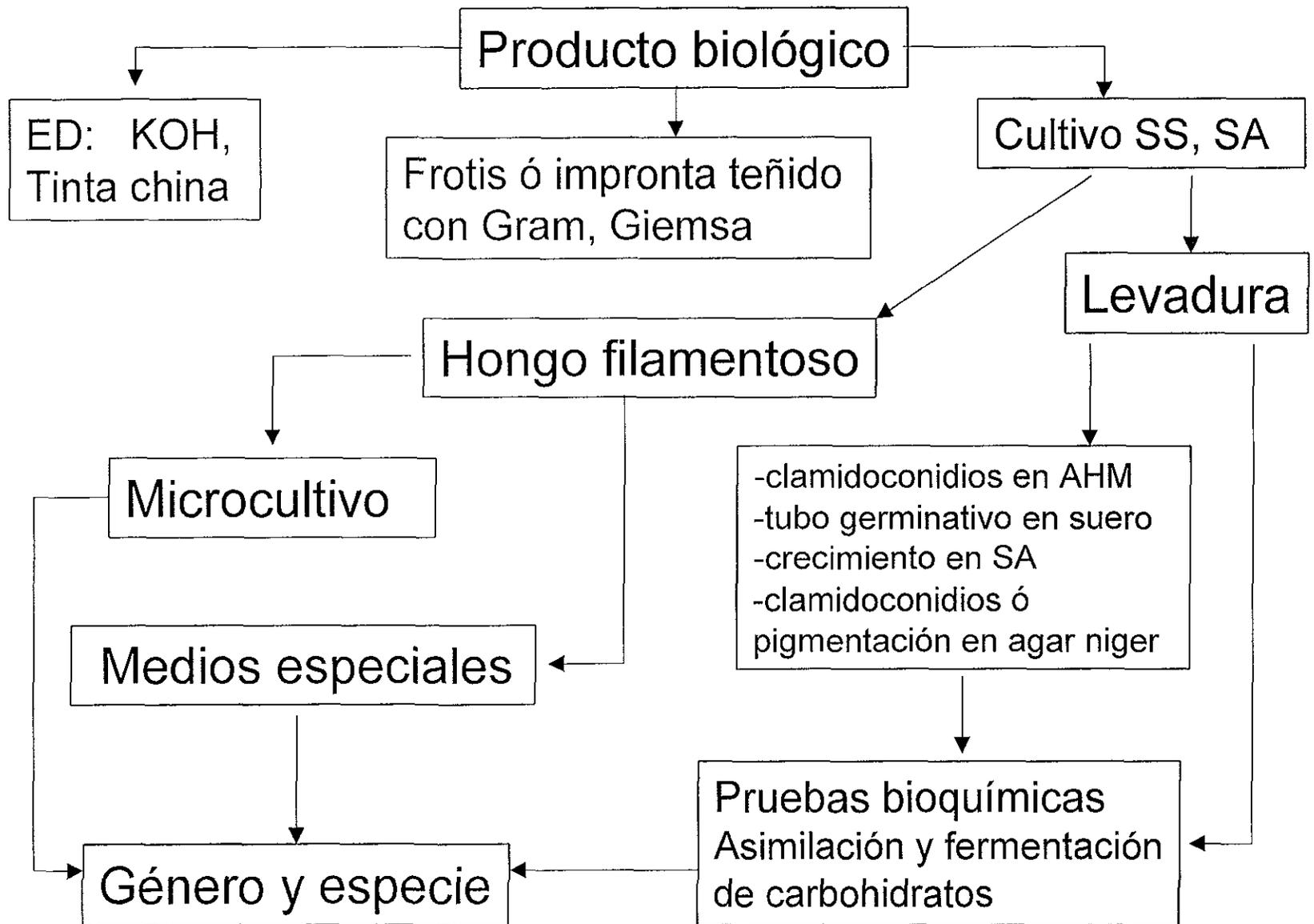
### **GÉNERO *PENICILLIUM***

1. De cada colonia fúngica se hizo una resiembra en el medio de agar extracto de malta (AEM) incubando de 5 a 7 días a 20-25 °C.
2. Con el cultivo anterior se preparó una suspensión de conidios en agar extracto de malta al 2% (medio semisólido de inoculación) quedando una

concentración aproximada de  $1 \times 10^2$  células/ml. Con esta suspensión fueron inoculados los medios especiales como se indica en el Apéndice E.

3. Los medios empleados y las condiciones fueron: Agar Extracto de Malta (AEM) y Agar Nitrato Glicerol al 25% (NG25) incubándolos a 20-25°C, y Agar Czapeck extracto de levadura (CEL) incubando a tres temperaturas 5°C, 20-25°C, y a 37°C; el periodo de incubación fue de 7 días.
4. Al mismo tiempo se realizó un microcultivo en CEL y AEM (incubado por 7 días a 20-25°C) para obtener una preparación adecuada para la descripción microscópica. Debido a que ocasionalmente en el microcultivo no se obtiene una imagen clara de las estructuras micóticas, en algunos casos, la descripción se realizó por medio de un examen directo con ó sin cinta adhesiva, uno con agua para la descripción de color y otro con azul de algodón para la medición de estructuras a partir del medio de CEL.
5. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se procedió a la descripción de la morfología colonial y junto con la microscópica se recopiló la información necesaria solicitada en el cuestionario establecido en el Apéndice F.
6. Finalmente con todos estos datos se identificó al hongo con el apoyo de la bibliografía correspondiente (24).

# METODOLOGÍA



## RESULTADOS

De acuerdo al procedimiento planteado en la metodología para el presente estudio, se incluyeron las muestras provenientes de un total de 103 pacientes de los cuales 38 fueron mujeres y 65 hombres, con una edad que osciló entre los 21 y los 80 años con un promedio de 50 años. Estos pacientes fueron agrupados según el diagnóstico establecido por el médico tratante (Tabla 7).

**Tabla 7. Diagnóstico y edad de los pacientes incluidos en el presente estudio.**

| Subgrupos de edad | Pb Tb | Hp | NI | DM | SxFx | TP | T | SIDA | Ca | Total |
|-------------------|-------|----|----|----|------|----|---|------|----|-------|
| < 20 años         | 3     |    | 2  |    |      |    | 1 |      |    | 6     |
| 21-40 años        | 12    | 1  | 1  | 1  |      | 2  |   | 10   |    | 27    |
| 41-60 años        | 23    |    | 1  | 1  | 3    |    | 1 | 10   |    | 39    |
| 61-80 años        | 20    |    |    | 5  |      |    |   | 1    | 2  | 28    |
| >80 años          | 3     |    |    |    |      |    |   |      |    | 3     |
| <b>Total</b>      | 61    | 1  | 4  | 7  | 3    | 2  | 2 | 21   | 2  | 103   |

**Pb Tb:** Probable tuberculosis; **Hp:** Hematopatías; **NI:** Neuroinfección; **DM:** Diabetes Mellitus; **SxFx:** Síndrome febril; **TP:** Trasplante; **T:** Traumatismo; **SIDA:** Síndrome de inmunodeficiencia adquirida. **Ca** Cáncer

Considerando el diagnóstico clínico se formaron 9 grupos de pacientes; la mayoría de la población incluida tenía diagnóstico de probable tuberculosis seguida del grupo con diagnóstico de SIDA (Tabla 8).

**Tabla 8. Pacientes clasificados de acuerdo al factor predisponente de Inmunodepresión (4).**

| <b>ENFERMEDADES Ó CONDICIONES INMUNODEPRESORAS</b> | <b>No. de pacientes</b> |
|--|-------------------------|
| Probable tuberculosis                              | 61                      |
| SIDA   | 21                      |
| Diabetes Mellitus                                  | 7                       |
| Neuroinfección                                     | 4                       |
| Síndrome febril                                    | 3                       |
| Transplantados                                     | 2                       |
| Traumatismo  | 2                       |
| Cáncer pulmonar                                    | 2                       |
| Hemopatías   | 1                       |
| <b>TOTAL</b>                                       | <b>103</b>              |

De estos pacientes se procesaron 282 muestras, las cuales correspondieron a diversos productos biológicos. En la Tabla 9 se observa que el 75.18% fueron muestras de esputo; por lo tanto los aislamientos logrados también fueron en su gran mayoría de este origen.

**Tabla 9. Productos biológicos procesados.**

| <b>Producto biológico</b> | <b>Con aislamiento micótico</b> | <b>%</b>     | <b>Sin aislamiento micótico</b> | <b>%</b>     | <b>Total</b> |
|---------------------------|---------------------------------|--------------|---------------------------------|--------------|--------------|
| Esputo                    | 167                             | 59.22        | 45                              | 15.96        | 212          |
| Aspirado gástrico         | 5                               | 1.77         | 0                               | -            | 5            |
| Orina                     | 4                               | 1.42         | 12                              | 4.26         | 16           |
| Médula ósea               | 2                               | 0.71         | 8                               | 2.84         | 10           |
| Sangre                    | 1                               | 0.35         | 13                              | 4.61         | 14           |
| LCR                       | 1                               | 0.35         | 2                               | 0.71         | 3            |
| Catéter                   | 0                               | -            | 3                               | 1.06         | 3            |
| Ganglio                   | 0                               | -            | 1                               | 0.35         | 1            |
| Líquido de ascitis        | 0                               | -            | 1                               | 0.35         | 1            |
| Exudado vaginal           | 0                               | -            | 1                               | 0.35         | 1            |
| Líquido pleural           | 0                               | -            | 5                               | 1.77         | 5            |
| Sec. de Hx. Qx            | 0                               | -            | 1                               | 0.35         | 1            |
| Sec. de cánula Ot.        | 0                               | -            | 3                               | 1.06         | 3            |
| Exudado de úlcera         | 0                               | -            | 1                               | 0.35         | 1            |
| Heces                     | 0                               | -            | 6                               | 2.13         | 6            |
| <b>TOTAL</b>              | <b>180</b>                      | <b>63.82</b> | <b>102</b>                      | <b>36.17</b> | <b>282</b>   |

LCR: Líquido cefalorraquídeo; Sec: secreción; Hx QX: Herida quirúrgica; Ot: Orotraqueal

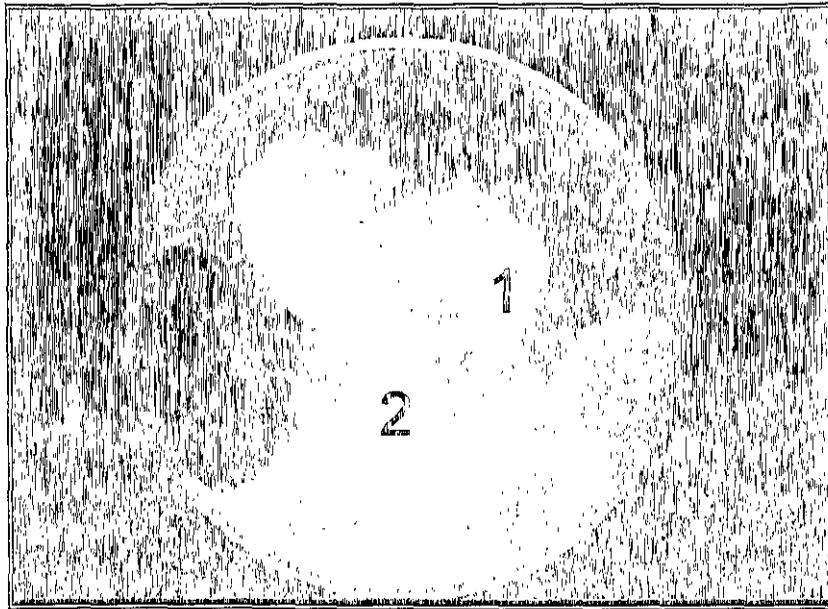


A

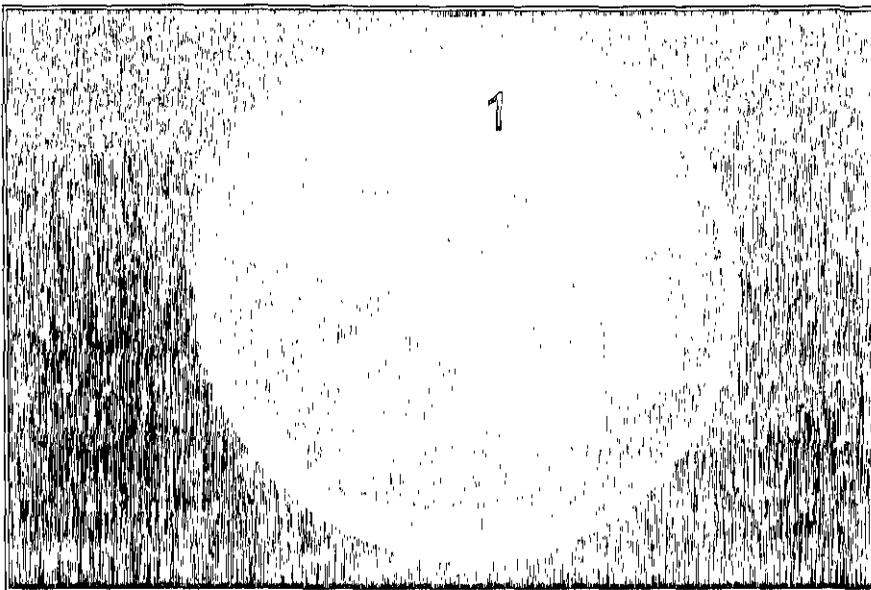


B

Figura 1. Examen microscópico de muestras de esputo teñidas con Gram (100x).  
A) Seudohifas con blastoconidios; B) Levaduras gemantes e hifas



A



B

Figura 2.

