



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

“COMPENDIO DE HERRAMIENTAS PARA EL DIAGNÓSTICO EN MICOLOGÍA”

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

CRUZ AMARO SERGIO CÉSAR

ASESOR(A): M. en C. ANA LAURA VÁZQUEZ MARTÍNEZ

ASESOR(A): M. en C. PAOLA EDITH BRISEÑO LUGO

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, MÉXICO, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

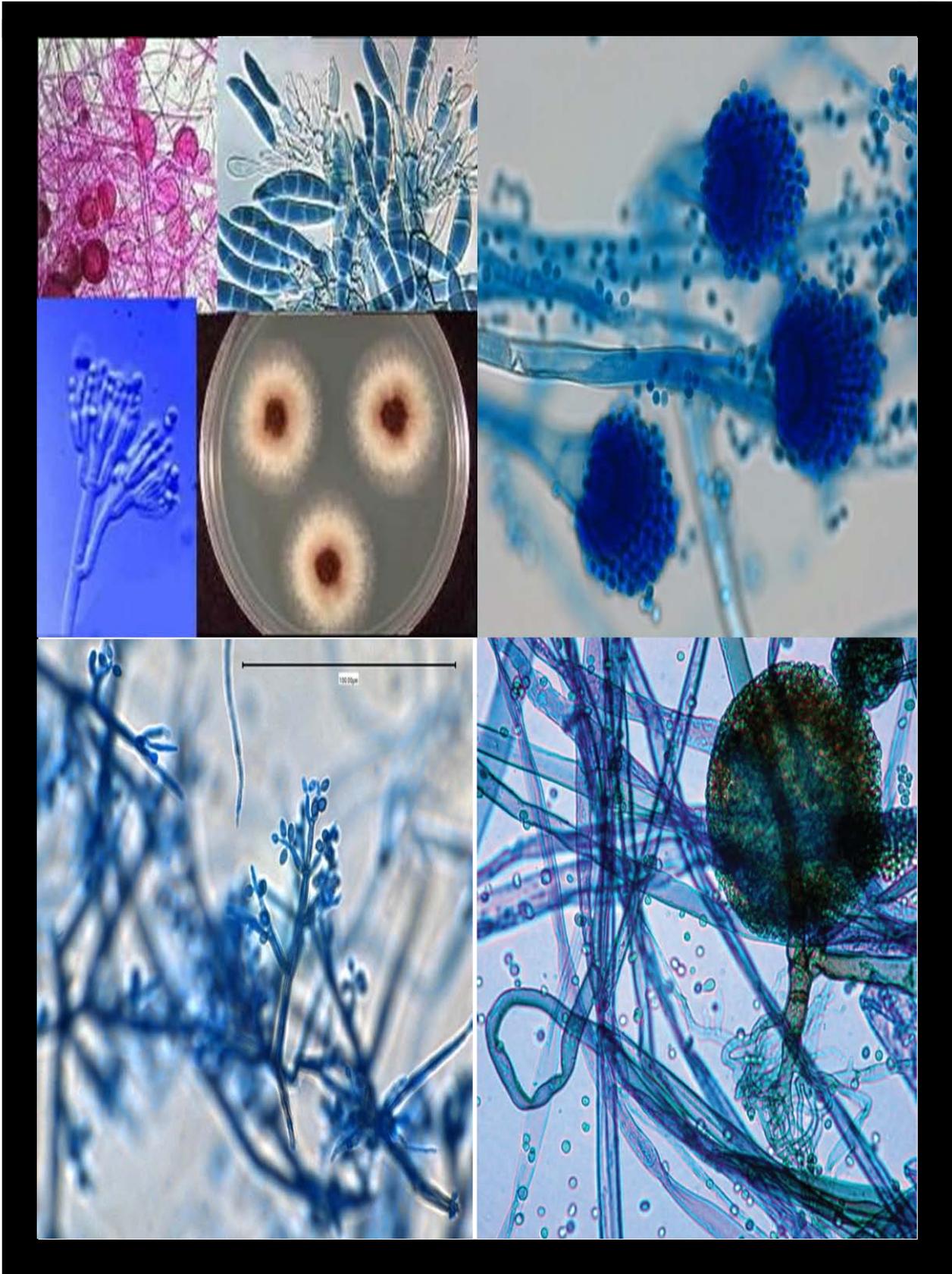


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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.



Dedicatoria:

*Dedico este trabajo a la persona mas especial y maravillosa del mundo para mí, para ti que eres mi angel, que con una sonrisa tuya iluminabas mi mundo, para ti que me inspiraste a terminar esta aventura tan larga que fue mi carrera, para ti que siempre te buscaba desde donde estuviera, en mi cielo, eres la estrella mas Hermosa que existe, para ti **DACM** que eres lo único que me importaba y me sigue importando en este mundo.*

Agradecimientos:

A mi Mamá:

Mamá gracias por todo tu apoyo incondicional hacia mi, por soportarme en mis fracasos y en mis locuras, gracias por ayudarme en todo.

A mis maestros:

Muchas gracias Profesora Ana Laura por el apoyo en la realización de esta tesis, Profa Paola Edith por ayudarme a hacer esta tesis, soportarme las largas correcciones y por tolerar mis travesuras y locuras, Profe Ladislao por ayudarme con todas las bibliografías y todo lo que no tenía ni idea de como se hacía, muchas gracias a todos los profesores que me enseñaron no solo sobre su materia si no también en como comportarme siempre.

A mis Amigos:

Ana Laura, Paola Edith, Enrique Arroyo, Martha Elena, porque siempre estuvieron conmigo apoyándome en todo, los largos días de clases, los laboratorios, las risas y locuras que siempre estuvieron presentes durante toda la carrera.

A la FES Cuautitlan y a CCH Azcapotzalco:

Por ser mi escuela, entre sus aulas, laboratorios, jardines en donde me desarrolle primero en la prepa y después como profesionista, que siempre fueron un refugio y casa para mi.

ÍNDICE:

	Pagina
1.-Objetivos	1



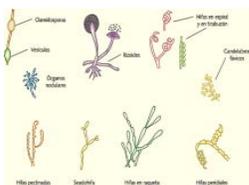
2.-Justificacion	1
------------------	---



3.- Marco Teorico:



a) Historia de la micología	1-11
-----------------------------	------



b) Introducción a la Micología	
--------------------------------	--

12-17



c) Estructura y Fisiología de los Hongos

17-26



d) Bioseguridad en el manejo de Hongos

26-38

4.- La Micología en el Laboratorio



a) Obtención y manejo de muestras clínicas para el diagnóstico Micológico

39-64



b) Onicomycosis

65-78



c) Dermatofitosis

79-90



d) Micetoma

91-109



e) Micosis producidas por el género Candida

110-126



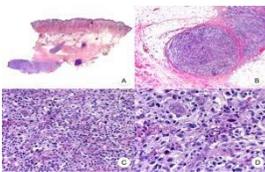
f) Criptococosis

127-144



g) Aspergilosis

145-165



h) Histopatología de las micosis

166-174

5.- Antimicóticos:

175-181



6.- Monitoreo ambiental y búsqueda de Hongos contaminantes

182-187



7.- Discusión

8.- Conclusiones

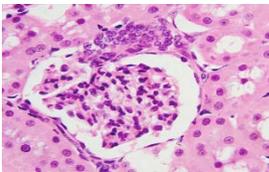


Anexos



Anexo 1: Metodos de siembra para Hongos

188-187



Anexo 2: Tinciones Histologicas

188-196



Anexo 3: Preparación de medios para la siembra Micologica

197-223



Anexo 4: Manejo del Microscopio

224-227

OBJETIVO GENERAL:

El presente compendio tiene como objetivo la generación de un material actualizado, completo y accesible para el proceso completo de muestras sospechosas de infección micótica para brindar herramientas útiles a todos los profesionales del área de la salud y que estos puedan llevar a cabo diagnósticos precisos y seguimientos completos.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Descripción de las generalidades de los hongos y su trabajo en el laboratorio clínico.
- Ampliar las técnicas de tinción básicas para hongos microscópicos.
- Describir la preparación y características principales de los medios de cultivo más usados en el diagnóstico micológico.
- Describir las características principales para el diagnóstico de las micosis más frecuentes en nuestro país.
- Profundizar en las técnicas para el monitoreo ambiental para prevenir y solucionar contaminación por hongos en áreas limpias.
- Ampliar y actualizar información sobre medios de cultivo y características para el manejo *in vitro* de los hongos.

JUSTIFICACIÓN:

Desde sus inicios y aún en la actualidad, la micología se ha visto desplazada por otros campos de la microbiología en el diagnóstico de enfermedades, sin embargo nuestro país es una zona endémica de múltiples agentes micóticos (algunos de ellos causan infecciones graves en humanos o animales) y en la mayoría de los casos producen enfermedades de evolución larga y de diagnóstico tardado y si no se cuenta con herramientas apropiadas. Derivado de ello, es frecuente que los casos que se atienden en consulta médica de primer nivel, no reciben un diagnóstico certero y muy pocos reciben consultas en otros niveles hospitalarios y por lo general, estos pacientes se reciben con enfermedades en estadios más graves, se compromete el pronóstico del paciente por una infección que en un inicio quizá era fácil de resolver pero que se complicó de forma innecesaria por falta de capacitación del personal de laboratorio. Esta tesis está orientada para contar como un material de apoyo de fácil acceso, entendible y lo más moderno posible ya que la tecnología avanza rápidamente en el diagnóstico de distintas enfermedades tanto virales, parasitarias, bacterianas y micóticas, podemos contar con anexos en donde se refieren técnicas básicas tanto de tinciones, medios de cultivo y el uso básico del microscopio.

INTRODUCCION A LA MICOLOGIA:

HISTORIA DE LA MICOLOGÍA

Los hongos, o las enfermedades que producen estos, se conocen desde la más remota antigüedad; los griegos y los romanos describieron algunas de las manifestaciones clínicas de las dermatofitosis, como el querión y la mentagra (Imagen 1).

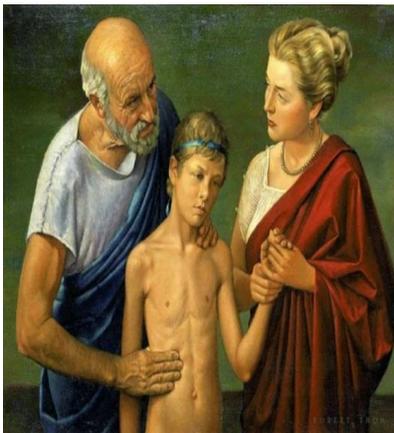


Imagen 1: Hipócrates realizando tacto a un niño. Fuente: (<https://hdnh.es/wp-content/uploads/2018/05/hipocrates-historia-555x420.jpg>)

La micología es una rama de la microbiología y es de las primeras en desarrollarse, los aspectos clínicos de algunas micosis superficiales fueron descritos desde la época de Hipócrates (460-377 a. C.) quien fue el primero en documentar la candidosis pseudomembranosa con el nombre de “afta alba”, lo cual fue corroborado después por Galeno (130-200 d. C.). Celso reconoció la tiña inflamatoria o querión y el favus.



Imagen 2: Pagina del códice de la Cruz Badiano <https://2012profecias mayas fin del mundo.wordpress.com/2014/04/03/codice-de-la-cruz-badiano-tratado-azteca-de-medicina-y-herbolaria/>

También se conocen datos de enfermedades por hongos o de la aplicación terapéutica de estos últimos por el Códice de Martín de la Cruz, manuscrito azteca de 1552 conocido como “*Libellus de medicinabulus indorum herbis*” y que fue traducido al latín por Juan Badiano y devuelto por el Vaticano al país en 1990 (Imagen 2).

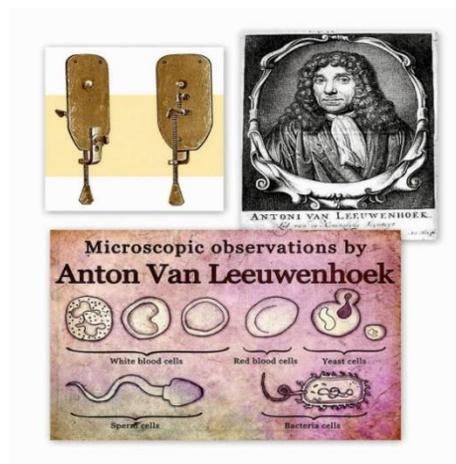


Imagen 3: Antonie Van Leeuwenhoek <https://personajeshistoricos.com/c-cientificos/anton-van-leeuwenhoek/>

Con el invento del microscopio (Antonie Van Leeuwenhoek, 1632-1723) en el siglo XVII, se inició el estudio científico de los hongos microscópicos junto con el de otros microorganismos (Imagen3)



Imagen 4: Pier Antonio Micheli. Fuente: (Moselio Schaechter, 'Pier Antonio Micheli, The father of modern mycology: A paean', *McIlvainea*, 2000.)

En 1729, Pier A. Micheli publicó investigaciones sobre hongos en su obra “*Nova Plantarum*”; a él se debe el término *Aspergillus* (Imagen 4). El conocimiento de la relación entre hongo y enfermedad precedió a la floreciente época bacteriológica desarrollada por Robert Koch y Louis Pasteur.



Imagen 5: Agotino Bassi. Fuente: (<https://bit.ly/2wZ9Zju>)

La historia de la micología médica inició en 1835 con Agostino Bassi (Imagen 5), de origen italiano y alumno de Lazzaro Spallanzani, el fundador de la biología moderna. Descubrió que la muscardina del gusano de seda era producida por un hongo (*Beauveria bassiana*).



Imagen 6: Jean Víctor Audouin Fuente: (<http://science.marshall.edu/fet/euscorpius/images/audoin.gif>)

En 1838, el botánico y entomólogo francés Víctor Audouin (Imagen 6) confirmó las observaciones de Bassi y las publicó.



Imagen 7: Pehr Henrik Malmsten. Fuente: (Public Domain File:Per Henrik Malmsten.jpg Skapades: 1 januari 1874

En 1845, Pehr Hendrik Malmsten (Imagen 7) descubrió el género *Trichophyton* con su más representativa especie *T. tonsurans*.



Imagen 8: J. B. Georg W. Fresenius. Fuente: (Institut für Mikrobiologie und Virologie, Universität Witten-Herdecke, Deutschland)

En 1850, J. B. Georg W.(Imagen 8) Fresenius utilizó por primera vez el término “aspergilosis” para una de las primeras micosis reconocidas en humanos o animales, aunque desde 1815 H. P. Mayer y G. H. Emmert ya habían descrito una infección en los pulmones de un cuervo.



Imagen 9: Johann Lukas Schönlein Fuente: (Dominio público File:Schoenlein.jpg Creado el: hacia 1850 date QS:P,+1850-00-00T00:00:00Z/9,P1480,Q5727902)

En 1839, Johann Lukas Schönlein (Imagen 9) estudió el hongo del favus, aunque se señala que él había sospechado su existencia desde 1827.



Imagen 10: Robert Remak Fuente: (Dominio público File:Robert Remak.jpg Creado el: antes de 1865 date QS:P,+1865-00-00T00:00:00Z/7,P1326,+1865-00-00T00:00:00Z/9)

En 1837, Robert Remak (Imagen 10), judío de origen alemán, descubrió que la tiña fávica era causada por un hongo al cual dio el nombre de *Achorion schoenleinii* en honor a su maestro alemán Schönlein. No se le otorgó el crédito correspondiente, pues hizo sus publicaciones en 1845, en lo que se considera el primer tratado de micología. En 1839, Schönlein estudió el hongo del favus, aunque se señala que él había sospechado su existencia desde 1827. Por estas circunstancias, persisten las controversias acerca de quién es el fundador de la micología dermatológica.



Imagen 11: Bernhard Rudolph Conrad von Lagenbeck Fuente: (Public Domain File:Bernhard von Lagenbeck2.jpg

Created: Unknown dateUnknown date)

En 1839, Bernhard Rudolph (Imagen 11) Conrad von Lagenbeck descubrió una levadura en el algodoncillo, y en 1845 señaló la actinomicosis en seres humanos.



Imagen 12: Pierre Louis Alphée Cazenave <https://www.historiadelamedicina.org/cazenave.html>

En 1840, el famoso dermatólogo Alphée Cazenave (Imagen 12) observó una epidemia de tiña de la cabeza y propuso el nombre de “Herpes tonsurans capillitii”, quizá por la presencia concomitante de lesiones anulares de “Herpes circinatus” (Jean Louis Marc Alibert).



Imagen 13: David Gruby Fuente: (David Gruby, ca. 1880s)

En 1841, David Gruby (Imagen 13), un judío joven y pobre, de Budapest, quien terminó sus estudios de medicina en Viena, aisló el hongo del favus y reprodujo la enfermedad antes que Koch formulara sus postulados; también describió la tiña microscópica y cultivó *Microsporum audouinii*; lo denominó así por el tamaño pequeño de las esporas y en honor a Audouin. Publicó sus descubrimientos en su libro “*Memoire sur une végétation qui constitue la vraie teigne*”. Sus trabajos encontraron la resistencia natural del auge bacteriológico suscitado por Pasteur, pero fueron apoyados por el eminente dermatólogo Ernest Bazin en 1860. En 1842, Gruby presentó el verdadero hongo del algodoncillo (muguet) ante la *Academie de Science* de París; instaló un consultorio con gran éxito social al dedicarse a la medicina y a la magia; entre su clientela se contaba a Chopin, Liszt, George Sand y los Dumas. Nunca fue aceptado verdaderamente por los franceses y fue repudiado por los húngaros. Se ignoraron los trabajos de Remak y Gruby, seguramente por el antisemitismo médico de la época; el último fue rehabilitado posteriormente por Sabouraud, quien lo consideró un dermatólogo mediocre, pero un observador preciso en el microscopio; como prueba de ello, están los dibujos que se conservan en los archivos de parasitología de *la Faculté de Médecine*, de París.



Imagen 14: Carl Ferdinand Eichstedt Fuente: (Gemeinfrei File:Carl Ferdinand Eichstedt.jpg

Erstellt: vor 1892 date QS:P,+1892-00-00T00:00:00Z/7,P1326,+1892-00-00T00:00:00Z/9)

En 1846, Carl Ferdinand Eichstedt (Imagen 14) encontró en las escamas de pitiriasis versicolor un hongo que luego Robin llamó *Microsporum furfur* y, en 1898, Baillon lo clasificó en el género *Malassezia*. En 1874, Louis Charles Malassez identificó el “champignon de la pelade” y en 1884, Bizzozzero lo encontró en Pityriasis simplex y Sabouraud le llamó *Pityrosporum*.

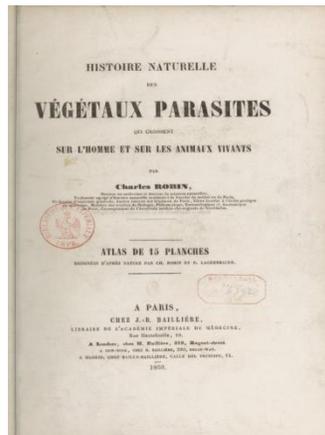


Imagen 15: Histoire naturelle des végétaux parasites Fuente: (LIBRAIRE DE L'ACADÉMIE IMPÉRIALE DE MÉDECINE, Rue Haulereuille, 19, 1853)

En 1853, Charles Robin publicó el libro “*Histoire naturelle des végétaux parasites*” (imagen 15), donde compiló los trabajos sobre dermatofitosis y su tratamiento tópico, así como la depilación en la tiña de la cabeza; a él se debe la clasificación de *Oidium albicans*.