- A) Primocultivos de muestras de esputo en SS donde se puede observar el desarrollo de hongos filamentosos (1) y levaduriformes (2).
- B) Primocultivos de esputo en medio SS en donde se aprecian predominantemente colonias levaduriformes.

para buscar la presencia ó ausencia de cápsula (Figura 3A). El examen microscópico de frotis con alguna tinción especial tuvo por objetivo la visualización de parásitos particulares como *Histoplasma capsulatum* (Figura 3B).

## LEVADURAS IDENTIFICADAS

De las 282 muestras procesadas se lograron 166 aislamientos levaduriformes, los cuales fueron identificados como integrantes de cuatro géneros (Tabla 11).

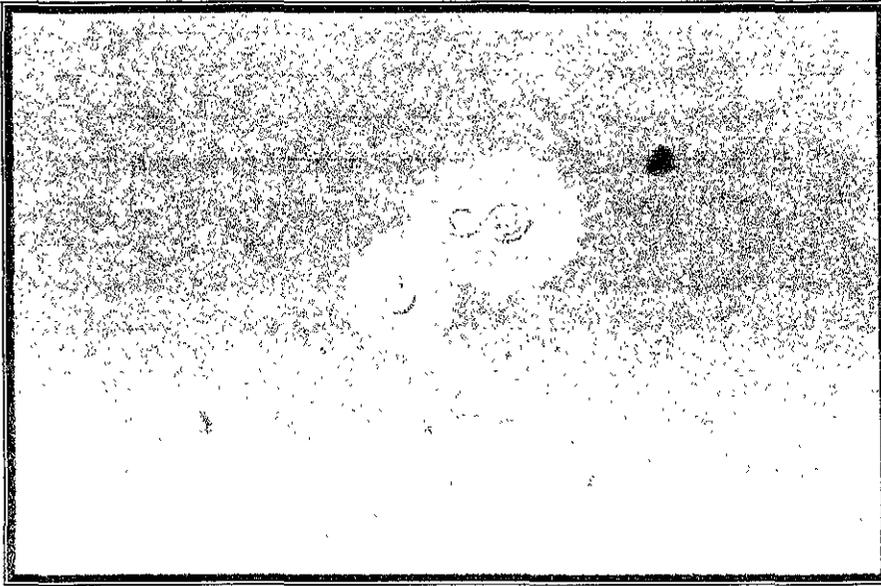
**Tabla 11. Géneros identificados de los aislamientos levaduriformes.**

| Especie                    | Número de Aislamientos | Porcentaje |
|----------------------------|------------------------|------------|
| <i>Candida</i> spp.        | 148                    | 89.16      |
| <i>Cryptococcus</i> spp    | 15                     | 9.04       |
| <i>Trichosporon</i> spp    | 2                      | 1.2        |
| <i>Torulopsis glabrata</i> | 1                      | 0.6        |
| Total                      | 166                    | 100.0      |

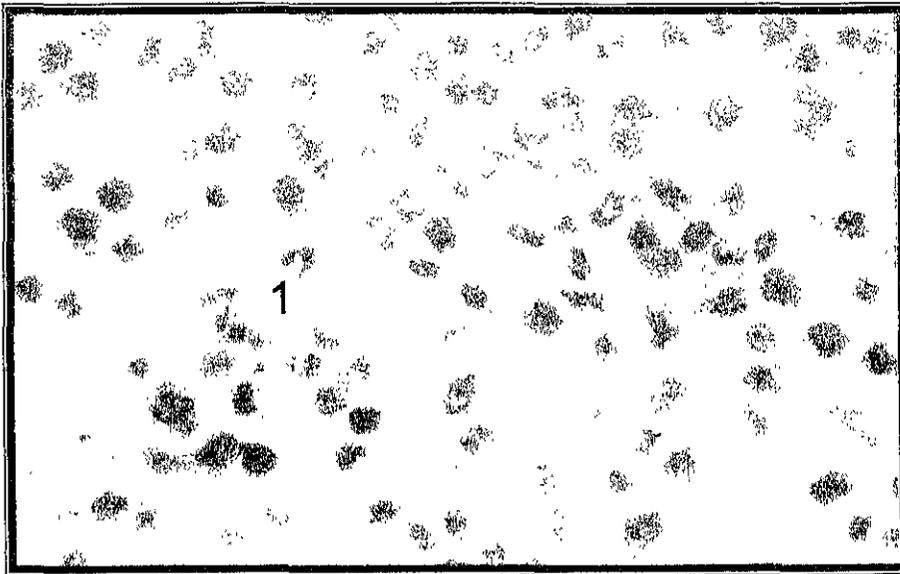
De estos aislamientos, el género *Candida* fué el más frecuente; la identificación de especies se logró inicialmente mediante las pruebas mostradas en la Figura 4 para *Candida albicans*; para las especies no *albicans* la identificación se logró por medio del zimograma y auxanograma. En base a este procedimiento se identificaron las especies que se enlistan en la Tabla 12.

**Tabla 12. Especies identificadas de *Candida*; frecuencia y porcentaje en 148 aislamientos.**

| Especie                 | Aislamientos | %     | Especie                  | Aislamientos | %    |
|-------------------------|--------------|-------|--------------------------|--------------|------|
| <i>C. albicans</i>      | 92           | 62.2  | <i>C. beechii</i>        | 1            | 0.67 |
| <i>C. dubliniensis</i>  | 16           | 10.81 | <i>C. catenulata</i>     | 1            | 0.67 |
| <i>C. parapsilopsis</i> | 8            | 5.40  | <i>C. kefyr</i>          | 1            | 0.67 |
| <i>C. tropicalis</i>    | 6            | 4.05  | <i>C. glabrosa</i>       | 1            | 0.67 |
| <i>C. capsuligena</i>   | 6            | 4.05  | <i>C. salmonicola</i>    | 1            | 0.67 |
| <i>C. zeylanoides</i>   | 3            | 2.02  | <i>C. lipolytica</i>     | 1            | 0.67 |
| <i>C. krusei</i>        | 3            | 2.02  | <i>C. sake</i>           | 1            | 0.67 |
| <i>C. sheatae</i>       | 3            | 2.02  | <i>C. intermedia</i>     | 1            | 0.67 |
| <i>C. rugosa</i>        | 2            | 1.40  | <i>C. guilliermondii</i> | 1            | 0.67 |
|                         |              |       | Total                    | 148          | 100  |



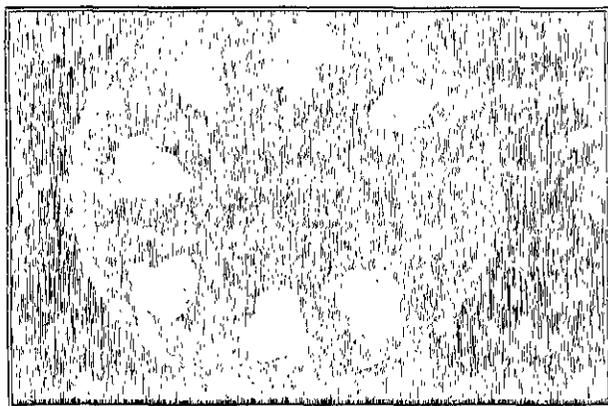
A



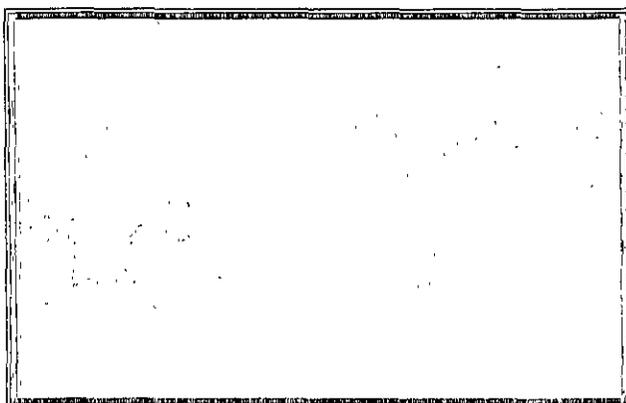
B

Figura 3:

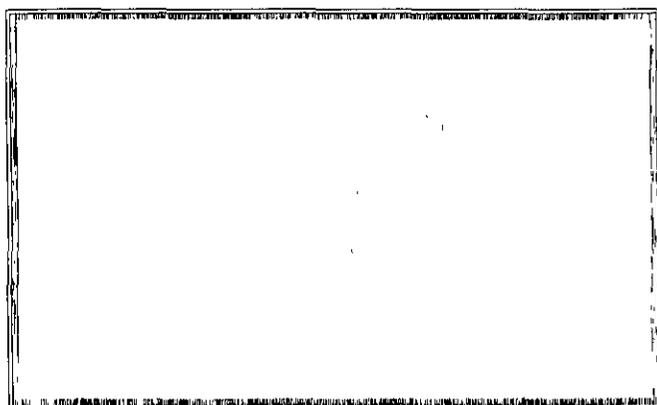
- A) Examen directo con tinta china de líquido cefalorraquídeo mostrando una levadura de *Cryptococcus neoformans* con una gruesa cápsula (100x)
- B) Frotis de médula ósea teñido con Wright-Giemsa donde se observan grupos de pequeñas levaduras de *Histoplasma capsulatum* dentro de un macrófago (1) (40x).



A



B



C

Figura 4. Pruebas de identificación de *Candida albicans*. A) Crecimiento a 37° C en S.A. B) formación de clamidoconidios en AHM a 30° C; examen microscópico contrastado con azul de algodón (4.0x). C) Formación de tubos germinativos en suero a 37° C después de 3 hrs. de incubación (100x).