Imagen 16: Mucormicosis Fuente: (A. Bonifaz, J Carrasco-Zuber, et al. Afectación cutánea en las micosis profundas: una revisión de la literatura. Parte II. Micosis sistémicas 2016)

En 1855, Kurchenmeister describió el primer caso de Mucormicosis (Imagen 16), aunque este término fue acuñado hasta 1885 por Paltauf. En la segunda mitad del siglo XIX, la microscopía aplicada a la clínica indujo a los científicos de este periodo a buscar hongos en cualquier trastorno dermatológico. También era la moda mostrar en reuniones académicas lesiones micóticas causadas por autoinoculación de material infectado mediante una técnica ideada por Remak, quien fue el primero en someterse a este experimento con *T. schoenleinii*; en 1862, Heinrich Koebner se inoculó favus y pitiriasis versicolor.



Imagen 17: Raymond Jacques Adrien Sabouraud Fuente: ([http://www.odermatol.com/wp-content/uploads/fig_11j\(2\).jpg](http://www.odermatol.com/wp-content/uploads/fig_11j(2).jpg))

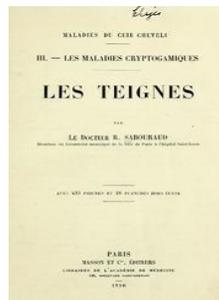


Imagen 18: Les trignes Fuente: (Digitizing sponsor Duke University Libraries, Contributor Duke University Libraries, Language French
Bibliography: p. [813]-846)

En 1890 Jacques, inició el estudio sistemático de las dermatofitosis y en 1910 publicó la enciclopedia “Maladies du cuir chevelu”; el tercer volumen, “Les teignes” (Imagen18) fue el primer manual de micología dermatológica, considerado hoy como un clásico de la medicina y un modelo de la observación científica. En esa época y en la posterior, proliferaron los sinónimos de los hongos; aumentaron de esta manera las especies, a tal grado que la nomenclatura se hizo muy difícil y sobrevino la decadencia micológica, al tiempo que brillaban los trabajos de Pasteur. A finales del siglo XIX y principios del XX, se hicieron grandes descubrimientos, no solo en Europa sino en diferentes partes del mundo.



Imagen 19: Henry Vandyke Carter <https://www.scarborough.co.uk/henry-vandyke-carter/>

En 1860, Vandick Carter (Imagen 19), en la India, describió y acuñó el término “micetoma”, fue un gran médico que luchó porque se aceptara a mujeres en las escuelas de medicina. En 1874, Mc Questin, médico estadounidense, estudió los primeros casos de micetoma de América en Hermosillo, Sonora, México.



Imagen 20: Otto Bollinger. Fuente: (Public Domain File:Otto Bollinger.jpg Created: before 1901 date QS:P,+1901-00-00T00:00:00Z/7,P1326,+1901-00-00T00:00:00Z/9

En 1876, Bollinger (Imagen 20), en Europa, reconoció la actinomicosis como una enfermedad parasitaria. En 1877, Harz encontró *Actinomyces* en la mandíbula de un buey y denominó *Actinomyces bovis* al grano (lesión producida por el agente en el tejido). En 1883, Domenico Majocchi describió el granuloma tricófitico y se dedicó a su estudio durante 40 años. En 1889, Trevisan, en honor a Nocard, creó el género *Nocardia* (Imagen 21) y, en 1890, Eppinger describió la nocardiosis en seres humanos. En 1892, Alejandro Posadas, estudiante de medicina, alumno del patólogo Robert Wernicke, describió en Argentina el primer caso de coccidioidomicosis con motivo de su tesis recepcional.

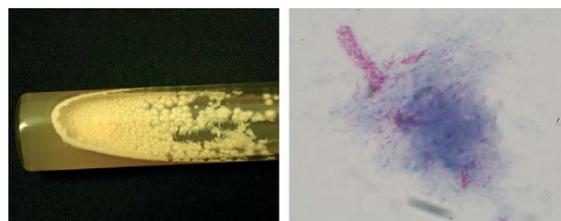


Imagen 21: *Nocardia spp* cultivada en agar Sabouraud y Ziehl Neelsen. Fuente: (<https://www.intramed.net/contenido.asp?contenido=85132>)

En 1894, Busse, y en 1895, Buschke, describieron la criptococosis, y en 1894, Caspar Gilchrist, en la zona de Chicago, hizo lo mismo con la blastomicosis norteamericana. En 1896, Wright señaló al hongo negro *Madurella mycetomii* como agente causal de micetoma.

En 1898, Benjamin Schenck, casi al término de sus estudios de medicina en Rochester, Estados Unidos, definió la esporotricosis y su microorganismo causal. En 1900, Guillermo Seeber, también estudiante de medicina en Argentina, describió la rinosporidiosis. En 1903, De Beurman y Gougerot, en Francia, efectuaron los estudios más importantes sobre esporotricosis y, en 1912, publicaron "*Les sporotrichoses*", monografía clásica basada en el estudio de cerca de 200 casos. Es curioso que siendo los franceses quienes más contribuyeron al conocimiento de esta micosis, no la observen en la actualidad y la consideren enfermedad de importación.



Imagen 22: Samuel Taylor Darling Fuente: Samuel T. Darling at work with his microscope in Ancon Hospital, Panama. Samuel Taylor Darling Memorial Library, Canal Zone.)

En 1905, Samuel Taylor Darling (Imagen 22), durante los primeros trabajos en el Canal de Panamá, describió la histoplasmosis y, en 1934, William De Monbreun cultivó el hongo, demostró su naturaleza dimorfa y reprodujo la enfermedad de modo experimental. En 1908, Lutz, en Brasil, informó el primer caso de paracoccidioidomicosis; a partir de 1909, Adolfo Splendore, médico italiano, inició el estudio del hongo y lo clasificó como levadura. En 1928, Almeida fue quien delimitó en definitiva esta enfermedad y su agente causal. Esta micosis es exclusiva de Latinoamérica y son los brasileños y el grupo de Ángela Restrepo, en Colombia, quienes más han contribuido al conocimiento de esta enfermedad.

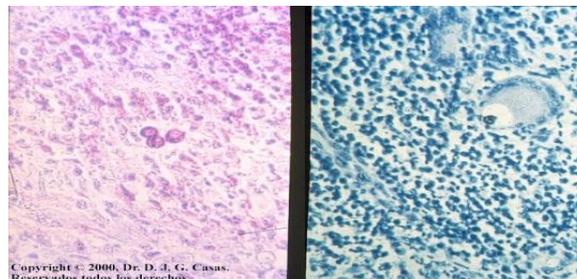


Imagen 23: Cromomicosis corte histológico, organismos con aspecto "grano de café" Fuente: (G. Casas 2000)

En 1911, Pedroso describió en São Paulo la cromomicosis (cromoblastomicosis) y, en 1915, Lane y Mediar llevaron a cabo la primera publicación en Boston. En 1911, Cicero comunicó los

cuatro primeros casos de micetoma en México. El mejor conocimiento clínico de este padecimiento se debe a Latapí quien, además, inició el tratamiento del actinomicetoma con sulfonas en 1947. En 1916, Bruno Bloch, en Suiza, realizó los primeros estudios sobre inmunología de las micosis. Ese mismo año, Chalmers y Archivald precisaron las diferencias etiológicas de actinomicetos y eumicetos en el micetoma. En 1920, Hopkins y Rhoda Benham, de la Columbia University, iniciaron el estudio científico de la micología médica.



Imagen 24: Rhoda Benham Fuente: (Arenas R. 2016)

Rhoda Benham (Imagen 24) se considera la fundadora de la micología médica moderna por sus aportes en patógenesis y filogenia de las infecciones causadas por *Candida*.

En 1923, Berkhout dio fin a muchos errores taxonómicos en las levaduras al crear el género *Cándida*. En 1931, Jorge Lobo, en Recife, Brasil, describió la enfermedad que hoy lleva su nombre. En 1937 Dickson y Gifford estimularon el interés por la epidemiología y la ecología de los hongos al encontrar modalidades benignas y ocultas de coccidioidomicosis.



Imagen 25: González Ochoa y Soto Figueroa Fuente: (Arenas R. 2016)

En 1947, González Ochoa y Soto Figueroa (Imagen 25), en México, aislaron un polisacárido de *Sporothrix* y contribuyeron enormemente al diagnóstico y el estudio inmunológico de esta micosis. En 1950, González Ochoa describió el primer caso de paracoccidioidomicosis en México y demostró que el agente causal penetra por inhalación. En 1958, Gentles, en Inglaterra, descubrió el uso de griseofulvina en dermatitis e inició un gran cambio en la terapéutica antimicótica.

Las bases de la nomenclatura actual fueron establecidas por Langeron (1930) tomando en cuenta los modos de reproducción de los hongos; además, luchó por el uso del latín en el lenguaje micológico. Sus ideas fueron seguidas por los estadounidenses, de tal manera que Norman Conant

y, sobre todo, Chester Emmons (1934) reordenaron la nomenclatura, con lo cual disminuyeron las confusiones.

GENERALIDADES SOBRE LOS HONGOS

A pesar del gran desarrollo de la micología en el siglo XIX y del descubrimiento de los agentes etiológicos de múltiples enfermedades micóticas, los microorganismos causales no fueron separados de las plantas sino hasta 1969, año en que Whittaker los colocó en el reino Fungi (Arenas R., 2008).

De acuerdo con Whittaker, todos los organismos de la naturaleza se clasifican en cinco reinos:

- **Reino Monera:** estos seres son los más antiguos. Son organismos formados por una sola célula (**unicelulares**) y de estructura muy simple. Son los seres vivos más pequeños que existen. En este grupo encontramos las bacterias y algunas algas, también existen bacterias benéficas que encontramos en las raíces de las leguminosas y las perjudiciales, las que producen enfermedades como la gripe, otras.
- **Reino Protista:** los protozoos y las algas unicelulares y pluricelulares pertenecen a este reino. Viven en medios acuáticos o muy húmedos. El plasmodio es un protozoo parásito que produce la malaria.
- **Reino Animal:** son seres pluricelulares. Se alimentan de otros seres, por tanto son heterótrofos.
- **Reino Vegetal:** son organismos formados por más de una sola célula (**pluricelulares**) que realizan la fotosíntesis; gracias a la clorofila captan la energía solar y juntos con las sustancias nutritivas que toman del suelo las transforman en alimento.

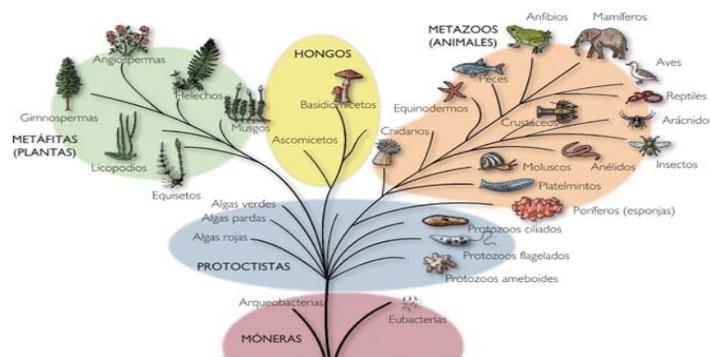


Imagen 26: Clasificación de los 5 reinos según Robert H. Whittaker y Lynn Margulis
<http://angelicienciaatualcancez.blogspot.com/2010/09/importancia-de-la-clasificacion-de-los.html>

REINO FUNGI

Los hongos son organismos eucariotas, que producen esporas, no tienen clorofila, con nutrición por absorción, generalmente con reproducción sexual y asexual; el cuerpo consiste generalmente de filamentos ramificados con pared celular quitinosa.



Imagen 27: Reino fungi. Hongos microscópicos y Macroscópicos <https://slideplayer.es/slide/11091010/>

Constituyen uno de los grupos de organismos más importantes para la vida del hombre, ya que son los responsables de gran parte de la descomposición de la materia orgánica aumentando su disponibilidad en el suelo; pueden ser comestibles, venenosos o psicotrópicos (Imagen 3); algunos son patógenos; otros, producen ciertas sustancias beneficiosas o intervienen en procesos de elaboración de algunos productos comestibles (Tabla 1).



Imagen 28: Hongos macroscópicos comestibles y venenosos de Mexico. <https://ejemplos.net/ejemplos-de-hongos/>

TABLA 1.- Principales hongos con aplicación en productos alimenticios.

Producto	Hongo
Pan	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

	
<p>Vino</p> 	<p><i>Saccharomyces cerevisiae</i>, <i>Botrytis cinérea</i>, <i>Leuconostoc</i></p>
<p>Cerveza</p> 	<p><i>Saccharomyces cerevisiae</i></p>
<p>Queso</p> 	<p><i>Lactobacillus</i>, <i>Streptococcus</i> o <i>Leuconostoc</i></p>
<p>Yogurth</p> 	<p><i>Lactobacillus</i>, <i>Streptococcus</i> o <i>Leuconostoc</i></p>
<p>Encurtidos</p> 	<p><i>Lactobacillus plantarum</i></p>
<p>Vinagre</p>	<p><i>Saccharomyces</i></p>

	
<p style="text-align: center;">Miso</p> 	<p style="text-align: center;"><i>Aspergillus oryzae</i> y <i>Aspergillus sojae</i></p>
<p style="text-align: center;">Salsa de Soja</p> 	<p style="text-align: center;"><i>Aspergillus oryzae</i> y <i>Aspergillus sojae</i>.</p>

GENERALIDADES ESTRUCTURALES DE LOS HONGOS

Aunque se ha fragmentado bastante, aún la mayoría de las especies que originalmente se situaron en el reino Fungi, pertenecen a él todavía y muy probablemente los grupos que han quedado incluidos sean polifiléticos. Aun así, tienen características comunes de organización, nutrición, fisiología y reproducción. Los integrantes de este grupo son generalmente filamentosos, aunque también hay una gran variedad de hongos unicelulares.

Existen hongos con distintas afinidades filogenéticas que encontraron solución a sus requerimientos nutritivos, asociándose simbióticamente con algas. Esta unión, que representa un ejemplo de convergencia fisiológica en el proceso evolutivo, constituye un grupo particular de organismos: los líquenes.



Imagen 29: Liqueenes en madera de Arbol <http://fierasysabandijas.galeon.com/CdSubbetica3/Copia%20de%20liquenverde.htm>

Este tipo de relación entre hongos y algas, se conoce como simbiosis. Este hecho demuestra que los líquenes no pueden constituir un grupo taxonómico natural. La sistemática moderna considera el concepto de líquen como biológico y los clasifica dentro del gran reino de los hongos.

La Micología es la rama de la Biología que tiene por objetivo el estudio de los hongos. Con algunas excepciones, los integrantes del reino Fungi poseen las siguientes características: Son eucariontes, aerobios, macro o microscópicos, heterótrofos, la nutrición la efectúan mediante la secreción de enzimas (exoenzimas) que digieren la materia orgánica antes de ingerirla (absorción) y es almacenada en forma de glucógeno, poseen crestas mitocondriales en placa, membrana celular constituida por ergosterol, quitina como principal componente de la pared celular, la síntesis de la lisina la efectúan por el intermediario ácido alfa-amino-adípico (AAA) y se reproducen por propágulos denominados **esporas**.

Todas esas características contribuyen a que los hongos se encuentren o invadan hábitats muy diversos (son organismos ubicuos) y cumplan una de las funciones más importantes en el ecosistema que es la degradación de material orgánico.

Se han descrito alrededor de 400 000 especies de hongos, pero se considera que puede haber 1.5 billones de ellas (Bonifaz et al., 2016). De toda esta gran biodiversidad, aproximadamente el 10 % constituye el grupo de hongos estudiados dentro de la Micología Médica.

La taxonomía de los hongos que producen enfermedad en el humano ha cambiado, en gran medida debido al rápido desarrollo de técnicas de secuenciación de DNA. El número de especies de hongos potencialmente patógenos ha aumentado de manera importante. Muchas de estas especies forman parte de complejos, y muestran entre ellas diferencias en virulencia y respuesta al tratamiento, por lo que es necesaria la identificación para el manejo adecuado de los pacientes (Guarro. 2012).

CLASIFICACIÓN ACTUAL DE LOS HONGOS

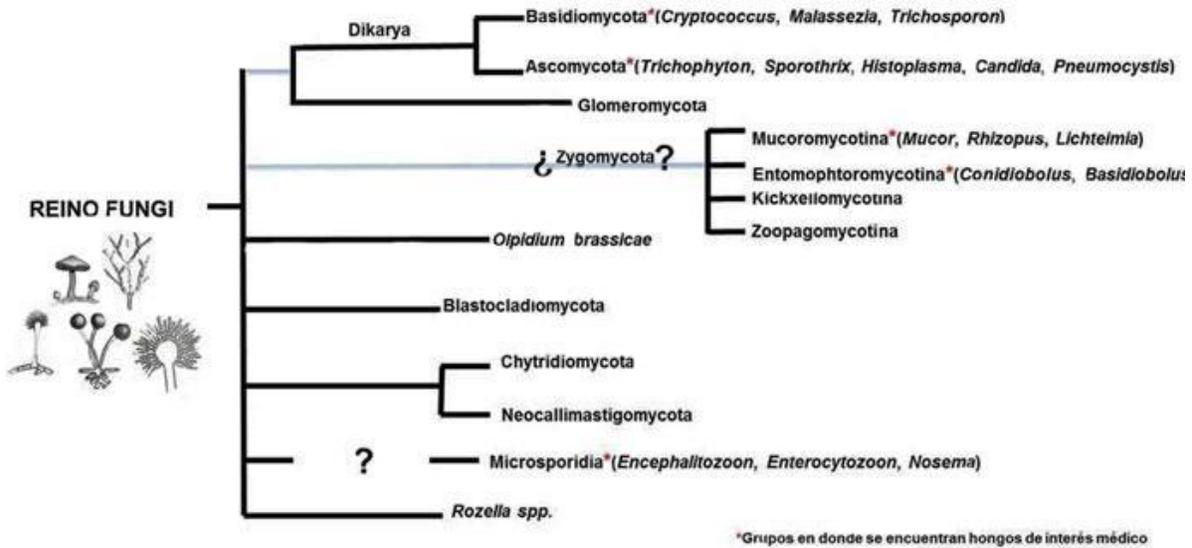


Imagen 30.- El reino fungi. (Castañón L., 2013).

MORFOLOGÍA DE LOS HONGOS.

Los hongos son organismos formados principalmente por dos unidades anatómicas y de crecimiento: la **hifa**, en hongos pluricelulares, y la **levadura**, en hongos unicelulares.

- Las hifas son estructuras cilíndricas que se clasifican en: cenocíticas (aseptadas) o tabicadas (con septos), generalmente multinucleadas. Crecen por el ápice (elongación) y pueden hacerlo en cualquier dirección, incluso dentro del sustrato. Un conjunto de hifas se denomina **micelio** y cuando alcanzan cierto tamaño se dice que forma colonias.

- Las levaduras presentan formas diversas, esférica, ovoide, elipsoidal y cilíndrica; crecen de forma isodiamétrica (sin orden) constituyendo la parte vegetativa y en poco tiempo se reproducen asexualmente por gemación, fisión binaria o fragmentación. Algunas levaduras forman cadenas, estructuras a las que se denomina **pseudohifas** (por lo que la agregación de varias de ellas se conoce como **pseudomicelio**). Las colonias generalmente son poco elevadas y de consistencia suave, cremosa, y su color oscila, en general, entre el blanco - amarillo, aunque algunas contienen pigmentos carotenoides.

En la Micología Médica se consideran los **hongos dimórficos**. Habitualmente, en estos casos, se identifica una forma infectiva, y una forma parasitaria, la primera presente en la naturaleza, la segunda en el hospedero.

REPRODUCCIÓN.

Los hongos, durante la fase vegetativa (de nutrición y crecimiento), son haploides (n) en la mayor parte de su ciclo de vida. El micelio vegetativo crece dentro o sobre el sustrato y absorbe los nutrientes; desarrolla hifas aéreas, las cuales generalmente constituyen la porción más visible de la colonia, y en las que se diferencian hifas fértiles, que son reproductivas y formadoras de **esporas y/o conidios**.

El ciclo de vida inicia con la germinación de una de las esporas, prosigue con el crecimiento en un sustrato, aumenta la biomasa, y termina nuevamente con la esporulación y la diseminación de los propágulos.

La reproducción puede ser asexual (mitosis) o sexual (meiosis), y pueden presentarse simultáneamente. La reproducción sexual inicia con la plasmogamia (fusión de membranas) de dos gametos haploides; se acercan los núcleos y posteriormente ocurre la cariogamia, formando el cigoto diploide (2n) y finalmente ocurre la meiosis para reestablecer la condición haploide; así que 2 núcleos haploides darán lugar a 4 nuevos núcleos recombinados haploides. Esta recombinación genética proporciona grandes ventajas para invadir o resistir en ambientes desfavorables. Algunas especies pueden “retardar” el proceso de meiosis y permanecer en una condición dicariótica (n+n), una forma de resistir condiciones desfavorables, de forma esquemática podríamos escribir: Fase vegetativa haploide --- plasmogamia --- cariogamia --- meiosis --- esporas haploides --- fase vegetativa haploide. Dependiendo del phylum del hongo, las esporas sexuales son producidas en estructuras especializadas como ascas o basidios y son denominadas: **Cigosporas, ascosporas o basidiosporas**.

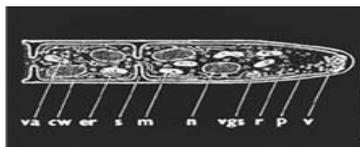


Figura 1. Estructura de hifa. va= vacuolas; pc= pared celular; se= retículo endoplásmico; s= septum; n= núcleo; vgs= mitocondria; m= membrana plasmática; p= plasma; r= ribosomas.



Figura 2. Estructura de una levadura. *Candida* sp. TEM. CW= pared celular; N= núcleo; D= mitocondria; M= membrana plasmática.

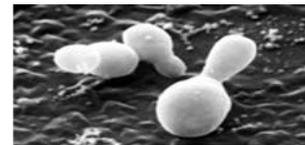


Figura 3. *Malassezia flofii* SEM. Tomado de [1].

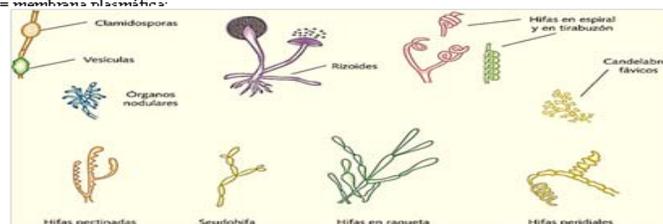


Figura 6: Tipos de hifa. T. Urbaren. Castañon, L. (2013)

Por otra parte, la reproducción asexual solamente incluye: fase vegetativa heteroploide (n, 2n, 4n) --- mitosis—esporas heteroploides --- fase vegetativa heteroploide. La ventaja de este tipo de reproducción es el gran número de esporas que se forman, así como la rapidez con que se lleva a cabo el proceso. Los hongos filamentosos pueden reproducirse por la simple fragmentación de las hifas o mediante la formación de estructuras especializadas (**células conidiógenas** o

esporangios), mientras que las levaduras se reproducen por gemación, fisión binaria o fragmentación. Las esporas de origen asexual se agrupan en: **Conidios** y **esporangiosporas**.

Fuente: (T. Uribarren (2011); **Micología Generalidades**;
http://microypara.facmed.unam.mx/?page_id=773)



Imagen 31: Colonias filamentosas u levaduriformes. Fuente: (T. Uribarren (2011); **Micología Generalidades**;
http://microypara.facmed.unam.mx/?page_id=773)

FACTORES DE VIRULENCIA DE LOS HONGOS.

El curso de las enfermedades micóticas, lo determina la interacción del agente con los diferentes mecanismos de defensa naturales y específicos del hospedero y el medio ambiente.

Las esporas o fragmentos de micelio de un hongo patógeno, pueden permanecer latentes o germinar sobre la superficie del hospedero o si son inhaladas, en los alveolos de los pulmones, las hifas resultantes pueden penetrar los tejidos, colonizarlos, reproducirse y dispersarse, alterando la fisiología del hospedero y causando enfermedad.

En el humano, los sistemas de defensa generalmente son efectivos, ya que la mayoría de los hongos que están en el ambiente, no causan enfermedad. El sistema inmune de los mamíferos involucra factores tanto innatos (complemento, fagocitosis, procesos inflamatorios, quimiotaxis) como adaptativos (células y anticuerpos específicos), cuya principal función es mantenernos limpios de agentes infecciosos; sin embargo, existen situaciones que debilitan esas defensas naturales o adquiridas, haciendo susceptible al hospedero.

Los factores de virulencia serán aquellas “propiedades”, generalmente moléculas, que permiten al hongo causar daño o enfermedad en quien lo hospeda.

El desarrollo o expresión de tales factores, comienza por estímulos externos a la célula fúngica. Esos estímulos activan cascadas de señalización que provocan compuestos protectores (p. ej: enzimas, determinantes antigénicos, receptores), causantes a su vez del desarrollo de la patogénesis. Existe una compleja red de interacciones que incluyen la participación de muchas moléculas, tanto por parte del hospedero como del hongo, que permiten la expresión de diversas vías; el resultado de esa interacción, será evaluado (enfermedad o no) según el nivel de daño causado en el hospedero (Tabla 2).

De las cientos de miles de especies de hongos conocidas hasta la actualidad, únicamente aproximadamente 300 son patógenas para el humano y los animales, en su mayoría los hongos son organismos de vida libre, casi todos crecen en condiciones de elevada humedad, elevada temperatura, pH ligeramente ácido y tención de oxígeno y CO₂ atmosférica, pero de ser necesario algunos se adaptan a las condiciones fisiológicas y logran así invadir los tejidos y convertirse en hongos parásitos.

Tabla 2.- Ejemplos de factores de virulencia de hongos patógenos. Fuente: (T. Uribarren (2011); Micología Generalidades; http://microypara.facmed.unam.mx/?page_id=773)

Agente	Enfermedad	Factor de virulencia	Efecto
<i>Aspergillus</i> spp.	Aspergilosis	“rodlets” (hidrofobinas)	Inhibición de la fagocitosis
<i>Aspergillus</i> spp.	Aspergilosis pulmonar	Gliotoxina	Alentan el movimiento ciliar y lesionan el epitelio de vías respiratorias altas.
Dermatofitos	Tiñas	Queratinasas	Dstrucción del estrato córneo
Dermatofitos	Ides	Toxinas	Hipersensibilidad
<i>Cryptococcus</i>	Criptococosis	Cápsula	Inhibición de respuesta inmune (impide migración de células de la inmunidad y propiedades antifagocíticas)
<i>Cryptococcus</i>	Criptococosis	Producción de melanina	Anti-oxidante, resistencia a anfotericina B
<i>Sporothrix</i> spp.	Esporotricosis linfangítica	Producción de melanina	Inhibe la fagocitosis por macrófagos.
Mucorales	Mucormicosis	Ceto-reductasa	Degradan los cuerpos cetónicos presentes en sangre, favoreciendo el crecimiento y diseminación del hongo.
<i>Malassezia</i> spp.	Pitiriasis versicolor hipocrómica	Ácidos dicarboxílicos	Inhibición de la tirosinasa y de la producción de melanina conllevando una menor protección contra los rayos UV y

			el establecimiento de agentes microbianos dañinos.
<i>Malassezia</i> spp.	Dermatitis seborréica	Fosfolipasas	Destrucción de los ácidos grasos esenciales en la piel causando sequedad
<i>Coccidioides</i> spp.	Coccidioidiomycosis	Elastasas	Destruyen las fibras elásticas de los tejidos.

IMPORTANCIA EN LA MEDICINA:

Los hongos pueden causar en el humano: Hipersensibilidad (**alergias**), infecciones (**micosis**) e intoxicaciones (**micotoxicosis y micetismos**).

Las *alergias* por hongos son padecimientos causados por una reacción de hipersensibilidad del humano hacia esporas o fragmentos de hifas (alérgenos fúngicos). Los cuadros clínicos presentados son cutáneos o gástricos, pero los más comunes son de origen respiratorio.

En general, las *micotoxicosis* se adquieren por consumir alimentos de origen vegetal (especialmente semillas y granos de leguminosas y oleaginosas), sobre los cuales hongos filamentosos crecieron, contaminando al vegetal con metabolitos tóxicos o micotoxinas (producto del crecimiento natural sobre el sustrato). La identificación de micotoxinas en granos almacenados para consumo humano o para animales implica su desecho.

Los micetismos o ingestión de ciertos macromicetos por recreación, equivocación o con objeto de tener una "experiencia mística" es origen de severas intoxicaciones por componentes estructurales del hongo (micetismo).

Las *infecciones* de origen fúngico se denominan micosis y pueden ser superficiales, cutáneas, subcutáneas, sistémicas y oportunistas de acuerdo con el sitio anatómico que afectan o el tipo de infección que produzcan (Tabla 3).

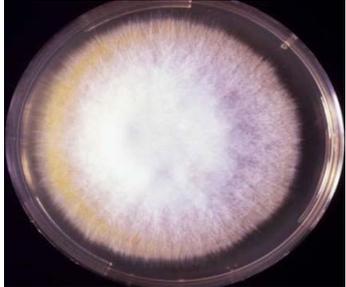
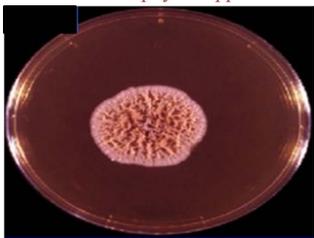
La adquisición de una micosis, depende a menudo de factores predisponentes, tales como edad, ocupación, sexo, zona geográfica, embarazo, quemaduras, inmunodepresión, quimioterapia, radiación, uso de catéteres, procesos malignos o enfermedades metabólicas en las personas. Las formas infectantes se adquieren habitualmente del ambiente, ya sea por contacto directo (dermatofitos) por inhalación (p. Ej: *Coccidioides*) o lesiones de continuidad (*Sporothrix*). Otras, se pueden contraer o provienen de la microbiota normal, como sucede en la micosis oportunista ocasionada por *Candida*.

TABLA 3.- Clasificación clínica de las micosis. Fuente: (T. Uribarren (2011); Micología Generalidades; http://microypara.facmed.unam.mx/?page_id=773.)

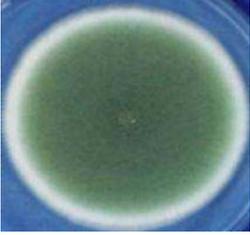
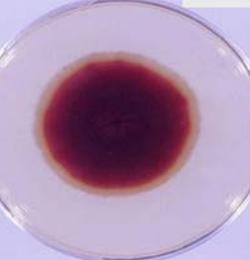
Tipos	Enfermedad	Hongo (Género)
<p>Superficial: Capas externas de piel (epidermis), cabello, uñas, mucosas</p>	<p>Pitiriasis versicolor Tiña negra Dermatofitosis</p>	<p><i>Malassezia</i> <i>Hortaea</i> <i>Trichophyton</i> <i>Microsporium</i> <i>Epidermophyton</i></p>
<p>Subcutáneo: Dermis, tejido subcutáneo y músculo</p>	<p>Eumicetoma Esporotricosis Cromoblastomicosis</p>	<p><i>Madurella</i> <i>Sporothrix</i> <i>Fonsecaea</i></p>
<p>Sistémico o profundo: Uno o más órganos / tejidos profundos</p>	<p>Histoplasmosis Paracoccidioidomicosis Coccidioidomicosis</p>	<p><i>Histoplasma</i> <i>Paracoccidioides</i> <i>Coccidioides</i></p>
<p>Oportunista: Diversos órganos. Topográficamente pueden ser superficiales, subcutáneas o sistémicas, pero son causadas por hongos inoos En un sujeto susceptible, <i>cualquier</i> hongo puede ser un oportunista</p>	<p>Candidosis Criptococosis Zigomicosis</p>	<p><i>Candida</i> <i>Cryptococcus</i> <i>Rhizopus</i></p>

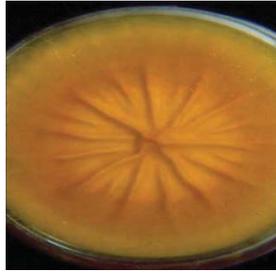
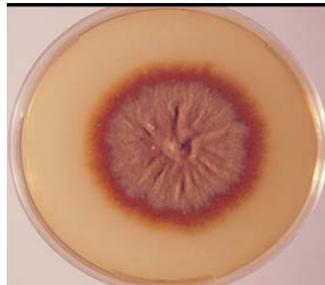
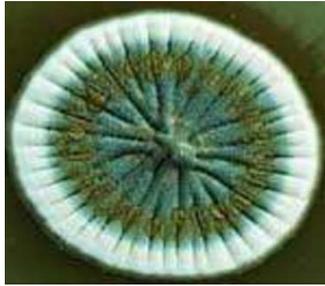
Las respuestas tisulares más frecuentes que inducen los hongos cuando causan una micosis son: Inflamación aguda supurativa, inflamación crónica o inflamación granulomatosa y depende en general del estado de salud del hospedero, del tipo de hongo y del tiempo de progresión de la enfermedad.

MORFOLOGIA:

Aspecto	<p>Algodonosas: <i>Mucor, Rhizopus, Trichophytonrubrum, Alternaria</i></p> <p>Son colonias de tamaño ilimitado (es decir, cubren el total del medio de cultivo), En un inicio son blancas, pero conforme nacen los esporangios, el color de la caja comienza a volverse más oscura; de aspecto veloso-algodonoso. (Bonifaz, 2012. Arenas, 2008)</p> <p>Lanosas: <i>Microsporumcanis</i></p> <p><i>M. canis</i> desarrolla en los medios de cultivo antes mencionados como a colonias de color amarillento, con una superficie pulverulenta en el centro y vellosa en la periferia.</p> <p>Pulvulentas: <i>T. mentagrophytes, M. gypseum</i></p> <p>Crecimiento moderado, de color blanco con difusión de pigmento, la colonia es vellosa, algodonosa o granulosa y plana, en el reverso se observa un color rojo sangre. (Arenas, 2008)</p> <p>Céreas: <i>T. schoeleinii</i></p> <p>Su morfología macroscópica es muy variada en función de las distintas cepas, aunque podemos describir dos tipos básicos: las cepas con morfología de tipo granular y aspecto pulverulento, de color blanquecino o cremoso y bordes desflecados e irregulares, con reverso de color marrón oscuro o rojizo y las cepas con morfología de tipo aterciopelado, con pliegues radiados y circulares y micelio blanco brillante y muy denso que suele virar a rosado en las colonias más viejas, su reverso es de color amarillento a rojizo.</p> <p>Vellosa: <i>Aspergillus, Botrytis</i></p> <p>Son colonias de crecimiento rápido (maduran en 3 días), de crecimiento ilimitado, con tonalidad verde a grisácea, con una textura de granulosa a pulverulenta. (Bonifaz, 2012. Larone, 2011).</p>	 <p><i>Mucor</i> Fuente: (https://atlasdemicologia.wordpress.com/2016/03/17/mucor-spp/)</p>  <p><i>Microsporum canis</i> Fuente: (http://vetlab.blogspot.com/2005/09/microsporum-canis.html)</p>  <p><i>Trichophyton mentagrophytes</i> Fuente: (https://atlasdemicologia.wordpress.com/2016/03/28/trichophyton-spp/)</p>  <p><i>Trichophyton schoeleinii</i> Imagen 12: Fuente: (https://es.slideshare.net/guestf5ea7e/d-e-r-m-a-t-o-f-i-t-o-s)</p>  <p><i>Aspergillus spp.</i> Fuente: (https://atlasdemicologia.wordpress.com/2016/06/2/aspergillus-spp/)</p>
---------	--	---

Aspecto de las colonias:

	<p>Aterciopelada: <i>Penicillium</i></p> <p>Las colonias de <i>Penicillium</i> (diferentes de <i>Penicillium marneffeii</i>) son de crecimiento rápido, filamentosas y vellosas, lanosas o de textura algodonosa. Son inicialmente blancas y luego se convierten en verde azuladas, gris verdosas, gris oliva, amarillentas o rosadas con el tiempo. El reverso de la colonia es pálido o amarillento.(Bonifaz, 2012)</p>	 <p><i>Penicillium spp.</i> Fuente: (https://www.fba.org.ar/panel-gestion/InformeResultado/MI/mi31.pdf)</p>
<p>Color del micelio aéreo o reproductivo.</p>	<p>Blanco: <i>Mucor, Rhizopus, T. rubrum</i></p> <p><i>Rhizopus</i> Son colonias de rápido crecimiento, las especies patógenas tienden a crecer mejor a 37°C, su crecimiento se inhibe con Cycloheximidaz. (Larone, 2011). Son de tamaño ilimitado (llegan a cubrir todo el medio de cultivo), Son colonias blancas, al alcanzar la madurez (cuarto día) comienzan a adquirir una tonalidad gris oscura (la tonalidad se debe al desarrollo de las estructuras de reproducción asexual las Endosporas), Son vellosas algodonosas y secas. (Bonifaz, 2012).</p> <p>Violeta intenso: <i>T. violaceum</i></p> <p>Crecimiento moderado, de color blanco con difusión de pigmento, la colonia es vellosa, algodonosa o granulosa y plana, en el reverso se observa un color rojo sangre. (Arenas, 2008) en el cual se observa la difusión de pigmento mas marcada; las colonias blancas, vellosas, de color blanco (con el tiempo se vuelven rosas). (Tangarife, 2011).</p> <p>Tonos Beige o amarillos: <i>Aspergillus</i></p> <p>Morfología de <i>A. fumigatus</i>. Colonia plana, de aspecto aterciopelado, de color verde olivo con la periferia con un halo claro. El estudio microscópico teñido con azul de algodón permite visualizar cabezas aspergiliares con fiálides que sólo ocupan la parte superior de la vesícula, las conidias son incoloras y miden 2 a 3 µm.(Méndez Tovar.2014)</p> <p>Tonos verde azulados: <i>Penicillium</i></p> <p>Las colonias de <i>Penicillium</i> son de crecimiento rápido, filamentosas y vellosas, lanosas o de textura algodonosa. Son inicialmente blancas y luego se convierten en verde azuladas, gris verdosas, gris oliva, amarillentas o rosadas con el tiempo. El reverso de la colonia es pálido o amarillento.(Arenas 2008)</p>	 <p><i>Mucor spp.</i> Fuente: (Bonifaz 2012)</p>  <p><i>Trichophyton violaceum</i> Fuente: (Tangarife 2011)</p>  <p><i>Aspergillus spp.</i> Fuente: (Mendez Tovar 2014)</p>  <p><i>Penicillium spp.</i> Fuente: (Arenas 2008)</p>
<p>Difusión de pigmentos: en general al comenzar a crecer los hongos producen pigmentos de color amarillo cafésoso, que puede difundir al medio y se observan en el reverso de la colonia.</p>	<p>Pigmento rojo vinoso: <i>T. rubrum</i></p> <p>Crecimiento moderado, de color blanco con difusión de pigmento, la colonia es vellosa, algodonosa o granulosa y plana, en el reverso se observa un color rojo sangre. (Arenas, 2008).</p>	