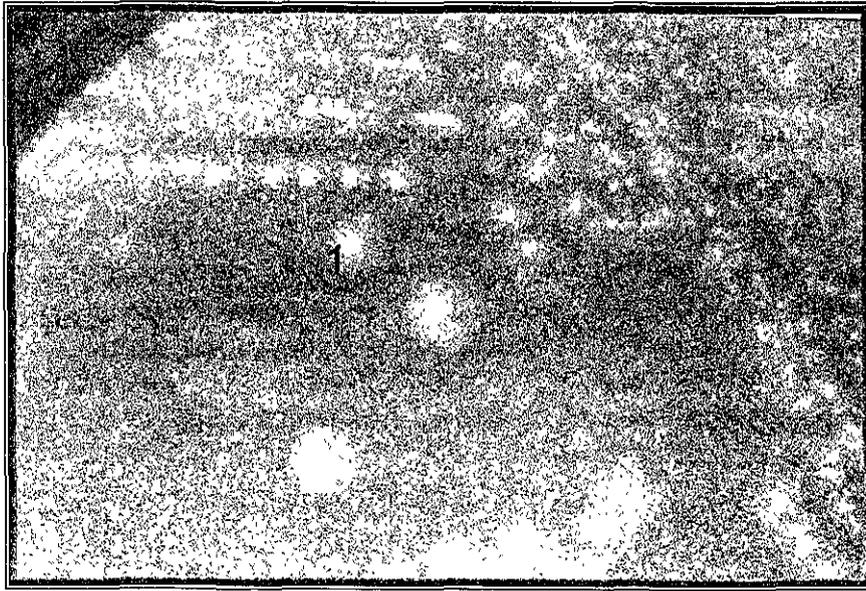
Los aislamientos correspondientes a *C. dubliniensis* se identificaron por medio del cultivo de las cepas clasificadas previamente como *C. albicans* en Agar Níger, quedando como *C. dubliniensis* si en este medio generaban clamidoconidios en racimos (Figura 5). Con este estudio se obtuvieron 16 aislamientos que fueron clasificados como *C. dubliniensis* (Tabla 13), y algunos datos adicionales son que:

- 14 aislamientos provenían de pacientes con diagnóstico de probable tuberculosis, de los cuales nueve fueron de mujeres y cinco de hombres.
- Uno de los aislamientos faltantes se obtuvo de un paciente masculino con síndrome febril en estudio y el otro de la única paciente con SIDA.
- El total de pacientes de quienes se obtuvieron estos aislamientos fueron 10, por lo tanto en varios de ellos se obtuvo el mismo aislamiento más de una vez.

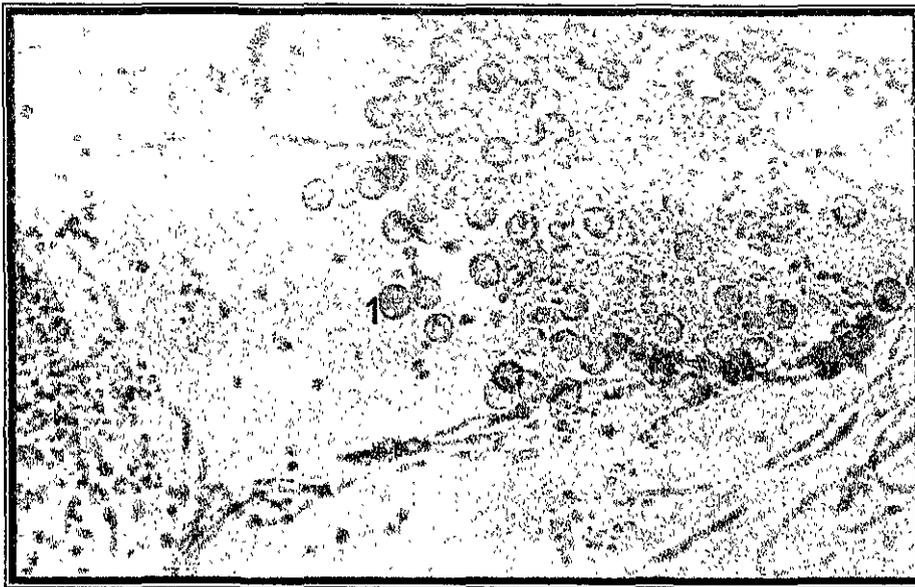
**Tabla 13. Origen de los aislamientos de *Candida dubliniensis*.**

| Pacientes | Pb Tb | SIDA | SxFx |
|-----------|-------|------|------|
| A         | 3     | 1    | 1    |
| B         | 3     | -    | -    |
| C         | 2     | -    | -    |
| D         | 2     | -    | -    |
| E         | 1     | -    | -    |
| F         | 1     | -    | -    |
| G         | 1     | -    | -    |
| H         | 1     | -    | -    |
| Total     | 14    | 1    | 1    |

**Pb Tb:** Diagnóstico de probable tuberculosis; **SxFx:** Síndrome febril; **SIDA:** Síndrome de inmunodeficiencia adquirida



A



B

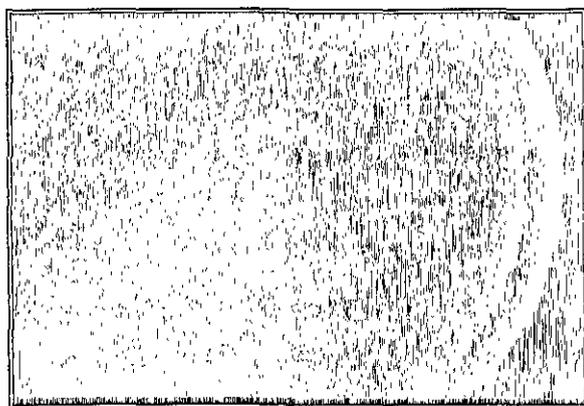
Figura 5.

- A) Morfología colonial de *Candida dubliniensis* cultivada en AN. Obsérvese la forma de estrella descrita en esta especie (1) (Staib P., 1999).
- B) Clamidoconidios generados por *C. dubliniensis* en AN; se encuentran dispuestos en racimos abundantes y presentan la característica de ser dobles (1).

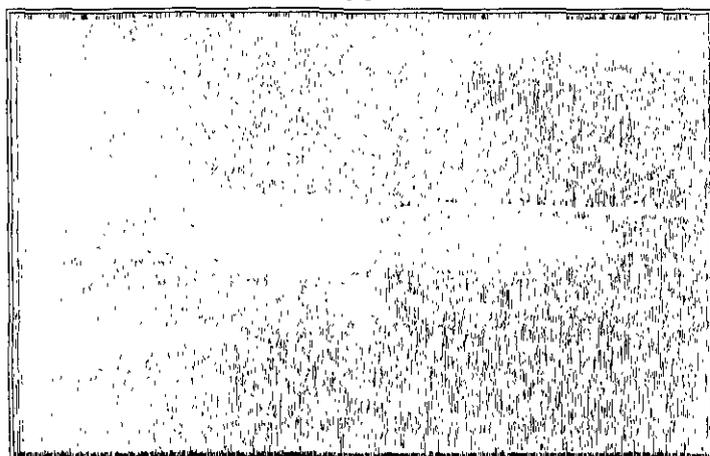
En cuanto a frecuencia, después de *Candida* el género más aislado fue *Cryptococcus*. La identificación de las especies se logró por medio del examen directo con tinta china, por el cultivo en medios especiales (Figura 6) y por el auxanograma. De este género se aislaron dos especies: *Cryptococcus albidus* con 12 aislamientos, 11 provenientes de pacientes con diagnóstico de probable tuberculosis y uno de un paciente con Diabetes Mellitus; y *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* con tres aislamientos, todos de pacientes con SIDA.

Del género *Trichosporon* se obtuvieron dos aislamientos, uno correspondiente a la especie *beigelli* y el otro a la especie *inkin*; la identificación de estas levaduras fue determinada principalmente por la morfología colonial (Figura 7A) y microscópica del hongo (figura 7B). La colonia de esta levadura suele ser cerebriforme y presenta dos tipos de conidios: artroconidios y blastoconidios. Estas características permiten diferenciar a éstas de las levaduras del género *Candida* y del hongo filamentoso *Geotrichum* (3). La determinación de especie se logró por medio del auxanograma.

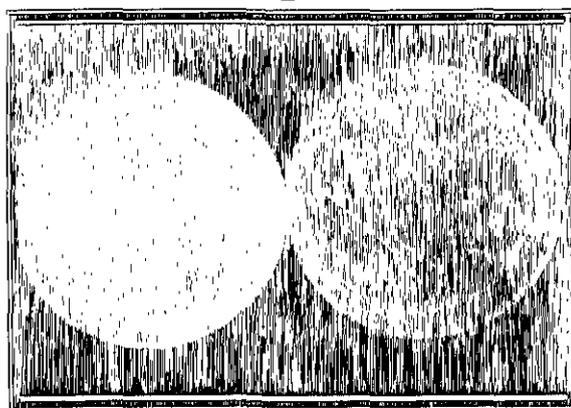
Finalmente del género *Torulopsis* sólo se obtuvo un aislamiento y su identificación fue determinada también por auxanograma.



A



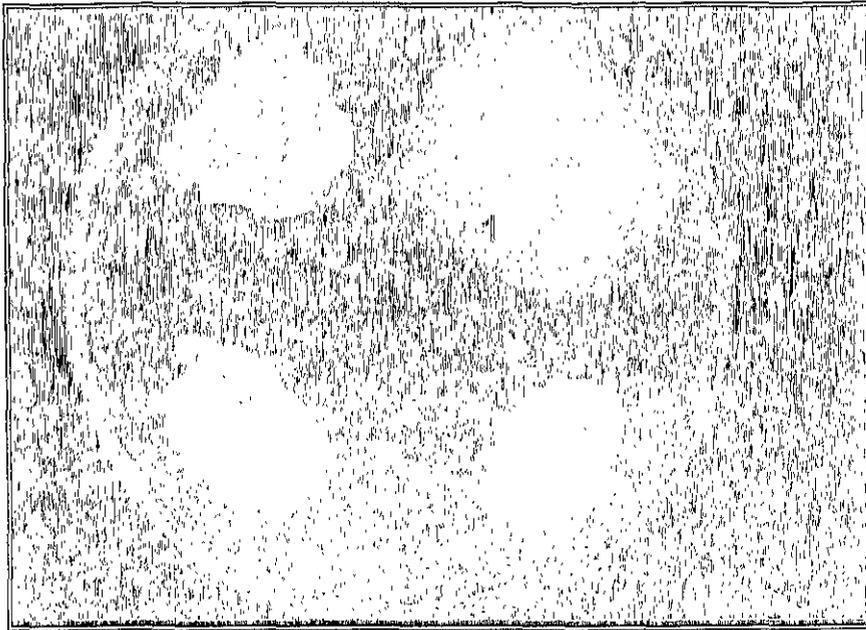
B



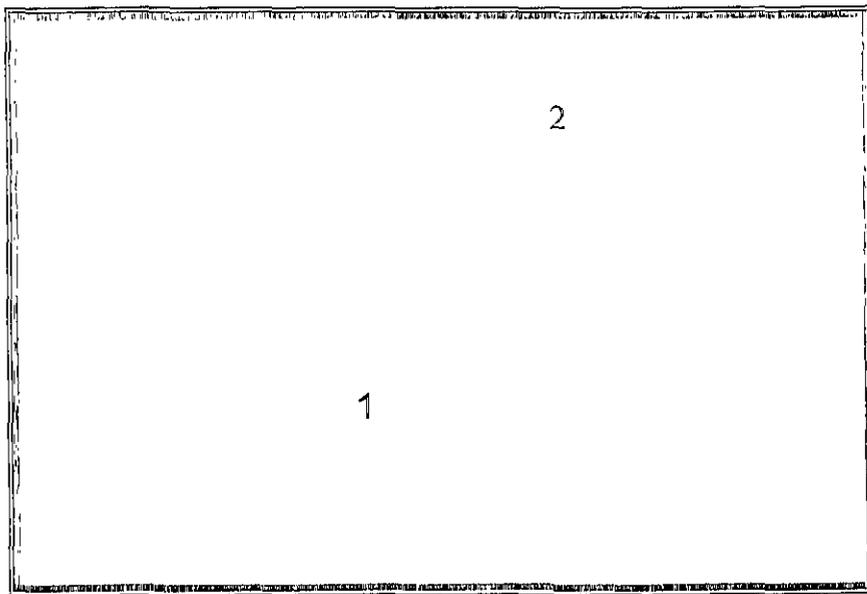
C

Figura 6: Medios de cultivo utilizados para la identificación de especies de *Cryptococcus*.