	<p>Amarillo anaranjado:</p> <p><i>M. canis</i></p> <p>Colonias de crecimiento moderado de 6 a 10 días, blanco-amarillentas, vellosas, planas, radiadas o lanosas; el reverso suele ser amarillo oscuro. (Arenas, 2008. Larone, 2011)</p>	<p><i>Trichophyton rubrum</i> Fuente: (Arenas 2008)</p>  <p><i>Microsporium canis</i> (Larone 2011)</p>
Topografía	<p>Aplanada</p> <p><i>Fusarium sp</i></p> <p>El género <i>Fusarium</i> es un grupo de hongos filamentosos ampliamente distribuidos en el suelo y plantas. Debido a su capacidad de crecer a 37°C, son considerados oportunistas. Pueden causar infecciones sistémicas en pacientes inmunocomprometidos, con una alta mortalidad. Fuente: (Piontelli, E. Manual de Microhongos filamentosos comunes I. 2011; 1: 261-80[En línea] recuperado de http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182014000100012)</p> <p>Crateriforme, Cerebriforme</p> <p><i>Trichophyton tonsurans</i></p> <p>Se realiza en medios habituales, agar Sabouraud-dextrosa, su aspecto es aterciopelada y mullida, presentando una elevación central o con pliegues radiales concéntricos (crateriforme) o irregulares (cerebriforme) Fuente:(Arenas, 2008. Larone, 2011)</p> <p>Umbonada</p> <p><i>Penicillium sp</i></p> <p>Las colonias de <i>Penicillium</i> son de crecimiento rápido, filamentosas y vellosas, lanosas o de textura algodonosa. Son inicialmente blancas y luego se convierten en verde azuladas, gris verdosas, gris oliva, amarillentas o rosadas con el tiempo. El reverso de la colonia es pálido o amarillento.(Arenas 2008)</p>	 <p><i>Fusarium sp</i> Fuente:(Piontelli, E. Manual de Microhongos filamentosos comunes I. 2011; 1: 261-80[En línea] recuperado de http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182014000100012)</p>  <p><i>Trichophyton tonsurans</i> Fuente:(Arenas, 2008. Larone, 2011)</p>  <p><i>Penicillium sp</i> (Arenas 2008)</p>

	<p style="text-align: center;">Rugosa <i>Fusarium sp</i></p> <p>De las más de 100 especies de <i>Fusarium</i> descritas, sólo 12 de ellas pueden considerarse patógenas para el humano, entre ellas destacan <i>F. solani</i>, <i>F. oxysporum</i> y <i>F. verticilloides</i>, en orden decreciente de frecuencia..Fuente: (Piontelli, E. Manual de Microhongos filamentosos comunes I. 2011; 1: 261-80[En línea] recuperado de http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182014000100012)</p>	 <p><i>Fusarium sp</i> Fuente:(Piontelli, E. Manual de Microhongos filamentosos comunes I. 2011; 1: 261-80[En línea] recuperado de http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182014000100012)</p>
--	---	---

BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO

Las normas de bioseguridad para el laboratorio son reglas básicas de comportamiento destinadas a prevenir factores de riesgo laborales procedentes de agentes biológicos, físicos o químicos. El personal de los laboratorios debe incorporar estas normas en todos los procesos que se realicen en el laboratorio que lo pongan en contacto con algún tipo de reactivo, microorganismo o sustancia que pueda ser nocivo para la salud.

Las normas de bioseguridad no eliminan el riesgo de un accidente; están elaboradas para prevenir posibles accidentes en el laboratorio. Su conocimiento disminuye significativamente la probabilidad de que ocurra un accidente y establece los procedimientos a seguir en caso de que éste ocurra.

En México las Normas Oficiales Mexicanas básicas que regulan los procedimientos en bioseguridad en los laboratorios son:

- NOM-087-ECOL-SSA1-2002 que establece los lineamientos para la separación, envasado, almacenamiento, recolección, transporte, tratamiento y disposición final de residuos peligrosos, biológico-infecciosos (RPBI).
- NOM-059-SSA1-2013 que está dedicada a las buenas prácticas de fabricación de medicamentos pero establece conceptos importantes y varios procedimientos en materia de bioseguridad.
- NOM-007-SSA3-2011 para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos.

PRINCIPIOS DE LA BIOSEGURIDAD

Los principios de bioseguridad son universales: aplican a todo el personal del laboratorio. Implican la utilización de barreras físicas que se interpongan al contacto directo con materiales potencialmente nocivos a la salud, mediante el empleo de guantes, cubrebocas, goggles, mascarillas

de plástico, etc. Comprenden el conjunto de dispositivos y procedimientos para la eliminación segura de material químico tóxico y material biológico contaminante.

Condiciones físicas del laboratorio

- a) Los laboratorios deben tener techos, paredes y suelos fáciles de lavar, resistentes a la acción de sustancias químicas y productos desinfectantes. Los suelos deben ser antideslizantes.
- b) Las superficies de trabajo deben ser impermeables y resistentes a los ácidos, álcalis, disolventes orgánicos y al calor moderado.
- c) La iluminación debe ser adecuada, suficiente y que no produzca reflejos.
- d) Los espacios entre mesas, armarios, campanas y otros muebles deben ser lo suficientemente amplios para facilitar la limpieza.
- e) El espacio designado para el lavado y almacenamiento de material debe ser separado del espacio para trabajo.
- f) En cada laboratorio debe haber lavamanos, con agua corriente, instalados preferiblemente cerca de la salida.
- g) Se debe prever un espacio para manejar y almacenar disolventes y reactivos químicos particularmente tóxicos (ácidos, álcalis).
- h) Los laboratorios deben tener una ducha de fácil acceso y que funcione en caso de accidentes que comprometan una importante región del cuerpo.
- i) Los laboratorios deben contar con un lavaojos.
- j) En cada laboratorio debe haber mínimo un extintor de incendios en el cual se podrá leer claramente la fecha de la última recarga y la fecha en que debe ser recargado nuevamente. Dicho elemento debe estar al alcance del personal en caso de incendio. Así mismo debe haber un sistema de detección de humos y/o fuego con alarma.
- k) Debe haber un botiquín y un manual de primeros auxilios por laboratorio.

REGLAMENTO GENERAL DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO

1. Reconocer que la salud del personal es lo más importante.
2. Limpiar y desinfectar las superficies de trabajo al iniciar y finalizar la jornada de trabajo.
3. Está prohibido comer, beber, fumar y/o almacenar comida dentro del área de trabajo.
4. Mantener el cabello corto o recogido.
5. No pipetear sustancia alguna con la boca. En lugar de ello utilizar peras de plástico o pipetas automáticas.
6. Los tubos que se introduzcan a la centrífuga deben ir tapados; no se debe detener manualmente la centrífuga ni destaparla antes de que cese de girar.
7. Evitar contacto con agujas y elementos corto-punzantes.
8. No permitir la entrada de personas ajenas al laboratorio y/o que no tengan sus implementos de bioseguridad adecuados.
9. Cualquier accidente, por pequeño que sea debe comunicarse al responsable del laboratorio.
10. Todos los desechos biológicos, ya sean líquidos o sólidos, tienen que ser descontaminados por el personal del laboratorio antes de su recolección y eliminación por personal especializado.

11. Todos los desechos químicos tóxicos deben almacenarse en contenedores debidamente etiquetados y mantenidos en un lugar especificado del laboratorio, mientras son removidos del área por personal especializado.

ATENCIÓN DE DERRAMES Y ACCIDENTES

1. Cuando se produzca un DERRAME DE MATERIAL POTENCIALMENTE INFECTANTE, el operador deberá ponerse guantes de hule y cubrir el fluido derramado con papel absorbente, derramar alrededor de éste, una solución de hipoclorito de sodio al 1 %, y luego verter la misma solución sobre el papel absorbente y dejar actuar por 10 min.

Durante todo el proceso de desinfección el operador y personal que lo asiste de usar guantes de hule y evitar el contacto con el material derramado y desinfectado.

2. Usando papel absorbente seco y limpio levantar el material y arrojarlo al recipiente de desechos contaminantes para su posterior recolección por los Servicios Generales y su posterior eliminación.

3. Finalmente, la superficie afectada deberá ser lavada con una solución de hipoclorito de sodio al 1 %. No se recomienda el uso de alcohol ya que se evapora rápidamente y coagula los residuos orgánicos superficiales sin penetrar en ellos.

4. En caso de contaminación de la piel por salpicadura de materiales potencialmente infectantes, lavar la zona afectada con abundante agua y jabón. En caso de herida punzante, se deberá favorecer el sangrado de la herida y luego buscar atención médica.

5. QUEMADURAS pequeñas producidas por derrame de material caliente se tratan lavando la zona afectada con chorro de agua fría o con agua y hielo durante 10-15 min. Se pueden aplicar compresas y crema para aliviar el ardor y la tirantez de la piel.

6. QUEMADURAS más graves requieren de atención médica inmediata. Mientras llega la asistencia médica cubrir la quemadura grave con una gasa gruesa para aislarla del aire.

7. En caso de accidentes en el laboratorio que comprometan los OJOS, lavarlo inmediatamente con agua corriente durante un mínimo de 10 min. Es necesario mantener los ojos abiertos con la ayuda de los dedos para facilitar el lavado debajo de los párpados. NO FROTAR LOS OJOS NUNCA. Acudir al médico inmediatamente por leve que parezca la lesión.

8. Ante un posible ENVENENAMIENTO de cualquier tipo, buscar asistencia médica de inmediato. Si la persona está inconsciente ponerlo con la cabeza de lado, taparlo con manta para que no se enfríe. No provocar el vómito si el producto ingerido es corrosivo.

Cualquiera que sea el producto ingerido, dar un litro de agua para disminuir la concentración del tóxico, con claras de huevo que crean una película protectora en la mucosa gástrica.

9. En caso de INHALACIÓN de productos químicos conducir a la persona a un sitio con aire fresco.

NIVELES DE BIOSEGURIDAD DE LOS LABORATORIOS PARA TRABAJAR CON MICROORGANISMOS INFECTANTES POR GRUPOS DE RIESGO.

Las designaciones del nivel de bioseguridad de los laboratorios se basan en una combinación de las características de diseño, construcción, medios de contención, equipo, prácticas y procedimientos de operación necesarios para trabajar con agentes patógenos (microorganismos infectantes) de los distintos grupos de riesgo.

Se reconocen 4 grupos de riesgo de los patógenos que se describen brevemente a continuación.

GRUPO DE RIESGO I (BSL-I)

Este grupo representa escaso o nulo riesgo individual y comunitario. Se refiere a microorganismos que tienen pocas posibilidades de provocar enfermedades humanas o animales.

EJEMPLOS DE HONGOS QUE SE CLASIFICAN EN BSL I- *Sacharomyces cerevisiae*, *Penicillium roqueforti*.

GRUPO DE RIESGO II (BSL-II)

Este grupo representa un riesgo individual moderado y riesgo comunitario bajo. Se refiere a agentes patógenos que pueden provocar enfermedades humanas o animales, pero que tienen pocas probabilidades de constituirse en un riesgo grave para el personal del laboratorio, la comunidad, el ganado o el medio ambiente. La exposición en el laboratorio a estos agentes puede provocar una infección grave. Se dispone de medidas eficaces de tratamiento y prevención. El riesgo de propagación es limitado.

Ejemplos de hongos que se clasifican en BSL II- *Aspergillus spp*, *Candida spp*, *Cryptococcus neoformans*, Dermatofitos, *Pneumocystis jirovecii*, *Sporothrix schenckii*.

GRUPO DE RIESGO III (BSL III)

Este grupo representa un riesgo individual elevado y riesgo comunitario bajo. Se refiere a agentes patógenos que suelen provocar enfermedades humanas o animales graves, pero que no se propagan de un individuo infectado a otro. Se dispone de medidas eficaces de tratamiento y prevención.

Ejemplos de hongos que se clasifican en BSL III- *TBC*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides posadasii*, *Paracoccidioides brasiliensis*.

GRUPO DE RIESGO IV (BSL IV).

Este grupo representa un riesgo elevado individual y comunitario. Se refiere a agentes patógenos que suelen provocar enfermedades graves en las personas o en los animales y que pueden propagarse fácilmente de un individuo a otro, directa o indirectamente y no suele disponerse de medidas eficaces de tratamiento o prevención. Todos los patógenos emergentes o de reciente descubrimiento deben manejarse con Nivel de Contención IV hasta tipificarlos adecuadamente.

Ejemplos de hongos que se clasifican en BSL IV- NO HAY HONGOS CLASIFICADOS PARA ESTE NIVEL

CLASIFICACIÓN DE LAS INSTALACIONES DE TRABAJO EN LABORATORIOS QUE MENEJAN RPBI.

La relación que existe entre los grupos de riesgo de microorganismos patógenos y el nivel de bioseguridad de los laboratorios requerido para su manipulación experimental se indica a continuación:

1. GRUPO DE RIESGO I/NIVEL DE BIOSEGURIDAD 1/BÁSICO

El trabajo de investigación o de enseñanza (técnicas microbiológicas apropiadas) en mesas de laboratorio al descubierto, sin el requerimiento de ningún equipo de seguridad.

2. GRUPO DE RIESGO II/NIVEL DE BIOSEGURIDAD 2/BÁSICO

El trabajo de investigación (técnicas microbiológicas apropiadas) se realiza en mesas al descubierto y/o cámara de seguridad biológica [en caso del riesgo que se produzcan aerosoles]. Se requiere de ropa protectora y la indicación a la entrada del laboratorio de riesgo biológico.

3. GRUPO DE RIESGO III/NIVEL DE BIOSEGURIDAD 3/CONTENCIÓN

El trabajo de investigación o para diagnósticos especializados requiere de ropa especial, acceso controlado y flujo direccional del aire. Deben emplearse cámaras de seguridad biológica además de otros medios de contención primaria para todas las actividades.

4. GRUPO DE RIESGO IV/NIVEL DE BIOSEGURIDAD 4/CONTENCIÓN

Implica el trabajo con unidades de patógenos peligrosos que obliga al uso de cámaras de seguridad biológica clase III o trajes presurizados junto con cámaras de seguridad biológica clase II y uso de aire filtrado. El laboratorio mismo es una cámara de entrada con cierre hermético y salida con ducha y eliminación especial de residuos.

RECOLECCIÓN DE RESIDUOS BIOLÓGICOS, QUÍMICOS Y MATERIAL PUNZO-CORTANTE.

Los Servicios Generales del Instituto son responsables de contratar una empresa de aseo especializada y conjuntamente con ella elaborar una estrategia (diagrama de flujo o ruta sanitaria interna) para la recolección y desecho de material químico y biológico en toda la Institución, de manera ordenada y segura, para prevenir riesgos a la salud del personal del Instituto así como para prevenir el riesgo sanitario y ambiental del municipio en el que se localiza el Instituto. Esta

compañía deberá proveer de las bolsas de plástico con código de colores (según el tipo de material a desechar) así como de contenedores de plástico para el desecho de material punzo- cortante, sustancias químicas tóxicas así como líquidos biológicos, establecer el tiempo de permanencia de los residuos peligrosos en los sitios de generación y la frecuencia de la recolección interna según la naturaleza de los residuos generados.

Es importante señalar que existen mecanismos de contención y bioseguridad (además de los sistemas para eliminación en laboratorio clínico) por ejemplo, el uso de refrigeradores y congeladores que disminuyen el metabolismo de los microorganismos, minimizando la capacidad infectiva y la posibilidad de transmisión, liofilizadoras que permiten preservar cepas de microorganismos de forma más controlada y almacenarlas en espacios reducidos, hornos y autoclaves para inactivación inmediata de residuos y las cabinas de seguridad que poseen luz UV y controlan así el flujo de microorganismos en el ambiente. Es importante conocerlos y utilizarlos de manera constante en el trabajo con hongos pues una de las vías más comunes para el establecimiento de infecciones micóticas es la vía aérea.