- A) Agar Níger: colonias pigmentadas por la formación de melanina a partir de los compuestos fenolados del medio.
- B) Medio de urea de Christensen: *Cryptococcus* spp produce ureasas modificando el pH y variando el color del medio a rojo. Derecha, *Cryptococcus*, izquierda, *C. albicans*.
- C) Medio de glicina-canavanina-azul de bromotimol utilizada para la determinación de las variedades de *Cr. neoformans*. La variedad *gattii* cambia el color del medio de amarillo a azul



A



B

Figura 7:

- A) Aspecto macroscópico de una colonia de *Trichosporon* sp. (1) comparada con otras colonias pertenecientes al género *Candida*; cultivo en SS.
- B) Morfología microscópica de *Trichosporon* sp. presentando arthroconidios (1) y blastoconidios (2); examen directo contrastado con azul de algodón (100x).

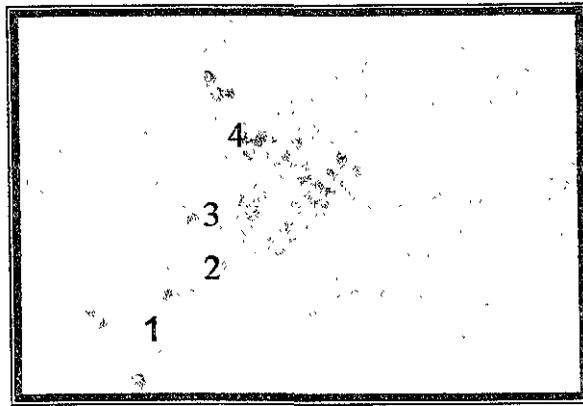
## HONGOS FILAMENTOSOS IDENTIFICADOS

Por medio del examen directo con cinta adhesiva contrastado con azul de algodón se logró identificar el género de 69 aislamientos filamentosos, los cuales quedaron agrupados en ocho (Tabla 14). Se realizó un microcultivo en el medio indicado en la metodología de acuerdo al género en estudio obteniendo una imagen microscópica nítida y definida, logrando además de este modo la medición de las estructuras de fructificación fúngicas (Figura 8). Al mismo tiempo cada hongo fue cultivado en los medios y en las condiciones indicadas para que cada especie desarrollara las características coloniales que las distinguen de las demás (Figura 9). Con estos procedimientos se determinaron las especies de cada género anotadas en la Tabla 14. El género *Geotrichum* se identificó por auxanograma

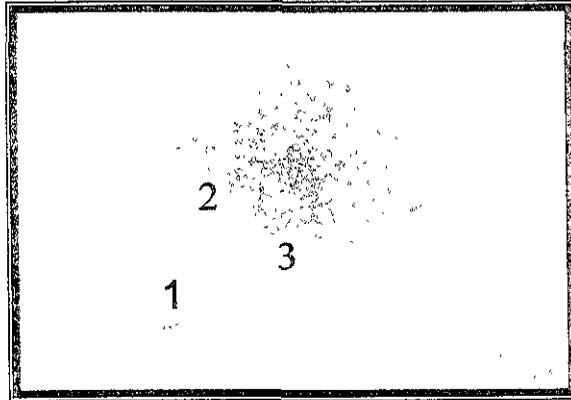
**Tabla 12. Géneros y número de especies de hongos filamentosos identificados de 69 aislamientos.**

| Género                  | Aislamientos | Especies |
|-------------------------|--------------|----------|
| <i>Penicillium</i> spp. | 32           | 8        |
| <i>Aspergillus</i> spp. | 16           | 6        |
| <i>Geotrichum</i> sp    | 14           | 1        |
| <i>Acremonium</i> spp   | 2            | 2        |
| <i>Cladosporium</i> sp  | 2            | 1        |
| <i>Mucor</i> sp.        | 1            | 1        |
| <i>Trichoderma</i> sp   | 1            | 1        |
| <i>Alternaria</i> sp.   | 1            | 1        |
| Total                   | 69           | 21       |

Una vez obtenida la descripción tanto macroscópica como microscópica de cada uno de los cultivos, se procedió a la identificación específica la cual solo fue posible en seis *Penicillium* y un *Aspergillus*. En cuanto a la frecuencia se encontró que el hongo filamentoso más aislado fue *Geotrichum candidum* (20.29%),



A



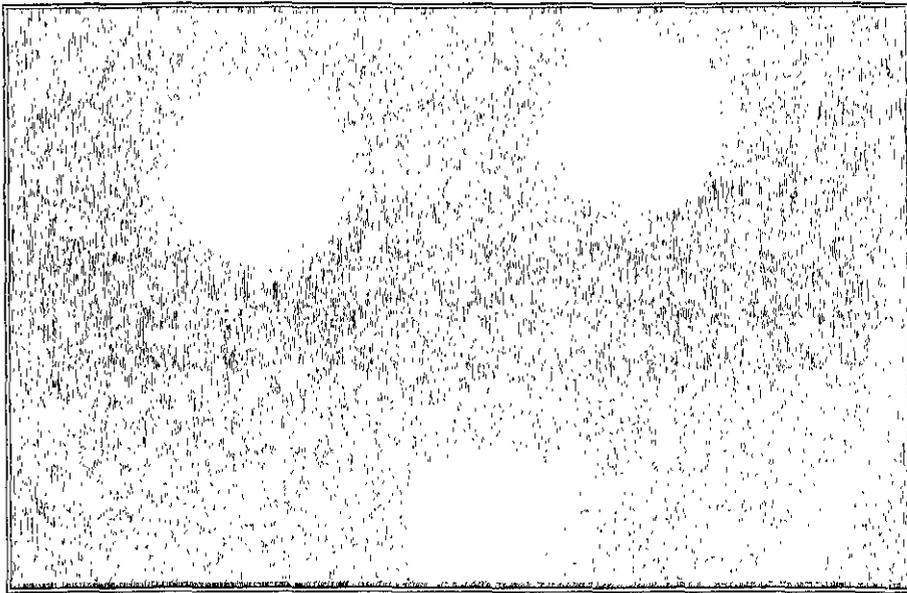
B



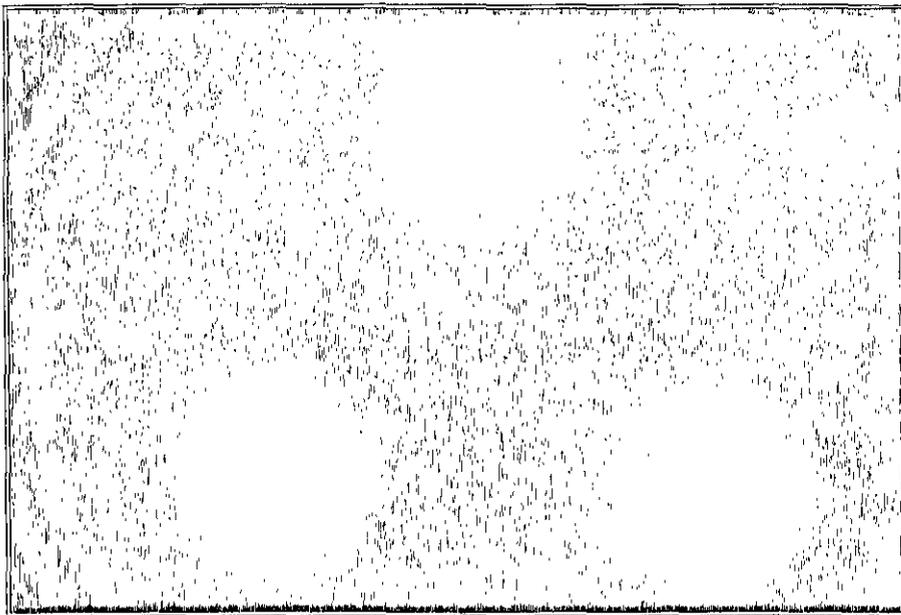
C

Figura 8: Examen directo de los microcultivos realizados en AEM, teñidos con azul de algodón.

- A) *Penicillium griseoroseum*. Se observa un conidióforo corto (1) que sostiene a un par de métulas proximales (2) con fiáldes ampuliformes (3), de las que se originan conidios esferoidales (4) (100x).
- B) *Aspergillus* sp. Presenta un conidióforo corto (1) que termina en vesícula (2) la cual sostiene a dos series de fiáldes (3) y conidios esferoidales (100x).
- C) *Geotrichum candidum*, formando largas cadenas de artroconidios, algunos ligeramente redondeados (100x).



A



B

Figura 9: *Penicillium roseopurpureum* cultivado en:

- A) CEL, 25°C, 7 días: colonias de 23-25 mm de diámetro con micelio denso y vellosos de color grisáceo ó ante, conidiogénesis limitada al centro de la colonia de color anaranjado grisáceo.
- B) AEM, 25°C, 7 días: colonias de 11-14mm de diámetro con micelio blanco, denso y vellosos; la conidiogénesis es gris claro.

seguido del hongo *Penicillium pseudostromaticum* (13.04%). El resto de las especies identificadas se encuentran en la Tabla 15.

**Tabla 15. Especies identificadas en tres géneros de hongos filamentosos.**

| Género y especie                               | Número de aislamientos | %     |
|--|------------------------|-------|
| <i>Penicillium pseudostromaticum</i>           | 9                      | 13.04 |
| <i>Penicillium roseopurpureum</i>              | 7                      | 10.14 |
| <i>Penicillium madriti</i>                     | 5                      | 7.24  |
| <i>Penicillium donkii</i>                      | 3                      | 4.34  |
| <i>Penicillium melinii</i>                     | 2                      | 2.89  |
| <i>Penicillium griseoroseum</i>                | 1                      | 1.44  |
| <i>Penicillium</i> spp. (2 especies)           | 5                      | 7.24  |
| <i>Aspergillus foetidus</i> var. <i>acidus</i> | 6                      | 8.69  |
| <i>Aspergillus</i> spp. (5 especies)           | 10                     | 14.49 |
| <i>Geotrichum candidum</i>                     | 14                     | 20.29 |
| Total  | 62                     | 89.80 |

#### AISLAMIENTOS DE IMPORTANCIA CLINICA

Los aislamientos obtenidos, excluyendo los de *Cr. neoformans*, correspondieron a hongos ubicuos o colonizantes del ser humano y que se aíslan frecuentemente de las muestras como contaminantes. Por lo tanto, para determinar la posible intervención de estos microorganismos en la patología de los pacientes, se aplicaron algunos criterios propuestos por otros autores (3,6, 42) quienes establecen que un aislamiento micótico correspondiente a una especie no patógena pueden tener importancia clínica cuando:

- el examen microscópico del producto biológico muestra estructuras micóticas abundantes, así como la presencia de hifas y/o pseudohifas,
- el número de colonias desarrolladas en el medio de cultivo es abundante;
- se aísla la misma especie en diferentes muestras de un mismo paciente.

Aplicando estos parámetros, se determinó que 17 de los 46 aislamientos obtenidos de pacientes con SIDA (17/46) tenían una probable participación en las manifestaciones clínicas del paciente. En el caso de los 90 pacientes con diagnóstico de probable tuberculosis en 27 existía una relación entre el agente aislado y la patología del paciente. En la Tabla 16 se muestran los aislamientos a los cuales se les atribuyó importancia clínica en el desarrollo de la patología infecciosa de los pacientes.

**Tabla 16. Aislamientos con probable importancia clínica.**

| <b>Factor de oportunismo</b>               | <b>Especies</b>             |    |                        |   |
|--|-----------------------------|----|------------------------|---|
| SIDA<br>(46 aislamientos)                  | <i>Candida albicans</i>     | 5  | <i>C. capsuligena</i>  | 2 |
|  | <i>C. parapsilosis</i>      | 3  | <i>C. catenulata</i>   | 1 |
|  | <i>C. sheatae</i>           | 3  | <i>C. beechii</i>      | 1 |
|  | <i>C. krusei</i>            | 2  |                        |   |
|  | <b>Total 17</b>             |    |                        |   |
| Probable tuberculosis<br>(90 aislamientos) | <i>C. albicans</i>          | 12 | <i>C. zeylanoides</i>  | 1 |
|  | <i>C. dubliniensis</i>      | 2  | <i>C. capsuligena</i>  | 1 |
|  | <i>Geotrichum candidum</i>  | 5  | <i>C. parapsilosis</i> | 1 |
|  | <i>C. tropicalis</i>        | 1  | <i>C. intermedia</i>   | 1 |
|  | <i>C. lipolytica</i>        | 1  |                        |   |
|  | <i>Cryptococcus albidus</i> | 1  |                        |   |
|  | <i>Torulopsis glabrata</i>  | 1  |                        |   |
| <b>Total 27</b>                            |                             |    |                        |   |
| Transplante<br>(3 aislamientos)            | <i>Candida albicans</i>     | 1  |                        |   |
| Hematopatías<br>(9 aislamientos)           | <i>Candida albicans</i>     | 6  |                        |   |
| Síndrome febril<br>(7 aislamientos)        | <i>Candida albicans</i>     | 4  |                        |   |
| Diabetes Mellitus<br>(24 aislamientos)     | <i>Geotrichum candidum</i>  | 9  |                        |   |

## DISCUSIÓN

De acuerdo a los datos reportados en el presente trabajo, se encontró que la mayoría de las muestras de la población incluida corresponde a hombres representando el 63% del total. En cuanto a la edad se observó mucha heterogeneidad, sin embargo este estudio abarcó en su gran mayoría a adultos de 20 a 80 años de edad; este comportamiento se debe a que durante el período de estudio la población de edad menor que ingresó al hospital no cumplía con los criterios de inclusión establecidos para el presente trabajo.

Con respecto al padecimiento de fondo más frecuentemente hallado en los pacientes, se encuentra el diagnóstico de probable tuberculosis (59.22 %); estos pacientes presentaban un cuadro clínico de compromiso pulmonar persistente aún después del tratamiento con antibióticos de amplio espectro. Por lo tanto la muestra obtenida con mayor frecuencia que corresponde a estos pacientes es esputo; así muchos de los aislamientos obtenidos son de este origen.

Durante el desarrollo del presente trabajo, se logró aislar e identificar hongos de las muestras de pacientes inmunodeprimidos. Los microorganismos micóticos más frecuentemente aislados fueron las levaduras del género *Candida* en todos los grupos de pacientes inmunodeprimidos. En la literatura han sido descritas diversas especies del género *Candida* que forman parte de la biota normal gastrointestinal y vaginal en el ser humano; por lo tanto cuando se aíslan de los diferentes productos biológicos particularmente el esputo, se complica la asignación de un papel patógeno en el cuadro clínico presente (8, 5, 20, 21).

La habilidad de estas levaduras para causar infecciones en el ser humano está más relacionada con el estado inmunológico del huésped que con los factores de virulencia atribuidos al hongo. Por lo tanto los aislamientos recuperados de los pacientes inmunodeprimidos deben evaluarse a fondo antes de considerarlos una contaminación proveniente del tracto gastrointestinal del paciente (6). Para este propósito fue necesario contar con la mayor información posible tanto del paciente como de la muestra proporcionada; un examen directo y una tinción apropiada para la búsqueda de elementos micóticos fueron de vital importancia. En la literatura se ha planteado que la presencia de blastoconidios, pseudohifas e hifas son representantes de una posible invasión más que de una simple colonización (21). Estos elementos fúngicos fueron evaluados por medio de la tinción de Gram y del examen directo de cada una de las muestras procesadas. Otro factor que suma importancia a este tipo de aislamientos es la persistencia y abundancia de un mismo microorganismo en diferentes muestras provenientes de un solo paciente (27). Tal fue el caso del grupo de pacientes con hemopatías, en el que de uno de ellos se procesaron 5 muestras obteniendo 9 aislamientos de *C. albicans*. Estos parámetros nos permitieron evaluar cuales aislamientos de todos los que se obtuvieron merecen considerarse como causantes ó contribuyentes de la enfermedad de fondo del paciente (tabla 16).

En las últimas dos décadas varios estudios han destacado un notable incremento de las infecciones debidas a *Candida spp.* en pacientes hospitalizados. Sin embargo a pesar de su frecuente aislamiento de las secreciones respiratorias la neumonía debida a este microorganismo sigue siendo aún inusual. Haron y cols. realizaron un estudio sobre la frecuencia de neumonía primaria por *Candida*

spp. durante un periodo de 20 años en un Centro Oncológico de Texas, USA. De 7725 autopsias realizadas, encontraron 351 (4.5%) casos de enfermedad pulmonar invasiva, de los cuales sólo 31 (0.4%) fueron considerados como neumonías primarias. Este estudio es una de las pocas series reportadas de casos sobre neumonía primaria por *Candida* en pacientes adultos, y aportó información importante acerca de la patogenia y aspectos clinicopatológicos de esta entidad. Sin embargo, debido a que se trata de una población mayoritariamente constituida por pacientes inmunodeprimidos, pertenecientes a un centro de referencia, estos datos no pueden extrapolarse a pacientes inmunocompetentes de unidades de cuidados intensivos (UCI) de hospitales generales en los que cabría esperar una frecuencia de la enfermedad mucho menor (28)

Esta situación constituye un desafío habitual para los médicos de las UCI quienes deben decidir si iniciar o no un tratamiento antifúngico frente al aislamiento de *Candida* spp. de secreciones respiratorias de un paciente no neutropénico, severamente enfermo y sin respuesta al tratamiento antibiótico. La incertidumbre ante esta situación es mayor dado que el significado clínico del aislamiento de estas especies es aún motivo de gran controversia (29).

Rello y cols. evaluaron el aislamiento de *Candida* spp. de secreciones respiratorias obtenidas por broncoscopia en 37 pacientes no neutropénicos ingresados en la UCI durante un periodo de 5 años. Como valor de referencia se empleó el valor de corte utilizado para indicar la presencia de infección bacteriana en muestras de secreciones respiratorias obtenidas por vía broncoscópica con cepillo protegido, el cual es de  $10^3$  ufc/mL. El aislamiento de levaduras del género

*Candida* fue considerado como contaminación definitiva en tres (8.1%) pacientes, probable en 30 (81%) e indeterminada en 4 (10.8%). No se encontró ningún caso de candidosis pulmonar invasiva (CPI), aunque 24 de 28 pacientes presentaron cultivos con crecimiento mayor ó igual a  $10^3$  ufc/mL. Estos resultados sugieren que el aislamiento de *Candida* spp. en muestras de secreciones respiratorias obtenidas por broncoscopia de pacientes no neutropénicos no tendría consecuencias clínicas en la mayoría de los pacientes y debería ser interpretado como colonización de la vía aérea. Por otra parte el valor de corte de  $10^3$  ufc/mL no parecería ser apropiado para el diagnóstico de infección pulmonar debida a *Candida* spp (30).

EI-Ebiary y cols. obtuvieron resultados similares en otro estudio realizado también en pacientes no neutropénicos, con ventilación mecánica por un periodo mayor a 72 hrs. De 25 pacientes incluidos, en 10 (40%) se aisló *Candida* spp. de muestras de secreciones respiratorias obtenidas por diferentes técnicas y biopsia pulmonar realizadas inmediatamente después de la muerte de los pacientes. En sólo dos de los pacientes se constató histológicamente la presencia de CPI. Estos resultados indican que, a pesar de que la frecuencia del aislamiento de *Candida* spp. es elevada en este tipo de pacientes, el desarrollo de compromiso pulmonar invasivo por este hongo es considerado inusual. Al igual que en el estudio anteriormente mencionado, el uso de cultivos cuantitativos no demostró ser de utilidad para establecer la presencia de infección por este hongo (31).

Los criterios para el diagnóstico de CPI deben aún ser definidos. El cuadro clínico no es patognomónico. Durante años el hallazgo de esta levadura en esputo o muestras de secreciones respiratorias obtenidas por broncoscopia, fue utilizado

como marcador de esta infección. Sin embargo, los resultados de estudios como los que se mencionaron parecerían indicar que la presencia de *Candida* spp. en muestras de secreciones respiratorias obtenidas de pacientes no neutropénicos es poco probable que se asocie con enfermedad pulmonar invasiva. El único método diagnóstico que permite demostrar con certeza la presencia de CPI es la biopsia transbronquial; sin embargo, está contraindicada cuando el paciente sufre de hipoxia severa y trastornos de la coagulación (30, 32).

El punto más controvertido en relación con la infección por *Candida* spp. es en que momento iniciar el tratamiento antifúngico. La sociedad Inglesa de Quimioterapia Antimicrobiana recomendó el inicio del tratamiento sólo ante el cultivo de *Candida* de muestras estériles o por demostración histológica de su presencia en tejidos de pacientes de alto riesgo. Todo paciente con hemocultivos positivos o con signos de infección diseminada debe recibir tratamiento con antifúngicos, independientemente de la presencia o no de neutropenia (33, 34)

Con respecto a los aislamientos del género *Candida*, obtenidos en este trabajo, sólo se cuenta con la información de los exámenes microscópicos, los del cultivo y de los pacientes, quienes son individuos con riesgo para adquirir infecciones oportunistas. Con estos datos se obtuvo una lista de especies de hongos que forman parte de la biota normal del ser humano y que podrían estar participando en la sintomatología del paciente (Tablas 12 y 16). Como se puede apreciar varias, de ellas corresponden a especies que ya han sido encontradas causando patologías en pacientes con un sistema inmune dañado (13); por ejemplo, *Candida krusei* (2.02%), *C. tropicalis* (4.05%), *C. zeylanoides* (2.02%),) y *Torulopsis glabrata* (0.67%). Para establecer con toda certeza la participación de

éstas especies en la patología de los pacientes se requiere de conjuntar muchos más datos, como fue sugerido en los antecedentes: estudios radiológicos, pruebas inmunológicas y análisis del cuadro clínico completo del paciente.

Como en otros trabajos epidemiológicos, encontramos que en este estudio la especie *Candida albicans* fue la más frecuente (62.2%), seguida de una especie recientemente descrita que recibe el nombre de *Candida dubliniensis*.

Sullivan y col. (1995) aislaron de sujetos idosos una levadura muy próxima a *C. albicans* pero que ellos describieron como una nueva especie, *C. dubliniensis*, basados en criterios esencialmente moleculares (huella digital genética, Random Amplified Polymorphic DNA, cariotipo, sondas de ADN). Sin embargo la prueba más convincente para separar las dos especies está dada por la secuencia del ácido ribonúcleico ribosomal (ARNr). *C. dubliniensis* produce tubos germinativos y clamidoconidios abundantes dispuestos en pares y racimos en agar niger; muestra algunas diferencias en la asimilación de sustratos carbonados (D-lactato, trehalosa,  $\alpha$ -metil-D-glucósido y D-xilosa negativas en *C. dubliniensis* y positivas en *C. albicans* con el ID 32C). En el medio CHROMagar la nueva especie produce colonias verde oscuro y *C. albicans* da un verde azulado. *C. dubliniensis* también presenta una fuerte actividad  $\beta$ -glucosidasa y es del serotipo A. Sin embargo este conjunto de características no han provisto de un método confiable y de rutina para la diferenciación entre *C. albicans* y *C. dubliniensis* (13).

Hasta ahora esta nueva especie ha sido aislada principalmente en la cavidad bucal de pacientes VIH positivos y con SIDA, pero su epidemiología necesita ser investigada con mayor detalle. Para esto es necesario contar con

métodos de identificación confiables y que puedan utilizarse rutinariamente en la mayoría de los laboratorios. Con este propósito P. Staib y J. Morschhüaser propusieron el uso del medio de Staib (Agar Níger) para distinguir entre estas dos especies tan cercanas. Al utilizar este medio en las dos especies ellos encontraron las siguientes diferencias:

- Las colonias de *C. albicans* en este medio son lisas y las de *C. dubliniensis* rugosas y estrelladas.
- *C. dubliniensis* produce abundantes clamidoconidios desde el segundo día de incubación; *C. albicans* sólo presenta blastoconidios durante todo el periodo de incubación (35).