Material:

Por persona:

- 1.- Bata Blanca
- 2.- Plumón Indeleble
- 3.- Guantes de Látex
- 4.- Lentes de Seguridad

Por Equipo:

- 1.- Muestra de alimento contaminado con hongos Y CEPAS DE HONGOS CONOCIDOS
- 2.- Sistema de Microcultivo
- 3.- 1 Tubo con 10mL de agua destilada CON GLICERINA AL 10%
- 4.- Portaobjetos
- 5.- Benzal (Cloruro de Benzalconio)
- 6.- Cubreobjetos
- 7.- Asa Bacteriológica EN "LOOP"y en L
- 9.- Pinzas
- 10.- Bisturí con Hojas ESTÉRIL

11.- Mechero Bunsen

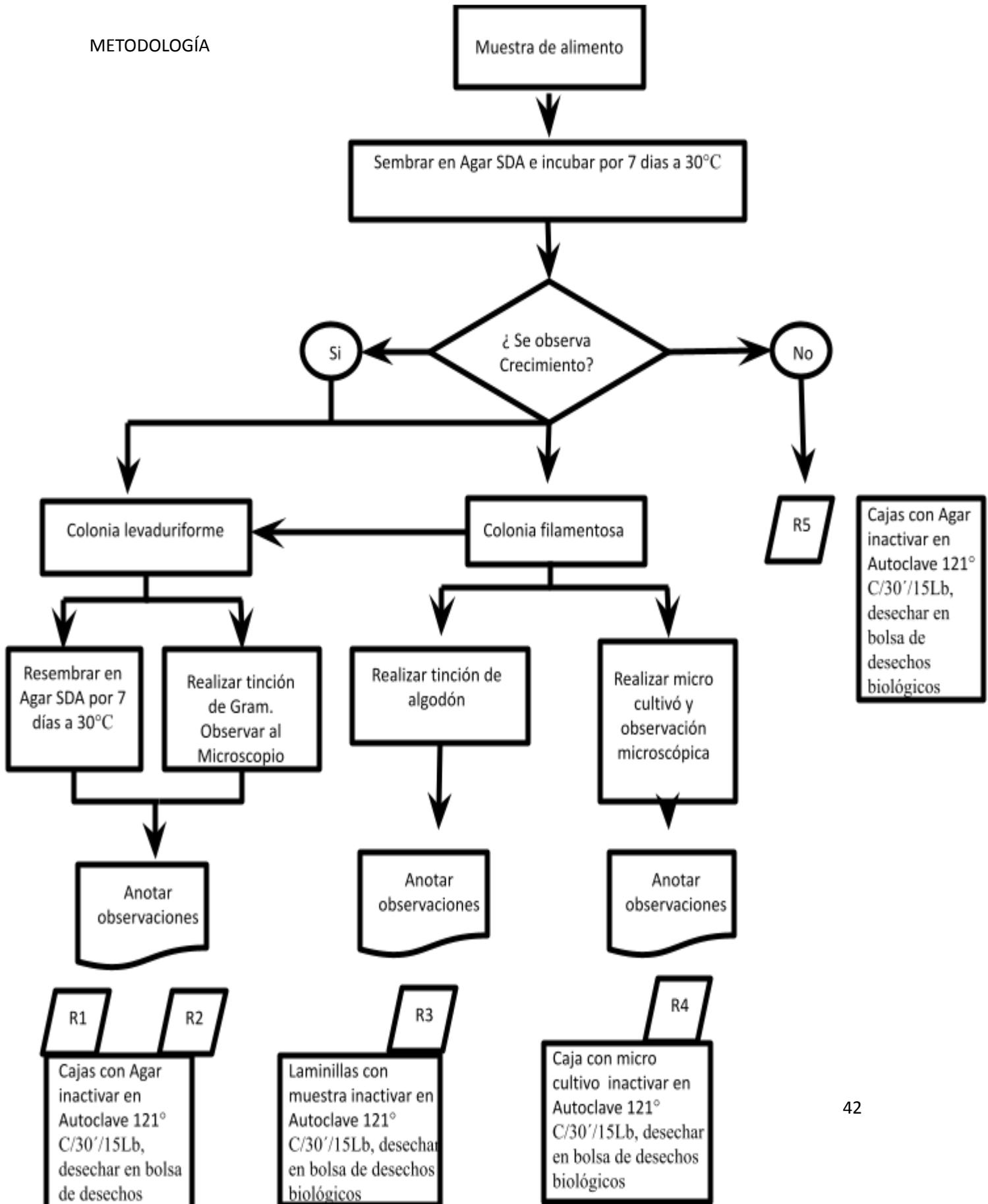
12.- Colorante Azul de Algodón Lactofenol

13.- Reactivos de tinción de Gram

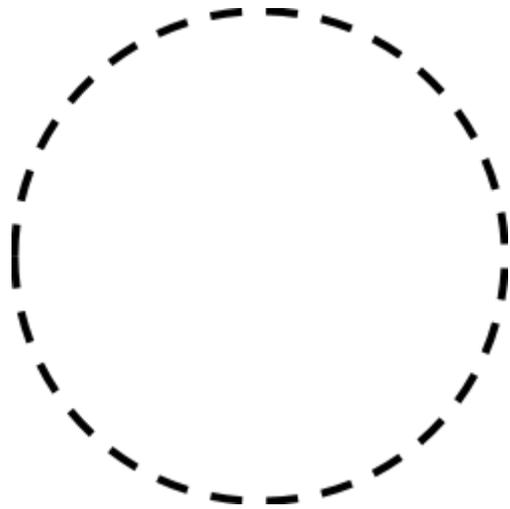
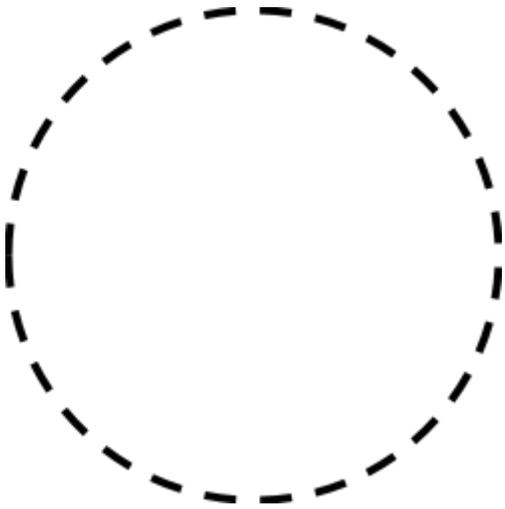
14.- Cultivos con Agar Dextrosa Sabouraud de distintos hongos

15.- Cepas a utilizar: *Cándida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Rhodoturula rubra*, *Mucor* spp. y *Aspergillus flavus*

METODOLOGÍA



Resultados:



CONCLUSIONES:

Glosario:

Artroconidio: Conidio tálico originado por fragmentación de las hifas.

Asca: Estructura en forma de saco que contiene ascosporas en los hongos del *phylum Ascomycota*.

Ascomycete. Hongo perteneciente al *phylum Ascomycota*, y que se caracteriza por formar ascosporas en su fase de reproducción sexual.

Ascospora. Estructura de reproducción sexual formada por los *Ascomycetes*.

Basidio. Estructura en forma de mazo a partir de la cual se originan las basidiosporas en los hongos del *phylum Basidiomycota*.

Basidiomycete. Hongo clasificado en el *phylum Basidiomycota*, y que se caracteriza por formar basidiosporas en su fase de reproducción sexual.

Basidiospora. Espora de reproducción sexual de los hongos del *phylum Basidiomycota*.

Cápsula. Capa de mucopolisacáridos presente en el exterior de la pared de algunos hongos como *Cryptococcus spp.*

Cigospora (zigospora). Estructura de reproducción sexual presente en los hongos del *phylum Zygomycota* (actualmente *subphylum Mucoromycotina*).

Clamidoconidio (clamidospora). Estructura de origen asexual, considerada de resistencia, limitada por una pared celular gruesa, generalmente de forma esférica que desarrollan algunos hongos como *Candida albicans*.

Cleistotecio. Estructura redonda y cerrada que desarrollan los hongos del *phylum Ascomycota*; en su interior se forman ascas con ascosporas.

Conidio. Estructura de origen asexual, generalmente formado en el ápice o a un lado de la célula conidiógena. Se forma sobre todo en hongos mitospóricos.

Conidióforo. Hifa simple o ramificada cuya función es producir y sostener las células conidiógenas y/o conidios.

Coremio (sinema). Agrupación de hifas conidiógenas dispuestas paralelamente presentes en algunos hongos como *Sporothrix spp*, *Scedosporium* y *Penicillium claviforme*.

Dematiáceo. Hongo con pigmento de tipo melánico en su pared celular.

Espora. En micología médica se utiliza este término para referirse a una estructura de reproducción sexual producida por los hongos meiospóricos (*ascospora*, *basidiospora*, *zigospora*). También se denominan esporas a las estructuras asexuales contenidas en el esporangio de los mucorales.

Estípite (tallo). Conjunto de hifas dispuestas en forma paralela que forman las estructuras de soporte de los macromicetos.

Examen directo. Técnica de microscopía de luz utilizada para observar estructuras fúngicas en los especímenes clínicos o de cultivo.

Fúngico(a). Adjetivo que hace referencia a hongo.

BIBLIOGRAFÍA:

- Ainsworth, GC. Hawksworth, DL. Kirk, PM. Et al. (1995). Ainsworth Bisby's Dictionary of the Fungí, UK. CAB International.
- Arenas Guzmán, R. (2011). Micología médica ilustrada. Clínica, laboratorio y terapéutica. México. Editorial Interamericana McGraw Hill.
- Bonifaz Trujillo, A. (2010). Micología médica básica. México. Editorial Interamericana McGraw Hill.
- Brown GD, Denning DW, Gow NA, (2012) et al. [Hidden killers: human fungal infections](#). Sci Transl Med.19;4(165):165rv13.[En línea] recuperado de DOI:[10.1126/scitranslmed.3004404](#)
- Du Toit, A. (2017). Uncovering new drugs and targets. Nat1 Rev Microbiol. 15(1):1. doi:10.1038/nrmicro.2016.179
- Ellis, D. & Kidd, S. (1998). Mycoses. Clinical Groupings for Fungal Infections. The University of Adelaide. [En línea] consultado en <https://bit.ly/2vnYHoo> el 28/12/2019.
- Evans, EGV. & Richardson, MD. (1989). Medical Mycology. A practical approach. EUA. IRL Press.
- Gómez BL(2014). [Molecular diagnosis of endemic and invasive mycoses: advances and challenges](#). Rev Iberoam Micol.31(1):35-41. [En línea] recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.09.009>.
- Guarner J, Brandt ME. [Histopathologic diagnosis of fungal infections in the 21st century](#). Clin Microbiol Rev. 2011 Apr;24(2):247-80.[En línea] recuperado de DOI:[10.1128/CMR.00053-10](#)
- Guarro J (2012). [Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos](#). Enferm Infecc Microbiol Clin, 30(1):33-9.
- Hawksworth, DL. (1995). Steps along the road to a harmonized bionomenclature, Taxon 44: 447-56. [En línea] recuperado de DOI:10.2307/1223430 el 26/12/2019.
- Herrera, T. & Ulloa, M. (1990) El reino de los hongos. Micología básica y aplicada. México. UNAM. Fondo de Cultura Económica.
- Hibbett DS, Binder M, Bischoff F, et al (2007). [A higher-level phylogenetic classification of the Fungi](#). Mycol Res;111(Pt 5):509-47.[En línea] recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.03.004>
- Hibbett, DS. Binder, M. Blackwell, M. et al. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the fungi. Mycol Res 111(5):509-547. [En línea] recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.03.004> el 26/12/2019.

- Juárez-Montiel M, Ruiloba de León S, Chávez-Camarillo G, et al (2011). [El huitlacoche \(tizón del maíz\), causado por el hongo fitopatógeno Ustilago maydis, como alimento funcional](#). Rev Iberoam Micol;28(2):69-73.[En línea] recuperado de ID: ibc-129017
- Kwon-Chung. KJ, Bennet. JE. (1992). The fungi. In Medical Mycology. Lea & Febiger. Philadelphia. Lea & Febiger.
- Lanternier F, Cypowyj S, Picard C, et al (2013). [Primary immunodeficiencies underlying fungal infections](#). Curr Opin Pediatr;25(6):736-47.[En línea] recuperado de doi: [10.1097/MOP.0000000000000031](https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000000031).
- Lehmann PF. (1998). Fungal structure and morphology. In: Medical Mycology. Ajello L & Hay RJ (eds) Topley & Wilson. New York. Oxford University Press, Inc.
- López-Martínez R. I.(2008) [Introducción Importancia actual de la micología médica en México](#). Gac Med Mex 144 (2).
- López-Martínez, R. Méndez-Tovar, LJ. Hernández-Hernández, F. et al. (2004). Micología Médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio. México. Editorial Trillas.
- López-Martínez, R. Méndez-Tovar, LJ. Manzano-Gayosso, P. et al. (2009). Principios de Micología Médica. Clínica, diagnóstico y Terapéutica. México. Méndez Editores.
- McLaughlin DJ, Hibbett DS, Lutzoni F (2009) [The search for the fungal tree of life](#). Trends Microbiol; 17(11):488-497. [En línea] recuperado de DOI:[10.1016/j.tim.2009.08.001](https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.08.001)
- Méndez-Tovar LJ, Anides-Fonseca A, Vázquez-Hernández A, et al (2006) [Micosis observadas en cinco comunidades mexicanas con alto grado de marginación](#). Gac Med Mex; 142 (5). PDF.
- Rippon, JW. (1988) Characteristics of fungi. In Medical Mycology. The pathogenic fungi and the pathogenic Actinomycetes. EUA. Saunders Company
- The Tree of Life web project. (1995). Explore the Tree of Life. [En línea] consultado en <https://bit.ly/3cTB7AV> el 28/12/2019.
- Ulloa, M. & Hanlin, RT. (2015). Illustrated Dictionary of Mycology. EUA. APS Press.
- Zurabian, R. (2010). Generalidades de micología. Lo básico de micología. [En línea] consultado en <https://bit.ly/33lygft> 26/12/2019.

MANEJO BASICO:**OBTENCIÓN Y MANEJO DE MUESTRAS CLÍNICAS PARA DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO****INTRODUCCIÓN:**

La calidad del diagnóstico de las micosis depende de la calidad y cantidad del material recogido del paciente, de las condiciones de envío, conservación, transporte y procesamiento y de la pericia del micólogo. Las muestras deben ser representativas, abundantes, libres de contaminantes exógenos o endógenos, y de sustancias que inhiban o alteren la viabilidad de los hongos. Para asegurar la calidad de la muestra no hay nada mejor que la toma de muestra la realice el micólogo, la inocule en los medios de cultivo, y la procese para la observación microscópica. En caso de no ser posible, se debe entrenar al personal de manera tal que pueda elegir adecuadamente el sitio más típico y activo de la lesión, y obtener la muestra mediante técnicas e instrumental específico para cada caso. De esta forma es posible evitar las contaminaciones por esporas de hongos saprófitos (exógenas) y/o la microbiota de las diferentes áreas del cuerpo humano (endógenas). Es conveniente recoger los especímenes en recipientes estériles, irrompibles, de tamaño adecuado, y conservarlas a temperatura ambiente. Si las muestras fueron recogidas en un laboratorio periférico para ser enviadas a otro centro es conveniente adjuntar una pequeña ficha con el tipo de material, características sobresalientes de la lesión, y edad y sexo del paciente. El paciente debe seguir, en lo posible, una serie de instrucciones detalladas a continuación. Para ello conviene explicarle claramente por qué deben cumplirse esos requisitos y qué sucedería de no hacerlo, de tal modo que no deje de cumplirlos por ningún motivo o pueda informar cuando sucedió algo fuera de lo recomendado.

INDICACIONES PREVIAS AL PACIENTE:

Suspender la medicación antifúngica interna y/o externa durante un lapso no inferior a las 72 horas antes de efectuar la toma de muestra; de igual modo se suspende el uso de pomadas, talcos, tinturas u otras sustancias que enmascaren la presencia, inhiban o alteren la viabilidad de los hongos (Ver Imagen 2.1).

Lavar la superficie afectada con agua y jabón blanco no perfumado tres veces por día durante los tres días previos a la toma de muestra.

Las uñas deben higienizarse además con un cepillo blando y no deben estar pintadas.



Imagen 2.1- Para toma de muestras micológicas, es necesario que el paciente no utilice cosméticos en la zona afectada. Fuente:(Bueno N, (2015) Recomendaciones para la obtención de muestras y cultivos fúngicos[En línea] recuperado de http://www.anlis.gov.ar/inei/micologia/wp-content/uploads/2015/08/Recomendaciones-para-la-obtencion-de-muestras-y-cultivos-fungicos_IT_MI_27_CNC.pdf)

PREPARACIÓN DEL SITIO PARA LA TOMA DE MUESTRA:

La toma de muestra es el paso definitivo para lograr un buen proceso y diagnóstico de una muestra clínica, si la muestra no es tomada y tratada con los cuidados necesarios, en el caso de las infecciones por hongos, puede dificultarse seriamente la recuperación de la especie patógena o puede verse comprometido el aislamiento por contaminación bacteriana o porque el inóculo resulte insuficiente.

Antes de la toma de muestra se desinfecta la zona afectada con alcohol (70%) utilizando una gasa estéril. Si se sospecha de una infección por levaduras, es necesario limpiar únicamente con solución fisiológica (SF) ya que estas pueden ser susceptibles a la acción del alcohol. Estas indicaciones están destinadas a garantizar el aislamiento en el estudio micológico evitando pérdidas de tiempo y dinero.

Siempre es conveniente tener tubos con medios de cultivo SDA y Micocel en el lugar de la toma de muestra ya que a veces el material es escaso y en esos casos se recomienda realizar directamente la inoculación a los medios de cultivo para garantizar la recuperación del hongo.

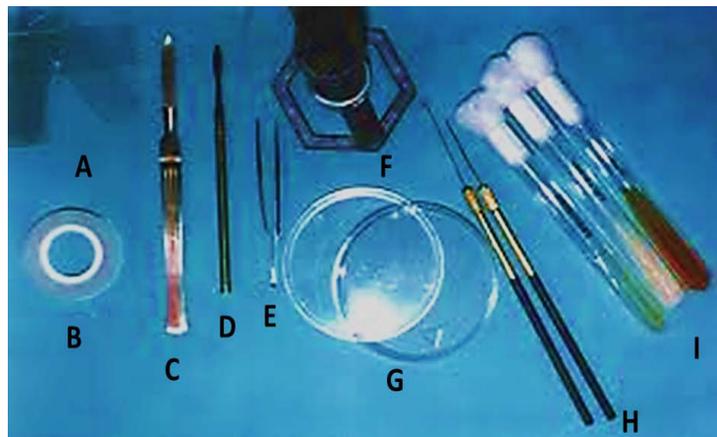


Imagen 2.2: Elementos para la toma de muestra A: Portaobjetos; B: Cinta transparente; C: Bisturí; D: Sindesmostomo (bisturí de hoja pequeña, muy útil para penetrar en el lecho subungueal); E: Pinzas para depilar; F: Mechero Bunsen; G: Caja Petri; H: Asas

Bacteriológicas; I: Tubos con medio de cultivo Fuente:(Bueno N, (2015) Recomendaciones para la obtención de muestras y cultivos fúngicos[En línea] recuperado de

http://www.anlis.gov.ar/inei/micologia/wp-content/uploads/2015/08/Recomendaciones-para-la-obtencion-de-muestras-y-cultivos-fungicos_IT_MI_27_CNC.pdf)

Toma de muestra con cinta adhesiva transparente: esta técnica consiste en cortar un fragmento de cinta adhesiva transparente de aproximadamente 3-10 cm de largo, que se aplica con la cara engomada sobre la lesión y se presiona, raspando con el borde lateral de la uña, la superficie de la cinta que cubre la zona afectada para que se adhieran las escamas. La cinta se

retira obteniéndose así la impronta de la lesión. A continuación se aplica la cinta por los extremos sobre una lámina portaobjetos limpia, rebatiendo los extremos hacia abajo para que no se despegue, la muestra así preparada puede ser remitida al laboratorio. Es conveniente tomar dos o tres improntas y montarlas individualmente.



Imagen 2.3: Toma de muestra con cinta transparente Fuente:(Bueno N, (2015) Recomendaciones para la obtención de muestras y cultivos fúngicos[En línea] recuperado de http://www.anlis.gov.ar/inei/micologia/wp-content/uploads/2015/08/Recomendaciones-para-la-obtencion-de-muestras-y-cultivos-fungicos_IT_MI_27_CNC.pdf)

Raspado: se utiliza para todas las lesiones descamativas de la piel glabra (sin pelo), en lesión con un bisturí estéril colocado perpendicularmente a la superficie de la piel; si las lesiones son vesiculosas se remueve el techo de las vesículas con el bisturí; cuando la lesión afecta los pliegues interdigitales el material se toma del borde de las lesiones, junto a la piel sana de los dedos o de la planta del pie, evitando las áreas maceradas; si la lesión afecta las uñas se raspa la cara profunda especial aquellas de gran tamaño. Para obtener el material se raspa el borde activo de la de la superficie afectada, próxima a la región sana de la uña (si la hay), se recogen los residuos epidérmicos depositados entre la lámina de las uñas y el lecho subungueal (se elegirán las zonas friables, de color anormal o hiperqueratósicas). Se debe recoger abundante cantidad de material.



Imagen 2.4: Toma de muestra, raspado de uñas Fuente:(Bueno N, (2015) Recomendaciones para la obtención de muestras y cultivos fúngicos[En línea] recuperado de http://www.anlis.gov.ar/inei/micologia/wp-content/uploads/2015/08/Recomendaciones-para-la-obtencion-de-muestras-y-cultivos-fungicos_IT_MI_27_CNC.pdf)

Depilación: se utiliza en las lesiones de cuero cabelludo y otras áreas pilosas, y para recoger el vello de la piel cuando el folículo está inflamado (tinea corporis). La muestra se toma con pinza depilatoria estéril aplicada perpendicularmente a la superficie de la piel y siguiendo el sentido del pelo. Se presiona el cuero cabelludo con la pinza y se retira el pelo enfermo (deslucido, debilitado, grisáceo o los muñones cortos) y las escama-costras adyacentes. Se deben extraer aproximadamente 20 pelos enfermos y las escamas circundantes.