Esta metodología es la que se empleó en el presente trabajo, y se encontraron 16 aislamientos (tabla 13). En los resultados se describe que el origen de la mayoría de los aislamientos de esta nueva especie provienen de esputo de pacientes con diagnóstico de probable tuberculosis y sólo uno se halló en el grupo de los pacientes con SIDA. Esto indica que *C. dubliniensis* puede ser portada por la población en general, y, bajo ciertas condiciones del portador, manifestar virulencia como *C. albicans*. Al aplicar los criterios de importancia clínica a estos aislamientos se determinó que sólo dos de ellos podrían estar participando en la patología y ambos están incluidos en el grupo de los pacientes con diagnóstico de probable tuberculosis. *C. dubliniensis* también ha sido asociada con infección bucal en individuos no infectados con el VIH y con signos clínicos de candidosis; también ha sido recuperada de una pequeña porción de mujeres con vaginitis por *Candida* (13).

Respecto a las cepas que corresponden al género *Cryptococcus*, encontramos una especie que ha sido escasamente reportada como causante de enfermedad en pacientes con SIDA y es *Cryptococcus albidus* (36). Se obtuvieron 12 cepas a partir de muestras provenientes de diferentes pacientes. Uno pertenece al grupo de los pacientes con SIDA, otro al grupo de los pacientes con Diabetes Mellitus y los demás a los pacientes con diagnóstico de probable tuberculosis. De este grupo podemos decir que la gran mayoría de sus aislamientos se recuperaron repetitivamente de los mismos pacientes con un desarrollo abundante en los medios de cultivo y siempre asociados a otras levaduras del género *Candida*. Cabe resaltar que sólo uno de estos aislamientos presentó examen microscópico con estructuras micóticas sugestivas de invasión (hifas y levaduras abundantes), las cuales seguramente no corresponden a *Cr. albidus* sino a alguna especie del género *Candida* que lo acompaña. Este hecho se explica al recordar que las levaduras del género *Cryptococcus* muy raramente forman pseudohifas, por lo tanto no debería esperarse más que abundantes levaduras con una cápsula pequeña al analizar el esputo con tinta china, situación que no se presentó. La observación de la cápsula en estas levaduras sólo fue posible hasta después del cultivo, nunca en el examen del esputo con tinta china; por lo tanto la atribución de importancia clínica para estos aislamientos es aún más complicada que para los del género *Candida*, ya que no se cuenta con apoyo de un examen microscópico positivo. En los reportes de infecciones causadas por *Cr. albidus* se plantea la primoinfección por vía respiratoria, donde se disemina hacia el sistema nervioso central igual que *Cr. neoformans* (36). Por lo tanto en la sintomatología de los pacientes con diagnóstico de probable tuberculosis puede

estar participando *Cr. albidus* como una primoinfección, la cuál, lo más probable es que sea inhibida por las defensas del huésped que en el caso de los pacientes de este grupo no se encuentran tan dañadas como en las de los pacientes con SIDA. Otro factor que apoya esta hipótesis es el hecho de que todos los aislamientos aquí reportados se obtuvieron durante los meses de verano (agosto y septiembre) y en un trabajo realizado por Sánchez -Paredes, se informa que *Cr. albidus* se aisló con mayor frecuencia de los árboles de *Eucalyptus* spp. en este periodo del año. Hay que tener presente que esta investigación abarcó un periodo de 9 meses y que es probable que se encuentren otros picos de aislamientos durante otra estación del año (36).

El papel de los aislamientos de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* está claro: se encuentran causando una infección oportunista en pacientes con SIDA. La fuente de los aislamientos fue médula ósea y sangre, fluidos que en situaciones normales son estériles, por lo que el aislamiento de cualquier microorganismo corresponde al del agente etiológico de la patología del paciente, siempre que la muestra halla sido tomada correctamente. Las tres muestras de líquido cefalorraquídeo procesadas correspondieron a los mismos pacientes cuyas muestras de médula ósea fueron positivas a *Cr. Neoformans*; sin embargo, el microorganismo sólo pudo detectarse en el examen directo con tinta china en una sola muestra de líquido cefalorraquídeo. Esto concuerda con lo reportado en la literatura donde se plantea que sólo el 50% de las muestras positivas a *Cr. neoformans* pueden ser detectadas desde el examen directo con tinta china (19). Las pruebas que se aplicaron para la identificación de esta especie correspondieron a las más útiles de acuerdo a diversos autores, quienes

establecen que el examen en fresco con tinta china y su cultivo en medios rutinarios como el agar detrosa Sabouraud (ADS) y el agar Níger (AN) así como la identificación por medios bioquímicos (auxanograma) corresponden a un diagnóstico integral del laboratorio (37, 38). La prueba de aglutinación con partículas de latex es la más efectiva para el diagnóstico de esta enfermedad, pero este estudio no se realiza rutinariamente en nuestro país (39).

De acuerdo a la tabla 16, a ninguno de los dos aislamientos del género *Trichosporon* se le hallaron factores para darles importancia clínica, quedando como contaminantes provenientes de la biota normal del paciente.

En cuanto a la única especie obtenida del género *Torulopsis*, *T. glabrata*, es necesario hacer una aclaración de tipo taxonómico, ya que hay autores que consideran a esta especie dentro del género *Candida*. El género *Torulopsis* Berlese 1895, fue declarado ilegítimo en 1978 (Yarrow y Meyer) porque la especie tipo *T. rosea* había sido perdida, y el neotipo *T. pulcherrima* presentaba pseudomicelio como las especies de *Candida* y propusieron mantener el género con *T. colliculosa* como neotipo. Sin embargo, esta especie también es capaz de formar pseudomicelio. Filogenéticamente la comparación de las secuencias de ARNr muestra que *T. glabrata* no está relacionanda con *Candida*. Por el contrario, esta especie es filogenéticamente próxima a las especies de *Sacharomyces* en sentido estricto (40). Por lo tanto, tomando en cuenta que la reestructuración taxonómica se esta llevando a cabo a partir del análisis genético de los microorganismos, en este trabajo se consideró que esta especie en especial no debía ser integrada al género *Candida*.

Retomando la información de la tabla 16 se encuentra un hongo filamentoso, *Geotrichum candidum*. En el análisis microscópico de las muestras de donde se obtuvieron los aislamientos de *G. candidum* no se observaron estructuras micóticas sugestivas de este hongo (hifas tabicadas con arthroconidios), sino más bien abundantes levaduras. Sin embargo, cuando *G. candidum* está parasitando, los arthroconidios se pueden presentar redondeados dando un aspecto de blastoconidios, lo que podría causar confusión con *Candida* spp (5). En los medios de cultivo el número de colonias fue abundante y en algunos de ellos fué el único microorganismo que se desarrollo. Incluso su aislamiento fue repetitivo en diferentes muestras de los mismos pacientes, como es el caso del grupo de los pacientes diabéticos, donde los 9 aislamientos de *G. candidum* reportados provienen de un solo paciente. Con los datos que se han proporcionado hasta este momento respecto a los aislamientos de *G. candidum* no puede afirmarse que los pacientes padezcan geotricosis; este hongo forma parte de la biota normal en boca e intestinos principalmente, además es empleado en la maduración de algunos quesos blandos, por lo que su presencia en los exámenes microscópicos y en los medios de cultivo podrían estar indicando que el paciente tiene una dieta rica en lácteos y no necesariamente una geotricosis pulmonar o bronquial (4,5). Los datos proporcionados por el examen microscópico y por el cultivo son insuficientes, por lo que son necesarios otros estudios (rayos X, tomografías, inmunología) para confirmar o descartar una posible geotricosis.

En cuanto al resto de los hongos filamentosos, ninguno de ellos mostró la característica de aislarse repetitivamente de un mismo paciente y ningún examen microscópico presentó micelio ó estructuras que sugirieran la invasión por alguno

de estos hongos. En el estudio realizado por Castañón-Olivares y col., se indica que el diagnóstico de micosis pulmonar causada por este tipo de hongos debe incluir la valoración de innumerables parámetros tanto clínicos como de laboratorio, de tal manera que todos ellos coincidan como causa de la enfermedad (10). Ya que en el presente trabajo no se integró la información de otros estudios realizados al paciente, sobre todo inmunológicos, todos los aislamientos de hongos filamentosos fueron considerados contaminación de la vía aérea del paciente.

## CONCLUSIONES

- Los pacientes con diagnóstico de probable tuberculosis y con SIDA representaron los grupos mayoritarios de pacientes inmunodeprimidos atendidos en el Hospital Regional "General Ignacio Zaragoza", ISSSTE en el periodo de junio de 1999 a marzo del 2000
- El 75.18% de las muestras procesadas provenientes de dichos pacientes correspondieron a muestras de esputo, siendo las patologías respiratorias las más frecuentemente diagnosticadas en ambos grupos.
- El género *Candida* continúa siendo el más aislado en este tipo de estudios, siendo *Candida albicans* la especie fúngica de mayor frecuencia (62.2%), seguida de *Candida dubliniensis* (10.81%).
- La especie *C. dubliniensis* requiere ser estudiada epidemiológicamente con mayor interés, ya que fue aislada con mayor frecuencia, y con probable participación patológica, en pacientes no infectados con el VIH que en el grupo de los pacientes con SIDA.

- *Cryptococcus albidus*, aislado reiteradamente de muestras de pacientes con diagnóstico de probable tuberculosis, podría ser la causa de la patología pulmonar.
  
- Aplicando los criterios de patogenicidad se determinó que 59 (32.78%) de los 180 aislamientos levaduriformes y 5 (7.25%) de los filamentosos, probablemente tienen una participación patogénica en los pacientes.

## PERSPECTIVAS

Como consecuencia de los resultados obtenidos durante el desarrollo del presente trabajo se propone la realización de un proyecto en donde se evalúe con mayor detenimiento la frecuencia de aislamientos de *Cryptococcus albidus* en las muestras de los pacientes que tienen diagnóstico de probable tuberculosis, ya que los datos obtenidos en el presente proyecto sugieren que dicho microorganismo podría estar involucrado en el cuadro clínico de dichos pacientes. En este nuevo proyecto el diagnóstico de una micosis causada por *Cryptococcus albidus* estaría basada principalmente en los resultados del análisis microscópico y del cultivo de las muestras de esputo, ya que no se cuenta con pruebas inmunológicas específicas para la detección de esa infección y mucho menos a nivel pulmonar; otro recurso valioso para diagnosticar una criptococosis pulmonar causada por *Cryptococcus albidus* sería la obtención de biopsias, en las que se buscaría la presencia de dicho microorganismo en los tejidos; sin embargo la obtención de muestras de tejido no siempre es fácil. Esta propuesta de estudio puede extrapolarse a los aislamientos de *Geotrichum*, hongo que fue aislado repetitivamente de un paciente. Ambos estudios abarcarían la búsqueda del tratamiento más adecuado a las micosis encontradas, en donde estaría involucrada la realización de pruebas bioquímicas y moleculares de resistencia a antimicóticos.

Varios autores consideran que el diagnóstico de una micosis debe ser el resultado de una serie de estudios que determinen la causa del padecimiento infeccioso.

1. El contexto clínico, en el cual el médico efectúa el interrogatorio y el examen físico, solicita estudios radiográficos y pruebas de laboratorio, además de obtener las muestras apropiadas para el cultivo.
2. El laboratorio de anatomía patológica, lugar donde se hace una búsqueda de elementos micóticos en preparados citológicos de fluidos orgánicos, biopsias o cortes teñidos preparados a partir de tejidos y órganos resecados. Una porción de tejidos u órganos también es remitido para el cultivo de hongos.
3. El laboratorio de micología es el área donde las muestras son examinadas y se hacen los cultivos para recuperar hongos. El crecimiento que aparece en los medios de cultivo se examina macroscópicamente y se preparan montajes frescos para el estudio microscópico y la identificación final. Pueden evaluarse características bioquímicas para confirmar la identificación diferencial de algunas especies (19).