Imagen 2.5: Toma de muestra de cabello Fuente:(Bueno N, (2015) Recomendaciones para la obtención de muestras y cultivos fúngicos[En línea] recuperado de http://www.anlis.gov.ar/inei/micologia/wp-content/uploads/2015/08/Recomendaciones-para-la-obtencion-de-muestras-y-cultivos-fungicos_IT_MI_27_CNC.pdf)

PREPARACIÓN, ACONDICIONAMIENTO Y ENVÍO DE MUESTRAS.

Toda vez que sea posible el material se procesará directamente en el centro de toma de muestra. De no ser así, se recogerán las escamas de piel y uñas y los fragmentos de cabello en una caja de Petri descartable estéril de 5-6 cm de diámetro, o entre dos portaobjetos desengrasados, limpios y estériles; se sellarán los bordes con cinta adhesiva transparente para evitar la pérdida del material, se envolverán en un papel y se enviarán al laboratorio del centro de salud junto con una ficha donde se anotarán los datos del paciente y las características macroscópicas de la lesión. Los envíos no necesitan refrigeración y ningún medio de transporte, excepto que se especifique lo contrario. Es preferible el transporte inmediato al laboratorio, pero no es imprescindible ya que los hongos que producen micosis superficiales pueden ser aislados de las muestras luego de varias semanas si el recipiente donde se han recolectado no retiene humedad. Es necesario recalcar una vez más, que las muestras para estudio micológico deben ser abundantes, pues su procesamiento consume gran cantidad de material y siempre es conveniente conservar parte de la misma por si se requiere efectuar estudios adicionales. Se deben enviar al laboratorio no menos 10 a 20 fragmentos de piel, pelo o uñas. Las muestras recogidas por hisopado sólo se procesarán cuando provengan de lesiones húmedas compatibles con candidiasis o de lesiones mucocutáneas.



Imagen 2.6: Acceso a la zona más profunda de la lámina ungueal; descartar el primer raspado Fuente: (Perez J., Hernandez I. , Nuño F; Técnica de examen directo de la onicomycosis mediante microscopía con hidróxido de potasio; [En línea] recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.repod.2017.01.001>)

El tamaño de la muestra debe ser abundante, ya que si es insuficiente podría provocar falsos negativos en la interpretación del resultado. A su vez, es importante que la muestra esté lo más fraccionada posible, casi polvo, para que la disolución elimine la queratina con facilidad

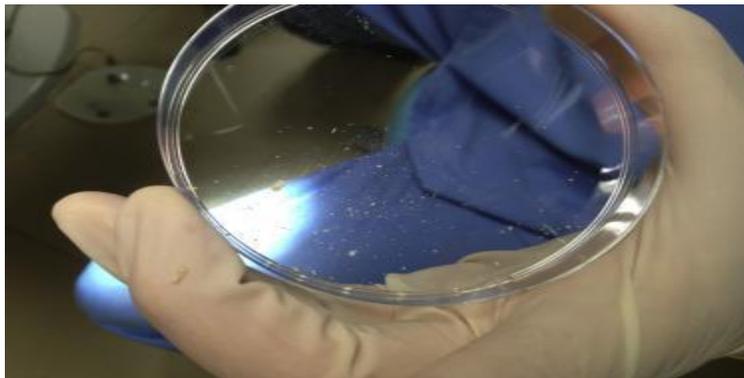


Imagen 2.7: Toma de muestra abundante, lo más homogénea posible, en la placa de Petri. Fuente: (Perez J., Hernandez I. , Nuño F; Técnica de examen directo de la onicomycosis mediante microscopía con hidróxido de potasio; [En línea] recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.repod.2017.01.001>)

Preparación de la disolución de KOH

Una vez tomada la muestra, se prepara la disolución a la que se va a someter. La disolución básica está constituida por agua destilada y potasa cáustica (KOH). Existe variación en la concentración del porcentaje de KOH, pudiendo ser desde el 10% hasta el 40%. La diferencia es la rapidez con que el KOH elimina la queratina. A mayor concentración mayor eliminación de queratina de la muestra, sin alterar la morfología del hongo gracias a la presencia de quitina en su pared.

El KOH suele presentarse en polvo, escamas o lentejas. Para su visualización en el microscopio se utilizará KOH al 30%. Para ello se diluirán 3g de KOH en 10mL de agua destilada (3g KOH+10mL agua destilada). Se aconseja realizar poca cantidad debido a la degradación del compuesto con el tiempo. El proceso se realizará con la máxima precaución, ya que el KOH es un material corrosivo. Se utiliza un bote de plástico, no de cristal: el cristal crea una precipitación del compuesto provocando fallos en la función del mismo. Para alargar la vida del compuesto se puede utilizar glicerol, siendo la disolución 3g de KOH en 8mL de agua destilada y 2mL de glicerol (3g KOH+8mL agua destilada+2mL glicerol). La adición de glicerol previene la degradación de los elementos fúngicos, evitando la formación de cristales y la deshidratación de la preparación entre porta y cubre-porta, convirtiéndola en semipermanente.

Preparación de la muestra

Con una pipeta se echará una gota de la disolución en el porta y se depositará la muestra. Posteriormente se tapaná con un cubre-porta y se extenderá de forma homogénea presionando suavemente para deshacer las burbujas de aire, eliminando el exceso de disolución con una gasa. Se esperará a que el KOH elimine la queratina. Este proceso se puede acelerar calentando la muestra suavemente con un mechero Bunsen o dejándola en una zona caliente 24 h.



Imagen 2.8: Muestra en porta sin calentar Fuente: (Perez J., Hernandez I., Nuño F; Técnica de examen directo de la onicomicosis mediante microscopía con hidróxido de potasio; [En línea] recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.repod.2017.01.001>)

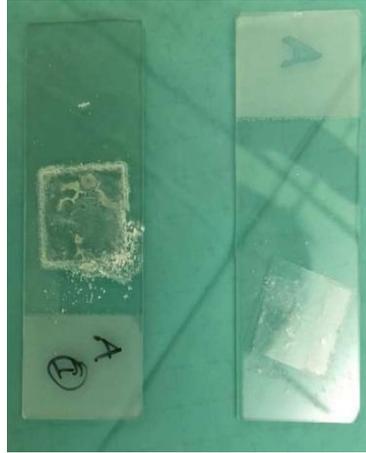


Imagen 2.9: Muestra acelerada mediante calor, con la desaparición de queratina Fuente: (Perez J., Hernandez I. , Nuño F; Técnica de examen directo de la onicomicosis mediante microscopía con hidróxido de potasio; [En línea] recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.repod.2017.01.001>)

Para una mejor visualización de los hongos se puede utilizar colorante, como tinta Parker o azul de lactofenol. La preparación de esta disolución se realizará en una proporción 1:2, es decir, se añadirá una parte de tinta sobre dos partes de la disolución de KOH. En el caso de no disponer de tinta azul-negra, la reemplazamos por tinta negra Quink Parker o, en su defecto, otro color de tinta, pero debe ser permanente. El procedimiento es el mismo que el KOH glicerol (3 g KOH + 8 ml de agua destilada + 2 ml glicerol + 5 ml tinta). Se debe tener precaución, ya que esta preparación puede enmascarar el pigmento melánico de los hongos dematiáceos.

Visualización de la muestra al microscopio

Una vez colocada la muestra preparada con la disolución en el microscopio, con el objetivo de 10 aumentos se recorrerá la muestra hasta tener sospecha de identificar hifas. Una vez que se han localizado, se estudiarán en profundidad con el objetivo de 40 aumentos y se corroborará la sospecha de onicomicosis del paciente. Para poder visualizar las células epiteliales se reducirá la iluminación mediante la disminución del condensador. Se necesitará experiencia para la identificación y diferenciación de los hongos, pudiendo encontrar en la muestra dermatofitos manifestados como hifas hialinas, tabicadas y ramificadas de 4 a 6 μm de diámetro. Las levaduras se visualizarán como elementos esféricos u ovalados (blastosporos), pudiendo presentar brotes y/o pseudohifas. Los hongos miceliales se verán como hifas hialinas o pigmentadas, tabicadas o no, de diámetro irregular según el hongo al que corresponda.



Imagen 2.10: Visualización al microscopio de arthroconidias (*T. rubrum*) en KOH a 10 aumentos Fuente: (Perez J., Hernandez I. , Nuño F; Técnica de examen directo de la onicomicosis mediante microscopía con hidróxido de potasio; [En línea] recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.repod.2017.01.001>)

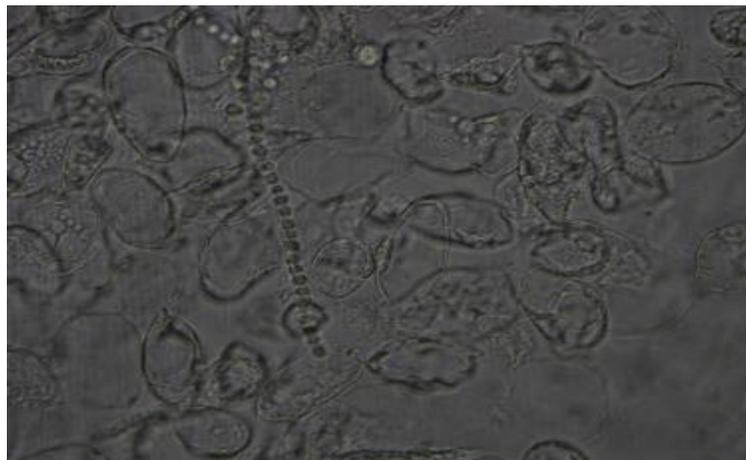
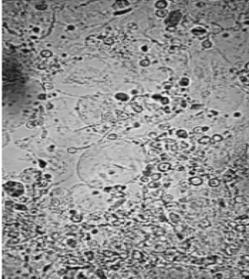
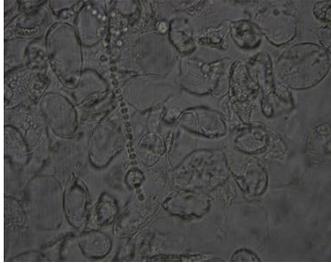
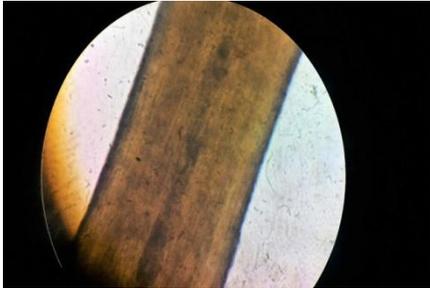
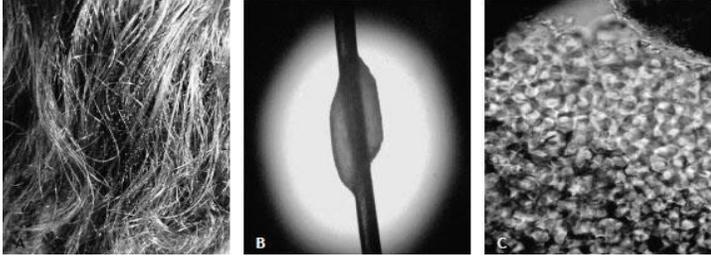
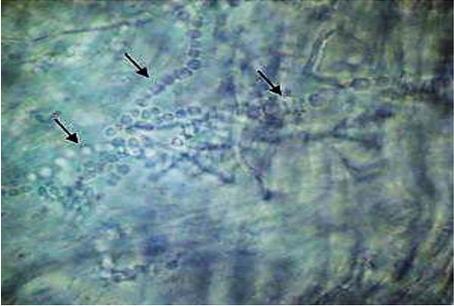


Imagen 2.11: Visualización al microscopio de arthroconidias (*T. rubrum*) en KOH a 40 aumentos Fuente: (Perez J., Hernandez I. , Nuño F; Técnica de examen directo de la onicomicosis mediante microscopía con hidróxido de potasio; [En línea] recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.repod.2017.01.001>)

Tabla 1: CONCENTRACIÓN- TIPO DE MUESTRA PONER IMAGEN ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON KOH

Concentración de KOH (%)	Tipo de muestra
20-40	Uñas 

	<p>Microscopía en fresco de un raspado del lecho subungueal de una onicomicosis Fuente: Geo. F. Brooks, Karen C. Carroll, Janet S.(2014) Microbiología médica, 26e Mexico McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES)</p>  <p>Visualización al microscopio de arthroconidias (<i>T. rubrum</i>) en KOH a 40 aumentos (imágenes cedidas por cortesía de Luis Alou). Fuente: : (Perez J., Hernandez I., Nuño F; Técnica de examen directo de la onicomicosis mediante microscopía con hidróxido de potasio; [En línea] recuperado de https://doi.org/10.1016/j.repod.2017.01.001)</p>
<p>20</p>	<p>Pelos</p>  <p>Cabello observado a 100x</p>  <p>A) Aspecto macroscópico de las lesiones de piedra blanca; B) Examen directo, nódulo adherido al tallo piloso (10x); C) Examen directo con KOH; arthroconidias en la superficie del tallo piloso (40x) Fuente: (Morales C. Cardona A, Ramirez A. et al (2013) Piedra negra y piedra blanca: aspectos diferenciales [En línea] recuperado de Infect. vol.17 no.2 Bogotá ISSN: 0123-9392</p>
<p>10</p>	<p>Escamas</p>

	 <p>Imagen microscópica del examen directo: estructuras fibrilares con tabiques dispuestos a intervalos de distancia regular y con múltiples ramificaciones, que se correspondían con las hifas septadas características de los hongos dermatofitos. Fuente:(Mejias A,Badia F,Mejias A, et al (2011); Tinea corporis en un paciente de piel negra: importancia del examen directo [En línea] recuperado de DOI: 10.1016/j.anpedi.2011.05.004</p>
<p>No requiere</p>	<p>Líquidos</p>  <p>Cryptococcus neoformans por el método de tinción con Tinta china. Fuente:(Dominio públicoover términos File:Cryptococcus neoformans using a light India ink staining preparation PHIL 3771 lores.jpg Creado el: 1 de enero de 1969)</p>

Piel:

Pitiriasis versicolor:

Cinta adhesiva transparente.

Lesiones húmedas, con alteración de la epidermis, que provocan prurito y ardor, localizadas preferentemente en pequeños y grandes pliegues.

Múltiples manchas descamativas color pardo o más claras que el color de la piel normal. Generalmente localizadas en el tronco, raramente en cara, cuello, brazos, axilas o muslos. Presentan fluorescencia desde rojiza opaca a amarillo anaranjada con Luz de Wood.

Candidiasis:

Raspado y/o hisopado

Lesiones húmedas, con alteración de la epidermis, que provocan prurito y ardor, localizadas preferentemente en pequeños y grandes pliegues.



Imagen 2.11: Candidiasis cutánea, se pueden observar los bordes y el halo que se forma en la lesión

<https://candidiasis.me/cutanea/>

Tinea negra

Raspado

Manchas negras o pardas, únicas o no, localizadas especialmente en la palma de las manos, planta de los pies y raramente en otras zonas del cuerpo.

Tinea corporis, Tinea cruris (dermatofitosis):

Raspado del borde activo. Si se observa inflamación de los folículos pilosos se tomará muestra del vello por depilación.

Lesiones inflamatorias con alteraciones de la epidermis (vesículas, descamación) y/o de la dermis (eritema, edema, supuración); generalmente bordes bien definidos, anulares o policíclicos elevados, con área central escamosa y periferia eritematosa que avanza activamente, con o sin vesículas o vesiculopústulas, localizadas en cualquier área del cuerpo o de la cara.



Imagen 2.12: Tinea capitisFuente: (<https://comocurarse.com/la-tina>)

Tinea pedis (dermatofitosis):

Raspado de la periferia de la lesión.

Lesiones localizadas en los pliegues interdigitales, en la planta y/o dorso del pie, consistentes en fisuras de la membrana interdigital de color rojo y bordes blancos, o lesiones

hiperqueratósicas pápuloescamosas con escamas furfuráceas que asientan sobre una base engrosada y eritematosa de planta o dorso del pie, con o sin vesículas o pústulas.

Uñas: onixis por levaduras:

Raspado. No descontaminar con alcohol antes de recolectar material para el cultivo

Uñas endurecidas, engrosadas o no, con surcos, con o sin cambio de color pero con brillo. Sin formación de residuos epidérmicos entre la uña y su lecho. Habitualmente con perionixis inflamatoria, rojiza y dolorosa.



Imagen 2.13: Micosis en las uñas Fuente:

(<http://saludymedioambienteactual.blogspot.com/2012/11/hongos-y-enfermedades-candidiasis.html>)

Tinea unguium (dermatofitosis):

Raspado, recoger el material caseoso.

Uñas endurecidas, engrosadas, con o sin surcos, pero siempre friables y quebradizas, con pérdida del color y brillo natural. Hay formación de detritos epidérmicos caseosos entre la uña y su lecho. La infección generalmente comienza por el borde lateral o distal de la uña. No hay perionixis

Cuero cabelludo y áreas pilosas:

Piedra blanca

Cortar el pelo con tijera.

Presencia de nódulos blancos o blanco-amarillentos, blandos, que rodean el pelo de la región axilar, facial, genital o del cuero cabelludo, aunque preferentemente de barba y bigote.

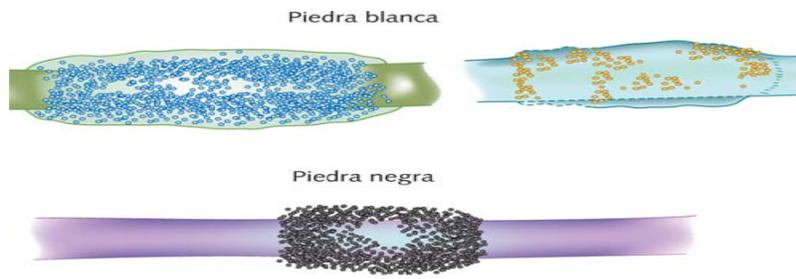


Imagen 2.14: Piedra Blanca y Piedra negra. Fuente: (Arenas 2014)

Piedra negra

Cortar el pelo con tijera.

Presencia de nódulos oscuros, duros, de aspecto pétreo, que rodean el tallo del pelo del cuero cabelludo o más raramente el vello púbico o axilar.

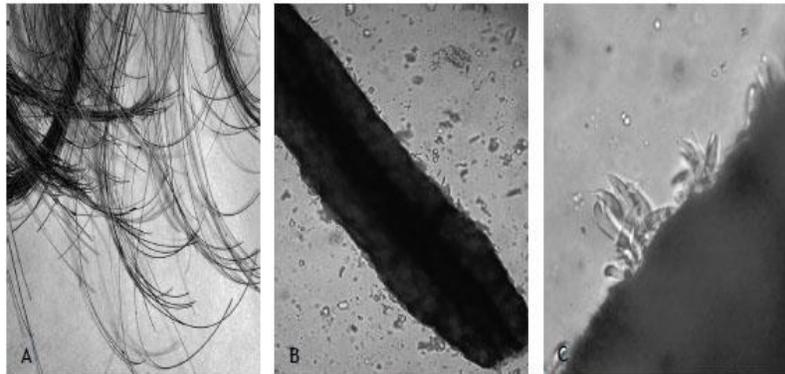


Imagen 2.15: A) Aspecto macroscópico de las lesiones de Piedra. B) Examen directo con KOH; nódulo adherido al tallo piloso (10X) C) Examen directo con KOH; ascosporas de nódulo roto (320X) Fuente: (Cardona C., Ramirez A., Hortúa C., Piedra negra y piedra blanca: aspectos diferenciales; Infect. vol.17 no.2 Bogotá [En línea] recuperado de ISSN 0123-9392)

Tinea capitis (dermatofitosis):

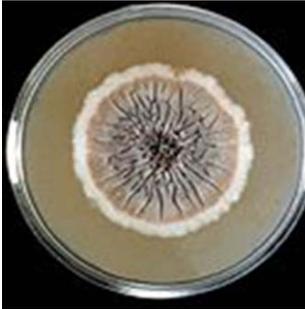
Depilación y raspado. En caso de Querion punción con jeringa y aguja estéril y realizar además un estudio bacteriológico.

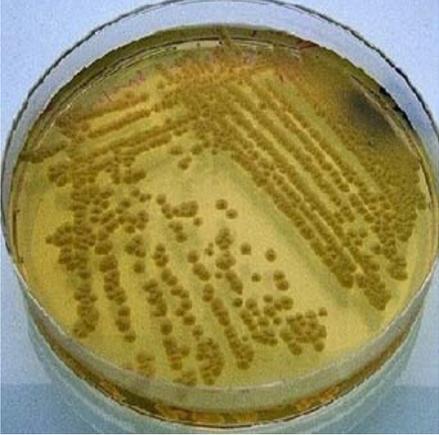
Lesiones escamosas, eritematosas, con pérdida parcial del pelo del cuero cabelludo, con o sin supuración y prurito o lesiones elevadas, fluctuantes y supurativas (Querion) con pérdida de cabello. En todos los casos el cabello se debilita, se quiebra y cae.

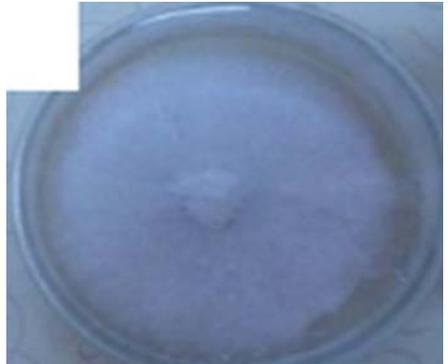
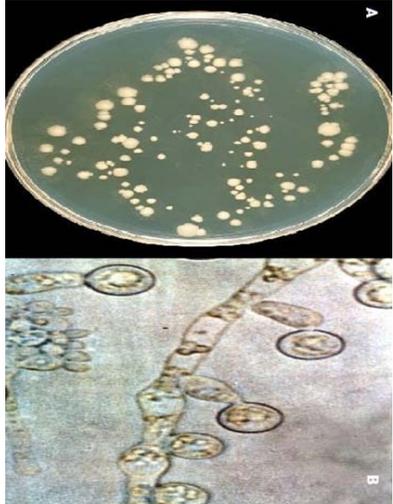


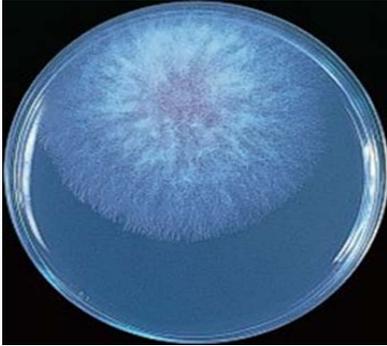
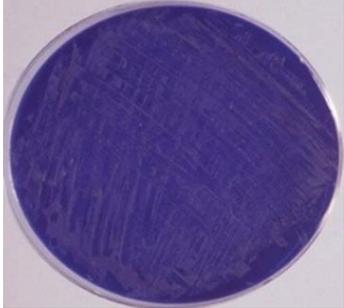
Imagen 2.16: Dermatofitosis Fuente: (ZagnoliA.,ChevalierB.,SassolasB.(2005); Dermatofitosis y dermatofitos; Volume 40, Issue 1, Pages 1-13; [En línea] recuperado de [https://doi.org/10.1016/S1245-1789\(05\)43314-4](https://doi.org/10.1016/S1245-1789(05)43314-4))

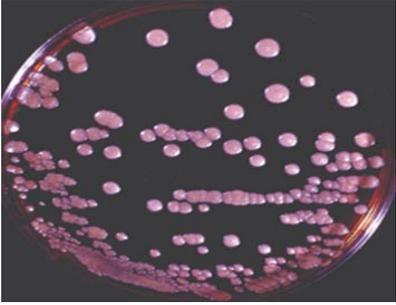
Tabla 2: Medios de cultivo más usados para la siembra micologica

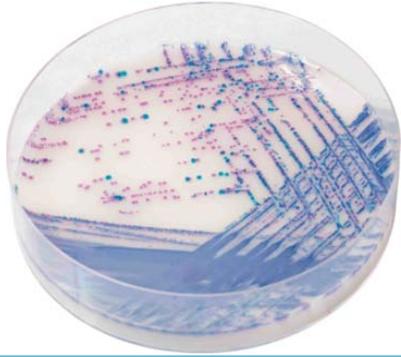
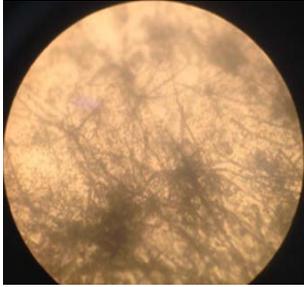
Medio de cultivo	Fundamento	Foto del medio
SDA (Sabouraud Dextrosa Agar)	Es un medio de peptona suplementado con dextrosa para favorecer el crecimiento de hongos. Las peptonas son fuentes de factores de crecimiento nitrogenados. La dextrosa proporciona una fuente de energía para el crecimiento de microorganismos. El cloranfenicol es un antibiótico de amplio espectro con efecto inhibitor para una amplia variedad de bacterias gram negativas y positivas cuando se agrega a la fórmula.	
Mycosel	Las propiedades nutritivas las suministra la peptona preparada a partir de harina de soja. La dextrosa es una fuente de energía para el metabolismo de los hongos. La cicloheximida inhibe la mayoría de los hongos saprofiticos. El cloranfenicol es un antibiótico de amplio espectro que inhibe una amplia variedad de bacterias gram positivas y gram negativas	
PDA (Papa Dextrosa Agar)	Es un medio de cultivo que aporta los elementos nutricionales necesarios para el desarrollo de hongos filamentosos y levaduras. La combinación de la infusión de papa con la glucosa proporciona la fuente de energía perfecta para que exista un crecimiento satisfactorio de los hongos. Mientras que el agar es quien brinda la consistencia al medio. El medio por sí solo no inhibe el crecimiento de las bacterias, por tanto es un medio no selectivo. Para hacerlo selectivo necesita el agregado de sustancias inhibitoras como el ácido tartárico o los antibióticos.	

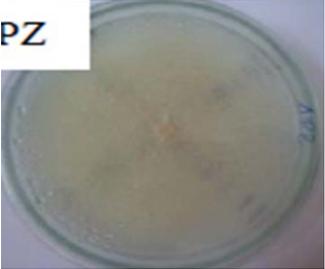
AS (Agar Sangre)	<p>El agar sangre tiene como característica ser un medio enriquecido, diferencial y no selectivo. Es un medio enriquecido porque lleva como aditivo principal 5-10% de sangre sobre una base de agar. Ambos compuestos contienen muchos nutrientes y esta propiedad permite que en él puedan crecer la mayoría de las bacterias cultivables. Ese crecimiento ocurre sin restricción; por este motivo es no selectivo. Sin embargo, si a este medio se le adicionan compuestos que impidan el crecimiento de algunos microorganismos y favorezca el de otros, se vuelve selectivo. Es el caso si se adicionan ciertos tipos de antibióticos o antifúngicos. Así mismo, el agar sangre es un medio diferencial, ya que permite distinguir 3 tipos de bacterias: los beta-hemolíticos, alfa-hemolíticos y gamma-hemolíticos</p>	
ACH (Agar Chocolate)	<p>Este medio está compuesto por una base de agar rico en nutrientes y sangre calentada. La hemólisis de los glóbulos rojos proporcionan al medio factor X (hemina) y factor V (NAD), necesarios para el crecimiento de algunos microorganismos, como el género <i>Haemophilus</i>. También es muy útil para el aislamiento de <i>Neisserias sp.</i> Al igual que el agar sangre, se puede usar como agar base diferentes medios dependiendo de la necesidad. Entre los medios utilizados se encuentran infusión cerebro corazón y agar soja tripticasa, aunque los más recomendados son agar Columbia, Mueller Hinton, agar GC y agar Thayer Martin. Algunas variantes de agar chocolate incluyen un suplemento enriquecido disponible comercialmente llamado Isovitalax o Polivitex. Estos suplementos contienen vitamina B12, L-glutamina, adenina, clorhidrato de guanina, ácido p-aminobenzoico, nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), pirofosfato de tiamina, nitrato férrico, clorhidrato de tiamina, hidrócloruro de cisteína, L-cistina y glucosa.</p>	
Agar Biggy	<p>Es una modificación del medio Nickerson. Durante el estudio de la reducción de sulfito de las especies de <i>Candida</i>, Nickerson detectó niveles diferentes de esta capacidad entre las especies de <i>Candida</i>. Describió este medio para el aislamiento de <i>Candida albicans</i>, que puede diferenciarse de otras especies de <i>Candida</i> por el color y la morfología de las colonias. El extracto de levadura y la glucosa proporcionan los nutrientes necesarios para el crecimiento de levaduras. La glicina es un nutriente adicional, pero también inhibe muchas especies bacterianas en la alta concentración utilizada en este medio. Las especies de <i>Candida</i> reducen la sal de bismuto a bismuto y el sulfito a sulfuro, mediante un proceso de reducción de sustrato. El bismuto y el sulfuro se combinan en un precipitado de color amarillado a negro que tiñe las colonias y puede difundirse en el medio. Asimismo, los compuestos de bismuto y azufre inhiben numerosas bacterias.</p>	

<p>Agar Niger</p>	<p>El medio de cultivo contiene ácido cafeico contenido en el extracto de la semilla de girasol (<i>Guizzotia abyssinica</i>) que permite detectar la enzima fenol oxidasa desarrollada por <i>Cryptococcus neoformans</i>. La reacción enzimática produce melanina, la cual es absorbida por la pared celular del hongo produciendo un color marrón.</p>	
<p>Agar Harina de Arroz</p>	<p>El extracto de arroz proporciona la única fuente de nutrientes. La falta de nutrientes, junto con las condiciones de cultivo deficientes de oxígeno (al colocar cubiertas de vidrio sobre el inóculo) crea un entorno deficiente que induce la generación de formas morfológicas específicas (clamidosporas y pseudomicelios en especial). La adición de Polisorbato 80 estimula más la formación de clamidosporas debido a su contenido de ácidos oleicos. Se utiliza para la producción de pseudohifas de levaduras del género <i>Candida</i> y producción de clamidoconidios de <i>C.albicans</i></p>	
<p>Agar Harina de Maíz</p>	<p><i>Candida albicans</i> es el agente etiológico en la Candidiasis, que varía desde infecciones leves a graves de la piel, las uñas y las membranas mucosas. Una de las características diferenciadoras más importantes de <i>C. albicans</i> es su capacidad para formar clamidosporas en algunos medios. La producción de clamidosporas es una característica importante para el diagnóstico utilizado en la identificación de <i>C. albicans</i>. La infusión de harina de maíz proporciona nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales para el crecimiento. El agar bacteriológico es el agente solidificante. La harina de maíz es valiosa para la diferenciación morfológica de muchos organismos similares a la levadura. Suprime el crecimiento vegetativo de muchos hongos y al mismo tiempo estimula la esporulación. El Agar Harina de Maíz permite que <i>Candida albicans</i> produzca clamidosporas, que es uno de los mejores criterios para su identificación. Walker y Huppert informaron que la adición de 1% de Tween 80 potenciaba la formación de clamidosporas.</p>	
<p>Agar Rosa de Bengala + Cloranfenicol</p>	<p>Es un medio neutral selectivo recomendado para la enumeración de hongos y levaduras en alimentos, agua y materiales ambientales. El Agar Rosa-Bengala + Cloranfenicol se recomienda para alimentos frescos proteicos con flora compuesta principalmente de bacterias Gram-negativas en forma de vara. También es apropiado cuando se requieren tiempos y temperaturas de incubación mayores, alrededor de 35 °C. La peptona bacteriológica proporciona la fuente de nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos. La dextrosa es el carbohidrato fermentable como fuente de carbono y energía. El fosfato de potasio es el tampón. El sulfato de magnesio proporciona azufre y otros oligoelementos. El rosa de bengala es un agente selectivo que inhibe el crecimiento de bacterias y limita el tamaño y la altura de los hongos con crecimiento rápido, lo que permite el desarrollo y la detección de otras levaduras de</p>	

	<p>crecimiento más lento: los hongos aparecen de color rosado. El cloranfenicol sirve como un agente selectivo, inhibiendo el crecimiento bacteriano. Es un antibiótico recomendado para medios neutros debido a su estabilidad térmica y amplio espectro bacteriano. El agar bacteriológico es el agente solidificante.</p>	
<p>Agar Extracto de Malta</p>	<p>Se utiliza para el aislamiento, cultivo y enumeración de levaduras y mohos en alimentos. Es particularmente adecuado para levaduras y mohos, ya que contiene una alta concentración de maltosa y otros sacáridos como fuente de energía. La dextrina y la glicerina son las fuentes de carbono, y la peptona es una fuente de nitrógeno. El agar bacteriológico es el agente solidificante. El pH ácido del Agar Extracto de Malta es óptimo para el crecimiento de levaduras y mohos, mientras que restringe el crecimiento de otras bacterias. El Agar de Extracto de Malta se ha utilizado durante años para cultivo de hongos y cultivo de levaduras en la industria azucarera, en la fabricación de jarabes, refrescos y otras bebidas</p>	
<p>Agar Canavanina Glicina Azul de Bromotimol</p>	<p><i>C. neoformans</i> var. <i>gattii</i> tolera la L-canavanina hasta concentraciones de 960 mcg/ml, y por lo tanto puede crecer utilizando la glicina como fuente de carbono, lo que alcaliniza el medio, virando a azul cobalto. Sin embargo, la variedad <i>neoformans</i> es sensible a la L-canavanina y es incapaz de utilizar la glicina como única fuente de carbono y por lo tanto ni crece ni produce alteraciones en dicho medio</p>	
<p>Agar BHI (Infusion Cerebro Corazon)</p>	<p>La infusión de cerebro y corazón ha resultado ser efectiva en el cultivo de una amplia variedad de microorganismos, incluidos muchos tipos de patógenos. Se ha utilizado como medio base para las nuevas fórmulas de medios de cultivo cuando se suplementa con sangre o agentes selectivos. Sin suplemento se recomienda actualmente como medio universal para bacteriología aerobia y para la recuperación primaria de hongos y <i>Actinomycetales</i> a partir de muestras clínicas y no clínicas. Obtiene los nutrientes de la infusión de cerebro y corazón, la peptona y la glucosa. Las peptonas y la infusión son fuentes de nitrógeno orgánico, carbono, azufre, vitaminas y sustancias de traza. La glucosa es la fuente de carbohidratos que los microorganismos utilizan mediante fermentación. Se utiliza fosfato disódico como tampón en el medio.</p>	
<p>Agar Czapek-Dox</p>	<p>Caldo Czapek-Dox Modificado se usa comúnmente para el cultivo de hongos y <i>Candida albicans</i>. Es similar al agar modificado de Czapek-Dox, sin el agar, y se utiliza para cultivar bacterias y hongos que son capaces de usar nitrato de sodio como única fuente de nitrógeno. El Caldo Czapek-Dox Modificado es un medio semisintético que contiene nitrato de sodio como única fuente de nitrógeno. Posee la ventaja de una formulación químicamente definida, que ha sido modificada respecto a la original al sustituir el sulfato de magnesio y el fosfato de potasio por glicerofosfato de magnesio, y así evitar la precipitación de fosfato de magnesio. El medio se elabora solamente con fuentes inorgánicas de nitrógeno y fuentes de carbono químicamente definidas. Es útil en una variedad de procedimientos microbiológicos, incluida la microbiología del suelo, y pruebas de hongos y resistencia al moho. Este medio producirá un crecimiento moderadamente</p>	

	<p>bueno de la mayoría de los <i>Aspergillus</i> saprófitos. La sacarosa es el único hidrato de carbono fermentable que proporciona carbono y energía. El nitrato de sodio es la única fuente de nitrógeno. Las sales de potasio actúan como un sistema de amortiguación. El cloruro de potasio contiene iones esenciales. El glicerofosfato de magnesio y el sulfato ferroso son fuentes de cationes.</p>	
<p>Agar Semilla de Algodón</p>	<p>El medio de cultivo contiene ácido cafeico contenido en el extracto de la semilla de girasol (<i>Guizzotia abbinica</i>) que permite detectar la enzima fenol oxidasa desarrollada por <i>Cryptococcus neoformans</i>. La reacción enzimática produce melanina, la cual es absorbida por la pared celular del hongo produciendo un color marrón.</p>	
<p>Agar Aceite de Oliva</p>	<p>Es un medio utilizado para el aislamiento de levaduras lipofílicas, como <i>Malassezia furfur</i>.</p>	
<p>Agar Dixon</p>	<p>Utilizado en el cultivo de <i>Malassezia spp.</i> Puede modificarse añadiendo cloranfenicol o bien cloranfenicol y cicloheximida. Contiene como fuente de nutrientes peptona y extracto de malta, detergente Tween 40 y una elevada concentración de agentes oleosos; ácido oléico y glicerol con un pH de 6 que a 36-37°C favorece el crecimiento de este hongo.</p>	
<p>Agar V8</p>	<p>Las levaduras son células unicelulares, eucariotas, en gemación que generalmente tienen forma ovalada o alargada. Se multiplican principalmente por la producción de blastoconidios (brotes). Las colonias de levadura son húmedas y cremosas o glabras a membranosas en textura y son considerados patógenos oportunistas. Los mohos son organismos microscópicos similares a plantas, compuestos de largos filamentos llamados hifas. Ambos están ampliamente distribuidos en el suelo, el agua y el aire. El cultivo de levaduras y mohos se vuelve importante en los estudios de fermentación. Donde generalmente se usan como cultivos iniciadores. Los jugos de vegetales proporcionan los ingredientes traza necesarios para estimular el crecimiento de hongos. El extracto de levadura proporciona nutrientes esenciales para el crecimiento. La L-asparagina sirve como fuente de aminoácidos y la glucosa como carbohidrato fuente para el crecimiento de levaduras y mohos. El jugo V-8 es una mezcla de 8 jugos de vegetales, que suministra los ingredientes traza para</p>	

	Estimular el crecimiento de hongos. El pH ácido del medio favorece el crecimiento de hongos y suprime el crecimiento bacteriano	
CHROMagar	El chromagar contiene diversos sustratos enzimáticos que están unidos a compuestos cromo génicos. Cuando enzimas específicas descomponen el sustrato, se produce color. Se utiliza para identificar levaduras aisladas en otros medios no cromogénicos, para comprobar la pureza de las cepas en las pruebas de sensibilidad, para la identificación rápida de especies resistentes. Es necesario seguir con rigor las condiciones establecidas por el fabricante. Incubar a 35 °C, en cámara húmeda, oscuridad por 48 a 72 h (no menor a 48 h).	
Agar Harina de Avena	Favorece la esporulación. Recomendable para la identificación de especies de <i>Acremonium spp</i> , <i>Cladosporium spp</i> , <i>Fusarium spp</i> , <i>Paecilomyces spp</i> , <i>Phialophora spp</i> , <i>Scopulariopsis spp</i> , etc. y para la obtención de las formas teleomórficas asociadas.	
Agar de Staib (Guizotia abyssinica), agar semilla de alpiste	Utilizado para aislar <i>Cryptococcus neoformans</i> y <i>Cryptococcus spp</i> . <i>C. neoformans</i> es el único que al metabolizar la <i>Guizotia abyssinica</i> (alpiste), produce melanina originando un color marrón oscuro. El cloranfenicol lo convierte en medio selectivo. También puede ser útil en la diferenciación de <i>Cándida dubliniensis</i> .	
Agar Borelli	Se utiliza para favorecer la conidiación y producción de pigmento de los dermatofitos, particularmente de <i>Microsporum canis</i> .	
Agar Caseína	Se utiliza para diferenciar a <i>Nocardia braziliensis</i> de otras especies de <i>Nocardia</i> , con base a la capacidad de hidrolizar la caseína.	