Idealmente, con la integración de estas áreas el diagnóstico de una micosis se lograría de una manera más rápida y eficaz, beneficiando al paciente quien recibirá un tratamiento adecuado y oportuno.

## BIBLIOGRAFIA

1. Rodríguez, V.J. 1998. Introducción y generalidades sobre los hongos. En *Micología Médica*. Editorial de la Universidad de Costa Rica. San José C.R. Pag. 19 - 43
2. Ajello, L., Hay, R.J. 1998. Medical Mycology, Vol. 4. En: Collier, L. , Balows, A., Sussman, A., editores. *Microbiology and Microbial Infections*. Topley and Wilson's. New York. 1-711 pp.
3. Infecciones por hongos en el SIDA. <http://www.ctv.es/USERS/Fpardo/vihhon.htm>
4. López M.R., Méndez T.L.J., et. al. 1995. *Micología Médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio*. Trillas. México. Pag: 20
5. Bonifaz A 1998. Micosis oportunistas: Candidosis, Geotricosis. En *Micología Médica Básica*. Méndez Editores. México. 541 pp.
6. Carol A.K. 1998. Fungal Infections in Immunocompromised Hosts: Focus on Epidemiologic Aspects of infection. *Clin. Up. Fun. Infec.* 1, Issue 4.
7. Cristiana M., William R.J. 1999. Epidemiology and Clinical Aspects of Unusual Fungal Nosocomial Infections. *Clin. Up. Fun. Infec.* II, Issue 1.

8. Rippon J.W. 1988. *Oportunistic infections : Candidiasis and the Pathogenic Yeast*. En *Medical Mycology*. 3ª ed. W.R. Saunders Company. Philadelphia. Pag. 532-581.
9. Medical Section of the American Lung Association. 1995. Fungal Infection in HIV-infected Persons. *Am J Respir Crit Care Med* 152: 816-822.
10. Castañon O., L.R., Méndez T., L.J., et. al. 1988. Observación de micosis pulmonares oportunistas. *Infectología* Año 8, Num. 1, 11-14.
11. Manzano G.P , Hernández H.F., et. al 2000. Identificación y tipificación de levaduras aisladas de pacientes de un hospital de la ciudad de México. *Revista Argentina de Microbiología* 32: 1-6.
- 12 Méndez T., L. J., López M., R., et. al. 1999. Variación en la frecuencia de Micosis en México. *Revista Argentina de Microbiología* 31: 107-113.
13. Coleman D.C., Rinaldi M.G., et. al.1998 Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. *Medical Mycology* 36: Supplement 1, 156-165.
14. Castañon O., L.R., Arreguín E., R. et. al. 2000. Frequency of *Cryptococcus* Species and Varieties in México and their Comparison with some Latin American Countries. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 42: 35-40.

15. López M., R., Bazán M., E., et. al. 1995. Frecuencia de micosis pulmonares en pacientes hospitalizados en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias SS. *Revista Mexicana de Micología* 11: 39-45.
16. Van den Saffele J.K., Boelaert J.R. 1995. Zygomycosis in HIV-positive Patients: a review of the literature. *Mycoses* 39: 77-84.
17. Dixon D.M., McNeil M.M., et. Al. 1996. Fungal Infections: a growing threat. *Public Health Reports* 3: 226-35.
18. Casanova C.L., Ruiz O.I. 1993. *Histoplasma capsulatum* en sangre periférica de pacientes con SIDA. Informe de cuatro casos con elevación de deshidrogenasa láctica. *Rev. Inv. Clin.* 45:67-70.
19. Koneman E.W., Roberts G.D. 1992. *Micología Práctica de laboratorio*. 3ª ed., Editorial Panamericana. México. Pag: 20-32, 47-48, 73-82.
20. G. Segretain, E. Drouhet, F. Mariat. 1966. *Diagnóstico de Laboratorio en Micología Médica*. La prensa Mexicana. México. Pag. 13.
21. Bodey G.P 1993 *Candidiasis, Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment*. 2ª ed Raven Press. New York. Pag. 109-130.

22. López M., R., Castañon O., L.R., et. al., 1988. Diagnóstico serológico de micosis pulmonares por oportunistas. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 30: 317-320.
23. Tay Z.J. , Gutierrez Q.M., et. al., 1993. *Microbiología y Parasitología Médicas*. Méndez Editores. México. Pag. 416. 417.
24. Pitt J.I. 1979. The Genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press Inc. London. 634 pp.
25. Kenneth, B. Raper, D.I. 1977. The Genus *Aspergillus*. Robert E. Krieger Publishing Company. U.S.A. 486 pp.
26. Samson R.A., Hoekstra E.S., Van Oorschot C., A.N. 1984. *Introduction to food-borne fungi*. 2<sup>a</sup> ed. Centraalbureau Voor Schimmelcultures. 248 pp.
27. Esandi M.A., Díaz E., Rello J. 1999. Significado de los aislamientos de *Candida* spp. o *Aspergillus* spp. en muestras obtenidas con fibrobroncoscopio de pacientes no neutropénicos con infiltrados pulmonares. *Rev Iberoam Micol.* 16: 1-3
28. Haron E., Vartivarian S., et. al. 1993. Primary *Candida* pneumonia. Experience at a large cancer center and review of the literature. *Medicine* 72: 137-142.

29. Pfaller M., Herwald L., 1997. The clinical microbiology laboratory and infection control: emerging pathogens, antimicrobial resistance, and new technology. *Clin Infect Dis.* 25: 858-870.
30. Rello J., Esandi M.E., et al. 1998. The role of *Candida* sp. isolated from bronchoscopic samples in nonneutropenic patients. *Chest.* 114: 146-149.
31. El-Ebiary M., Torres A., et al. 1997. Significance of the isolation of *Candida* species from respiratory samples in critically ill, non-neutropenic patients An immediate postmortem histologic study. *Am J Respir Crit Care Med.* 156: 583-590
32. James E. Pennington, M.D. 1989. *Respiratory Infections: Diagnosis and Management.* 2a ed. Ed. Raven Press. New York. Pag 229-238.
33. British Society for Antimicrobial Chemotherapy Working Party. 1994. Management of deep *Candida* infection in surgical and intensive care units patients. *Intensive Care Med.* 20: 522-528.
34. Pittet D , Garbino J. 1995. Fungal infections in the critically III. *Current Opinion in Critical Care.* 1: 369-380.
35. Staib P., Morschhäuser. 1999. Chlamydospore formation on Staib agar as a species-specific characteristic of *Candida dubliniensis*. *Mycoses.* 42: 521-524.

36. Sanchez P.E. 2001. Aislamiento de *Cryptococcus* spp. de importancia médica a partir de *Eucalyptus* spp. sanos de Cd. Universitaria UNAM. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México.
37. López M.R., Castañón O., L.R. 1996. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio de la criptococosis. *Rev. Mex. Patol. Clín.* 44: 177-182.
38. Kwon-Chung, K.J.; I. Polachek; J.E. Bennett. 1982. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotype B and C). *J. Clin. Microbiol.* 15: 535-537.
39. Bonifaz A., Flores R., M.P., Araiza J. 1996 Criptococosis y su diagnóstico de laboratorio. *Lab. Acta.* 8: 37-43.
- 40 Kurtzman C.P., Robnett C.J. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73: 331-71.

# APÉNDICE A

## MEDIOS DE CULTIVO

### Medio simplificado de Niger

|                            |         |
|----------------------------|---------|
| <i>Guizotia abyssinica</i> | 50.0 gr |
| Agar bacteriológico        | 18.0 gr |
| Agua destilada             | 1000 ml |

Pulverizar la semilla y ebulir durante 25 a 30 minutos. Filtrar con gasa; agregar el agar, hervir por 1 minuto para disolver el agar y esterilizar a 121°C por 15 minutos. Enfriar y vaciar en cajas, mantener refrigerado.

### Agar Niger para clamidoconidios

|                                 |          |
|---------------------------------|----------|
| <i>Guizotia abyssinica</i>      | 50.0 gr  |
| Glucosa                         | 1.0 gr   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 1.0 gr   |
| Agar                            | 18.0 gr  |
| Agua destilada                  | 1000 ml  |
| Sulfato de penicilina           | 20 U/ml  |
| Estreptomocina                  | 40 µg/ml |

Pulverizar la semilla y ebulir durante 25 a 30 minutos. Filtrar, agregar el agar y hervir por un minuto; esterilizar a 121°C por 15 minutos. Dejar enfriar y cuando llegue a 50°C agregar la estreptomocina y el sulfato de penicilina. Vaciar en cajas y mantener refrigerado.

## Preparación de antibióticos para el medio de Niger

|              |           |
|--------------|-----------|
| Penprocilina | 800,000 U |
| Gentamicina  | 80 mg     |

Hidratar la penprocilina con los 2 ml de agua inyectable y tomar 0.5 ml y diluirlos en 10 ml de agua destilada estéril (concentración final 20,000 U/ ml). De esta última dilución tomar 1 ml y agregarlo a 1 lt. de medio. La concentración final de peneicilina será de 20 U/ml. La gentamicina se obtiene comercialmente ya hidratada; se toma 1 ml y se agraga a 1 Lt de medio. La concentración final será de 40 µg/ml.

## Agar Harina de Maíz

|                        |         |
|------------------------|---------|
| Corn Meal Agar (DIFCO) | 17.0 gr |
| Tween 80               | 15 ml   |
| Agua destilada         | 1000 ml |

Se pesa el polvo y se hidrata con el volumen de agua indicado, se hierve durante un minuto para disolver el medio y se agrega el tween 80.

Esterilizar a 121°C por 15 minutos y dejar enfriar; vaciar en cajas Petri y mantener refrigerado.

## Medio de Urea

|                     |         |
|---------------------|---------|
| Solución A          |         |
| Agar Bacteriológico | 15.0 gr |
| Agua destilada      | 900 ml  |

|                        |         |
|------------------------|---------|
| Solución B             |         |
| Urea Agar Base (DIFCO) | 29.0 gr |
| Agua destilada         | 1000 ml |

Solución A: Suspender el agar en el agua y hervir para disolverlo. Esterilizar a 121°C por 15 minutos y dejar enfriar a 50-55°C.

Solución B: Disolver el medio basal en 100 ml de agua destilada y mezclar perfectamente; esterilizar por filtración con membranas Millipore de 0.45 µm.

Combinar asépticamente ambas soluciones; evitar calentar cuando ya estén mezcladas. Vaciar en tubos de 13 X 100 previamente estériles e inclinarlos. Mantener refrigerado.

### **Concentrado de Czapek**

|                                      |        |
|--------------------------------------|--------|
| NaNO <sub>3</sub>                    | 30.0 g |
| KCl                                  | 5.0 g  |
| MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O | 5.0 g  |
| FeSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O | 0.1 g  |
| Agua                                 | 100 ml |

El concentrado de Czapek puede ser conservado sin esterilización indefinidamente. La precipitación de Fe(OH)<sub>3</sub> puede ser resuspendida por agitación antes de usarse. Esta solución se emplea para reducir el tiempo de preparación en los medios basados en dicha solución.

### **Agar Czapek-extracto de levadura**

|                                 |         |
|---------------------------------|---------|
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 1.0 g   |
| Concentrado de Czapek           | 10 ml   |
| Extracto de levadura            | 5.0 g   |
| Sacarosa                        | 30.0 g  |
| Agar                            | 15.0 g  |
| Agua                            | 1000 ml |

Suspender todos los ingredientes en agua y hervir por 1 minuto hasta disolver; esterilizar por 15 minutos a 121°C y enfriar a 55°C aproximadamente. Vaciar en cajas Petri estériles y conservar en refrigeración.

#### **Agar nitrato-glicerol al 25%**

|                                 |         |
|---------------------------------|---------|
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 0.75 g  |
| Concentrado de Czapek           | 7.5 ml  |
| Extracto de levadura            | 3.7 g   |
| Glicerol, grado analítico       | 250.0 g |
| Agar                            | 12.0 g  |
| Agua                            | 750 ml  |

Se requiere de glicerol grado analítico debido a que se utiliza en una alta y precisa concentración, por lo que deberá de contener la mínima cantidad de agua residual (1%). Suspender todos los ingredientes en agua y hervir por 1 minuto hasta disolver; esterilizar por 15 minutos a 121°C y enfriar a 55°C aproximadamente. Vaciar en cajas Petri estériles y conservar en refrigeración.

#### **Agar extracto de malta (2%)**

|                            |         |
|----------------------------|---------|
| Extracto de malta en polvo | 20.0 g  |
| Peptona                    | 1.0 g   |
| Glucosa                    | 20.0 g  |
| Agar                       | 15.0 g  |
| Agua                       | 1000 ml |

Suspender todos los ingredientes en agua y hervir por 1 minuto hasta disolver, esterilizar por 15 minutos a 121°C y enfriar a 55°C aproximadamente. Vaciar en cajas Petri estériles y conservar en refrigeración. Si se requiere puede variarse la

## APÉNDICE B

### TINCIONES

#### Coloración con Azul de Algodón

A) Solución de lactofenol:

Fenol líquido\* 20 ml

Acido láctico 20 ml

Glicerol 40 ml

Agua destilada 20 ml

B) Azul de anilina 0.05 gr

Mezclar A con B y filtrar. \* Si el fenol se encuentra en cristales, fundirlo en baño

María; tomar los 20 ml necesarios y agregar los reactivos restantes.

#### Solución de hidróxido de potasio al 10%

Hidróxido de potasio 10.0 gr

Agua destilada 100 ml

El porcentaje de esta solución puede variar de acuerdo a las necesidades del personal.

#### Tincion negativa con Tinta china

Tinta negra china marca Parker 1 ml

Agua destilada 9 ml

Hacer una mezcla con las cantidades anteriores; la proporción de tinta puede variar dependiendo de los resultados.

## Tinción de PAS

### 1. Etanol-formol

|                     |       |
|---------------------|-------|
| Formaldehído al 40% | 10 ml |
| Etanol absoluto     | 90 ml |

### 2. Acido peryódico al 1%

|                 |        |
|-----------------|--------|
| Acido peryódico | 1.0 gr |
| Agua destilada  | 100 ml |

### 3. Reactivo de Schiff

|                      |        |
|----------------------|--------|
| Agua destilada       | 200 ml |
| Fucsina básica       | 1.0gr  |
| Acido clorhídrico 1N | 20 ml  |
| Bisulfito de sodio   | 1.0 gr |
| Carbón activado      | 0.5 gr |

Hervir el agua destilada y agregar la fucsina agitando; enfriar hasta 50°C y filtrar.

Agregar el ácido clorhídrico y dejar enfriar hasta 25°C. Agregar el bisulfito de sodio

y verterlo en un frasco ambar de tapón de rosca que no deje espacio para aire.

Agitar periódicamente por dos horas y dejar reposar toda la noche en oscuridad.

Agregar 0.5 gr de carbón activado y agitar intermitentemente por una hora. Filtrar

hasta que la solución quede blanca. Guardar en refrigeración en un frasco ambar

hermético.

### 4. Verde brillante

Se prepara en dos partes:

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| a) Verde brillante SF | 0.2 gr |
| Agua destilada        | 100 ml |
| Acido acético glacial | 0.2 ml |

|                   |       |
|-------------------|-------|
| b) Agua destilada | 50 ml |
|-------------------|-------|

Tomar 10 ml de a y agregarlos en b

### 5. Etanol al 70%

### 6. Etanol al 95%

### 7. Etanol absoluto

### 8. Xilol

### 9. Agua corriente

## APÉNDICE C

### PRUEBA DE ASIMILACION DE CARBOHIDRATOS

#### Solución A

Se pesan 0.67 g de Yeast Nitrogen Base y se disuelven en 80 ml de agua bidestilada. Esterilizar a 121°C por 15 minutos y dejar enfriar a temperatura ambiente.

#### Solución B

Se pesan 0.5 g del azúcar a preparar (en el caso de la rafinosa se pesa el doble) y se disuelven en 20 ml de agua bidestilada. Filtrar la solución con filtro Millipore de 0.45µm con la ayuda de una jeringa de 20 ml estéril y desechable.

Se mezclan ambas soluciones de manera aséptica quedando un volumen final de 100 ml. También deberá prepararse solución A sin azúcar para emplearla como control. Este procedimiento se sigue para cada uno de los azúcares que se emplearán.

Para preparar la batería completa de azúcares para identificación de un aislamiento se deberán vaciar 2 ml del azúcar (con jeringa estéril de 10 ml desechable) en un tubo de 13 X 100 previamente estéril y con tapón de gasa y algodón. Cada azúcar debe ir por duplicado y cada juego de azúcares llevará un control que consta de 2 ml de solución A.

#### Inoculación del medio

Una vez que se tiene la batería completa de azúcares para la identificación del aislamiento se procede a preparar una suspensión del mismo en agua bidestilada previamente estéril y a temperatura ambiente, el aislamiento debe tener 48 hrs. de incubación en SS. Se toma una pequeña asada y se resuspende

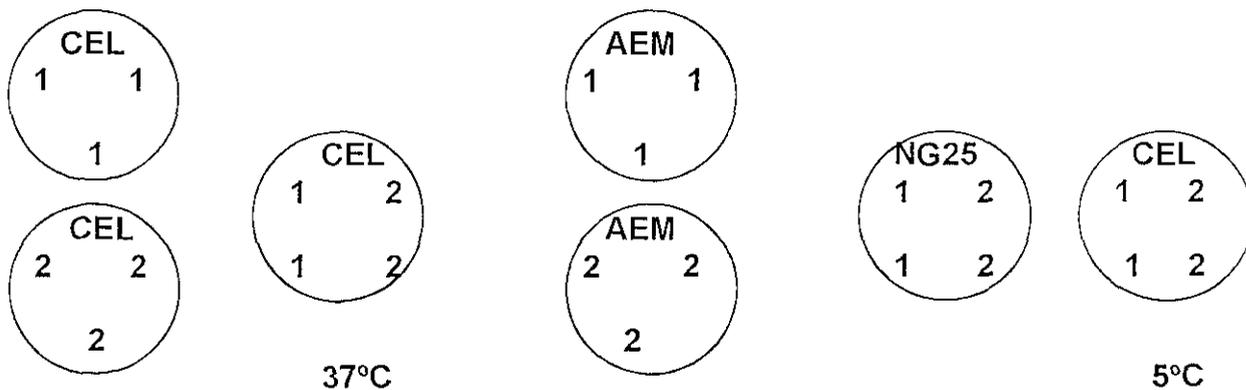
suspensión original fue apropiadamente preparada, puede asegurarse que más del 95 % de las colonias tuvieron tal origen.

Pueden obtenerse suspensiones uniformes de esporas adicionando un aerosol adecuado al medio de suspensión. Se ha utilizado el lauril sulfonato de sodio en concentraciones de 1:10,000 ó 1:100,000, el cual no tiene efectos nocivos sobre el hongo, aparentemente. El método de dilución para asegurar el aislamiento de esporas únicas es más rápido que otros y para muchos propósitos es satisfactorio. Si embargo no se recomienda para la separación de contaminantes bacterianos a menos que el medio sea complementado con antibióticos adecuados.

## APÉNDICE E

### Método de inoculación para medios especiales en la identificación del género *Penicillium* y *Aspergillus*

En el caso del género *Penicillium* el número de cajas Petri recomendado es de 7, las cuales deberán inocularse de acuerdo al siguiente esquema.



Esquema utilizado para el cultivo de los aislamientos de *Penicillium*.

# APÉNDICE F

## Cuestionario para la identificación de *Penicillium* spp.

Número de identificación: \_\_\_\_\_ Fuente: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

CEL: \_\_\_\_\_ mm; Superficial Medio Profundo; Escaso Medio Denso;  
Plano Sulcado Cerebriforme; Micelio: \_\_\_\_\_  
Aterciopelado Flocoso Funiculoso Fasciculado Coremiforme Sinematoso  
Sinemata formada en: Oscuridad Luz; A los: 7 14 21 días; Elevación: mm.  
Margen: Sumergido Bajo Profundo Entero Irregular; Conidiogénesis:  
Exudado: \_\_\_\_\_ Pigmento soluble: \_\_\_\_\_  
Reversa: \_\_\_\_\_

AEM: \_\_\_\_\_ mm; Superficial Medio Profundo; Escaso Medio Denso;  
Plano Sulcado Cerebriforme; Micelio: \_\_\_\_\_  
Aterciopelado Flocoso Funiculoso Fasciculado Coremiforme Sinematoso  
Sinemata formada en: Oscuridad Luz; A los: 7 14 21 días; Elevación: mm.  
Margen: Sumergido Bajo Profundo Entero Irregular; Conidiogénesis:  
Exudado: \_\_\_\_\_ Pigmento soluble: \_\_\_\_\_  
Reversa: \_\_\_\_\_

NG25: \_\_\_\_\_ mm; Superficial Medio Profundo; Escaso Medio Denso;  
Plano Sulcado Cerebriforme; Micelio: \_\_\_\_\_  
Aterciopelado Flocoso Funiculoso Fasciculado Coremiforme Sinematoso  
Exudado: \_\_\_\_\_ Pigmento soluble: \_\_\_\_\_  
Reversa: \_\_\_\_\_

CEL 37°C: \_\_\_\_\_ mm; Superficial Medio Profundo; Escaso Medio Denso;  
Plano Sulcado Cerebriforme; Micelio: \_\_\_\_\_  
Aterciopelado Flocoso Funiculoso Fasciculado Coremiforme Sinematoso  
Exudado: \_\_\_\_\_ Pigmento soluble: \_\_\_\_\_  
Reversa: \_\_\_\_\_

CEL 5°C: \_\_\_\_\_ mm; Micelio: \_\_\_\_\_  
Reversa: \_\_\_\_\_

Conidióforos: Sumergidos Superficiales Aereos Funiculosos Fasciculados Coremio  
Sinemata;

Estípites: \_\_\_\_\_  $\mu\text{m}$  X \_\_\_\_\_  $\mu\text{m}$ ; Liso Rugoso Tuberculado.

Penicilli: Monoverticilado: Vesícula \_\_\_\_\_  $\mu\text{m}$  Sin vesícula; Terverticilado

Cuaterverticilado Biverticilado: Irregular Terminal Ahorquillado; Apices: \_\_\_\_\_  $\mu\text{m}$

Rami: 1 2 3 +; Divergentes Comprimidas; Espatulada Vesicular, Liso Rugoso  
\_\_\_\_\_  $\mu\text{m}$  X \_\_\_\_\_  $\mu\text{m}$

Métula. 2 3 4 5 8 +; Divergente Comprimida; Lisa Rugosa \_\_\_\_\_  $\mu\text{m}$  X  
\_\_\_\_\_  $\mu\text{m}$

**Conidios:**

Dimensiones: \_\_\_\_\_

Características de la pared: \_\_\_\_\_

Color: \_\_\_\_\_

**Células de Hülle y otros elementos hifales:**

Forma: \_\_\_\_\_

Dimensiones: \_\_\_\_\_

**Esclerotes o estructuras semejantes**

Forma y estructura: \_\_\_\_\_

Dimensiones: \_\_\_\_\_

Color: \_\_\_\_\_

**Estadio Ascospórico**

**Cleistotecio**

Origen: \_\_\_\_\_

Forma y estructura: \_\_\_\_\_

Cantidad: \_\_\_\_\_

Dimensiones: \_\_\_\_\_

Color: \_\_\_\_\_

**Asci**

Forma: \_\_\_\_\_

Dimensión: \_\_\_\_\_

**Ascosporas**

Patrón: \_\_\_\_\_

Dimensiones: \_\_\_\_\_

Color: \_\_\_\_\_