Agar Papa Zanahoria	Idóneo para estimular la esporulación de hongos miceliares e indicado para la identificación de hongos hifomicetes dematiáceos en general.	
Agar PDA (Agar Glucosado de Papa)	Es un medio utilizado para la estimulación de la formación de conidias, en la preparación de inóculos de hongos miceliares y en la estimulación de producción de pigmentos: rojo en <i>Trichophyton rubrum</i> , rosa salmón en <i>Microsporum audouinii</i> y amarillo en <i>Microsporum canis</i> . Se utiliza con frecuencia en microcultivos para observar las características morfológicas.	
Agar con leche, glucosa y púrpura de bromocresol	Puede utilizarse para la diferenciación de <i>Trichophyton rubrum</i> y <i>Trichophyton mentagrophytes</i> . <i>Trichophyton rubrum</i> melanoide secreta un pigmento que puede parecer alcalinización. El pigmento típico de <i>T. rubrum</i> puede verse a través de la colonia, pero no a través del medio. <i>T. mentagrophytes</i> granular puede necesitar 10 días para originar un positivo claro. <i>Microsporum persicolor</i> crece profusamente pero no alcaliniza	
Agar Agua	Estimula la formación de conidias. Recomendable para hifomicetes de pigmentación oscura (dematiáceos) e incluso para dermatofitos poco o nada esporulados. Favorece la esporulación de hongos saprofitos.	

ELECCIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO DE ACUERDO CON EL TIPO DE MUESTRA

Cultivo de Muestra es de Uña:

Sembrar en Medios SDA y Mycoceel Incubar a 37°C por 15 Dias

Cultivo de Muestra de Sangre:

Sembrar en Caldo Infusion Cerebro Corazon y Agar Infusion Cerebro Corazon Incubar a 30°C por 30 Dias

Cultivo de Muestra de Orina:

Sembrar en Agar SDA y Micocel Incubar a 35-37°C por 48-72 Hrs

Cultivo de Biopsia:

Sembrar en 1 tubo de SDA e incubar a Temperatura Ambiente por 8 Dias

Sembrar en 1 tubo de SDA Incubar a 37°C por 8 Dias

Cultivo De Catéter Y Exudado De Pericatéter

Sembrar en Agar Sangre 35-37°C por 72Hrs

Sembrar en Caldo SDA 35-37°C por 72Hrs

Sembrar en Agar SDA 30°C por 15 Dias

Sembrar en Agar Sabouroud Dextrosa-Palmitico 35-37°C por 15 Dias

Cultivo de Espudo y Secreciones Bronquiales:

Sembrar en 6 tubos SDA/ Cloranfenicol 3% incubar 3 Tubos a Temperatura ambiente y 3 a 37°C/ 45 Dias

Sembrar en 6 tubos Agar Infusion Cerebro Corazon/ Cloranfenicol 3% incubar 3 Tubos a Temperatura ambiente y 3 a 37°C por 45 Dias

Cultivo Líquido Cefalorraquídeo o Cerebroespinal (LCR o LCE):

Sembrar en 2 tubos Agar Infusion Cerebro Corazon incubar 1 a Temperatura ambiente y uno a 37°C durante 4 Semanas

Sembrar en 2 tubos Agar SDA incubar 1 a Temperatura y 1 a 37°C durante 4 Semanas

Sembrar en 2 tubos Agar Semilla de Girasol (Agar Niger Seed) incubar 1 a Temperatura ambiente y uno a 37°C por 4 Semanas

Material:

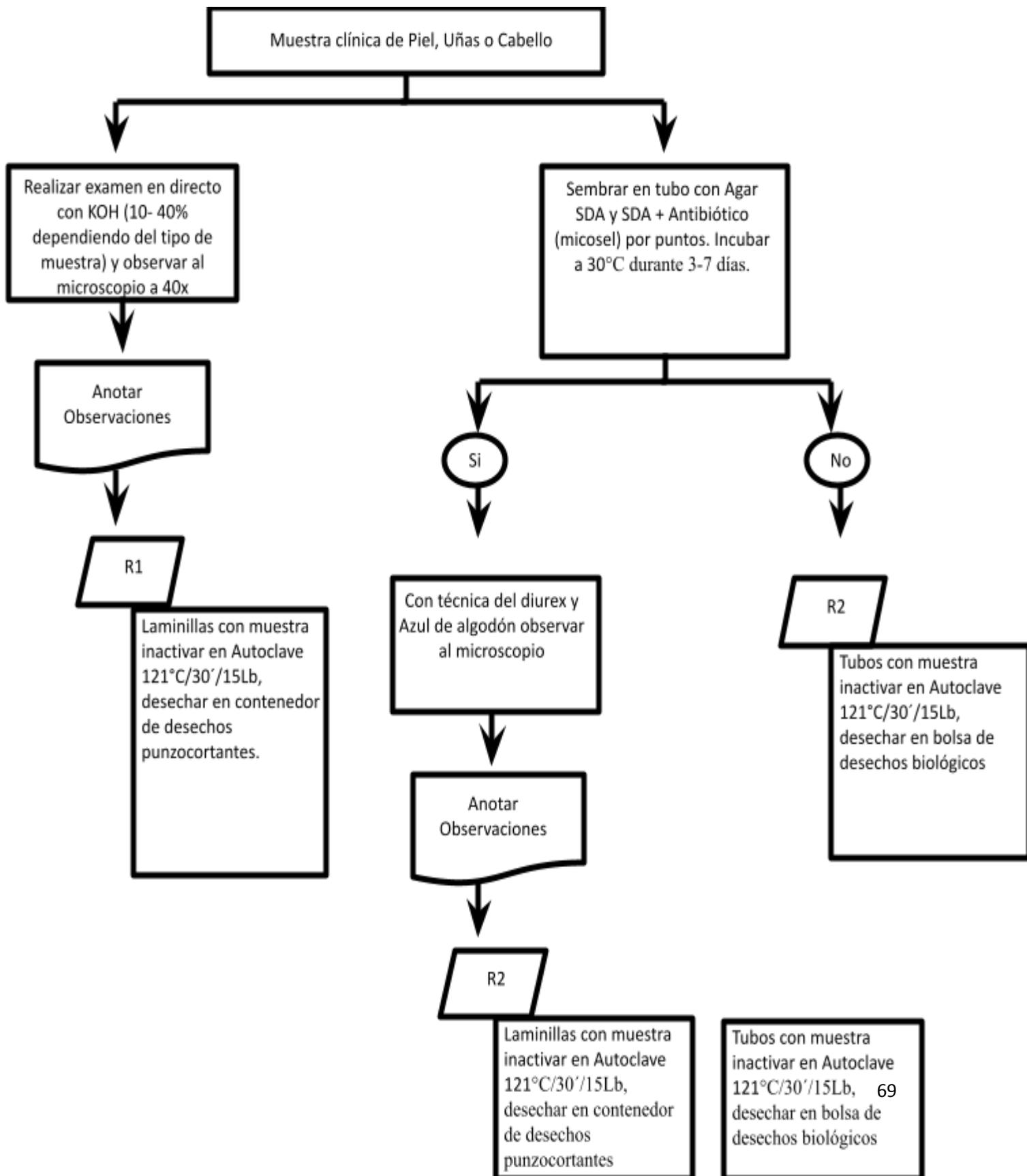
Por persona:

- 1.- Bata Blanca
- 2.- Plumón Indeleble
- 3.- Guantes de látex
- 4.- Lentes de seguridad

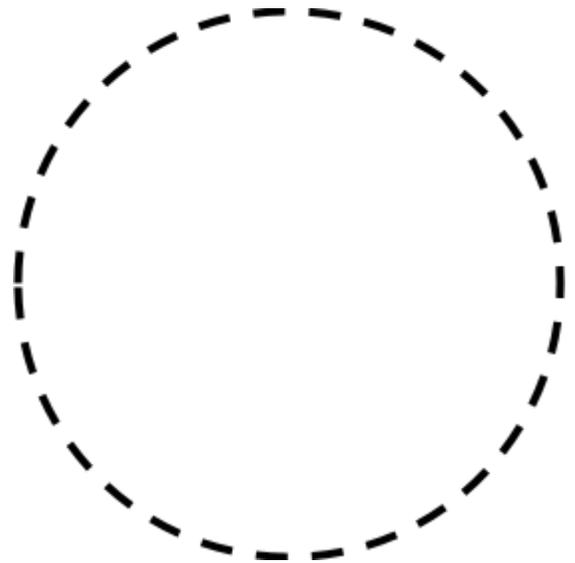
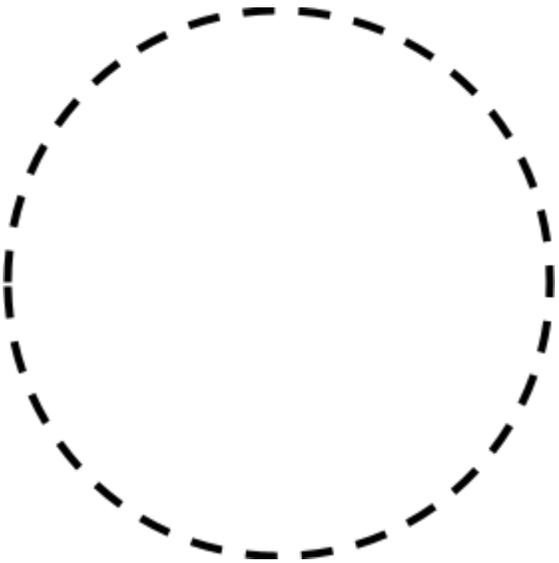
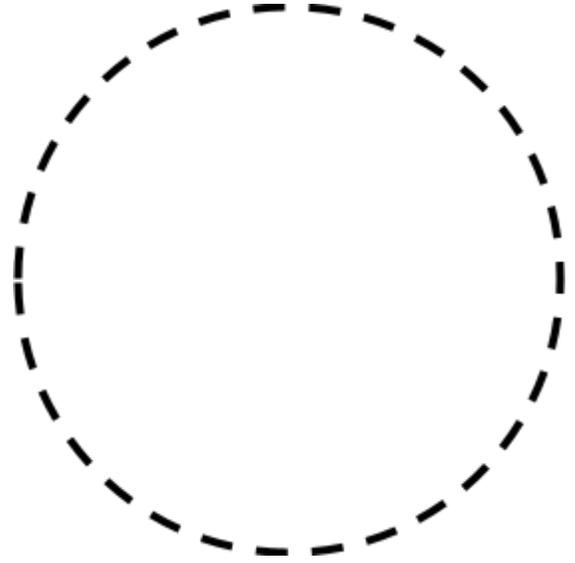
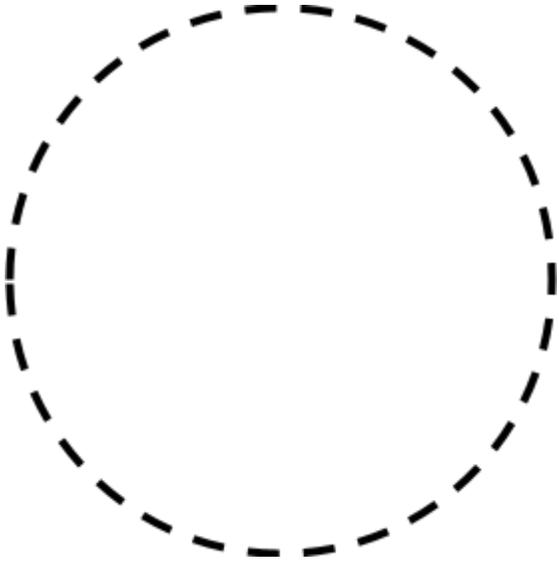
Por Equipo:

- 1.- Portaobjetos
- 2.- Cubreobjetos
- 3.- 2 Hisopos estériles
- 4.- Asa bacteriológica redonda y en forma de L
- 5.- Bisturí con hojas
- 6.- 1 Caja Petri con medio Dextrosa Sabouraud con 1% de aceite
- 7.- Pinzas
- 8.- Benzal 50-70 %
- 9.- 1 Tubo con agua destilada estéril

METODOLOGÍA



RESULTADOS:



CONCLUSIONES:

BIBLIOGRAFÍA:

- Cohen J, Grupta A, Scher R, et al (1998) **The nail and fungus infections** B. Elewski (Ed.), Cutaneous fungal infections (2nd ed.), Blackwell Science Inc., Massachusetts, Oxford, London, Edinburgh.
- Arrese J, Valverde J, Pierard J (2005); **Un nuevo enfoque sobre la epidemiología de las onicomycosis** Rev Iberoam Micol., 22, pp.163-166; [En línea] recuperado de <http://www.reviberoammicol.com/2005-22/163166.pdf>
- Ponka D, Baddar F (2014); **Microscopic potassium hydroxide preparation** Can Fam Physician., 60, p.57; [En línea] recuperado de PMID: [24452564](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24452564/)
- Elewski B (1998); **Onychomycosis: Pathogenesis, diagnosis, and management** Clin Microbiol Rev., 11, pp.415-429; [En línea] recuperado de DOI:10.1128/CMR.11.3.415
- Baran R, Hay R, Haneke E, et al (2006); **Onychomycosis. The Current Approach to Diagnosis and Therapy** (2nd ed.), Taylor & Francis Group, Boca Ratón, Florida; [En línea] recuperado de DOI: [10.1046/j.1365-2133.1998.02449.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.1998.02449.x)
- Hull P, Gupta A, Summerbell R (1998); **Onychomycosis: An evaluation of three sampling methods** J Am Acad Dermatol., 39, pp.1015-1017; [En línea] recuperado de DOI: [https://doi.org/10.1016/S0190-9622\(98\)70281-6](https://doi.org/10.1016/S0190-9622(98)70281-6)
- Negroni R, Guelfand L (1999); **Manual de procedimientos para laboratorios de micología médica** Acta Bioquim Clin L. (Supl 1), pp.5-55 [En línea] recuperado de <http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/Manual%20Hongos.pdf>
- Arechavala A, Bonvehí P., Negroni R, (2006) **Perfil de las onicomycosis basado en 2.106 exámenes micológicos** Dermatol Argent., 12, pp.205-212 [En línea] recuperado de ISSN 1669-1636
- Shenoy M, Teerthanath S., Karnaker V (2008) et al; **Comparison of potassium hydroxide mount and mycological culture with histopathologic examination using periodic acid-schiff staining of the nail clippings in the diagnosis of onychomycosis**; Indian J

Dermatol Venereol Leprol.,74, pp.226-229; [En línea] recuperado de DOI:[10.4103/0378-6323.39584](https://doi.org/10.4103/0378-6323.39584)

- Reisberger E.,Abels C.,Landthaler M,et al (2003);**Histopathological diagnosis of onychomycosis by periodic acid-schiff-stained nail clippings** Br J Dermatol.,148, pp.749-754; [En línea] recuperado de <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2003.05029.x>
- Karimzadegan-Nia M,Mir-Amin-Mohammadi A.,Bouzari N.,et al(2007); **Comparison of direct smear, culture and histology for the diagnosis of onychomycosis** Australas J Dermatol.,48, pp.18-21;[En línea] recuperado de DOI:[10.1111/j.1440-0960.2007.00320.x](https://doi.org/10.1111/j.1440-0960.2007.00320.x)
- Elewski B (1998); **Onychomycosis: Pathogenesis, diagnosis and management** Clin Microbiol Rev,11, pp.415-429; [En línea] recuperado de PMCID:[PMC88888](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10588888/)
- Weinberg J,Koestenblantt E,Tutrone W,et al(2003);**Comparison of diagnostic methods in the evaluation of onychomycosis** J Am Acad Dermatol.,49 pp.193-197; [En línea] recuperado de [https://doi.org/10.1067/S0190-9622\(03\)01480-4](https://doi.org/10.1067/S0190-9622(03)01480-4)

ONICOMICOSIS

La onicomicosis es una enfermedad que puede afectar de forma negativa el estado emocional y social de quien la presenta y generar gastos considerables al sistema sanitario. Por ello es importante que el farmacéutico pueda ofrecer una correcta educación sanitaria al respecto, sobre todo concientizando al paciente sobre la importancia de una buena higiene personal y cumplir exhaustivamente el tratamiento instaurado por el dermatólogo pues de otra forma, se favorece el surgimiento de resistencias de los hongos al tratamiento y de que el problema no se pueda eliminar y se disemine.



Imagen 3.1: Onicomicosis Fuente: <https://sites.google.com/a/goumh.umh.es/quiropodologia---onicomicosis/tipos-de-onicomicosis>

La onicomicosis es la alteración producida por la invasión de hongos patógenos o saprofitos en la estructura ungueal de manos y/o pies. Es la principal causa de enfermedad de la uña en los países desarrollados, en los que representa alrededor del 30-50% de los trastornos ungueales. En su génesis y sus manifestaciones clínicas interviene el estado inmunológico del hospedero. Esta infección puede provenir de la propia uña o de otra infección por hongos en otras localizaciones.

Según diversos estudios, el 30% de las micosis superficiales son onicomicosis. También se considera que las onicomicosis son las micosis superficiales más difíciles de diagnosticar y tratar, por lo que 1 de cada 5 pacientes con un diagnóstico y un tratamiento correcto de la enfermedad no se cura.



Imagen 3.2: Un caso de onicomicosis o infección fúngica en las uñas de los dedos pulgar e índice (Shutterstock)
<https://www.lavanguardia.com/vida/salud/enfermedades-infecciosas/20190706/463313626880/onicomicosis-hongos-dermatofitos-tina-ungueal-canida-albicans-una-pigmentada-una-marron-diabetes.html>

EPIDEMIOLOGÍA

La incidencia de la onicomicosis ha aumentado en los últimos años, lo que se explica por el amplio uso de ropa y zapatos oclusivos, especialmente zapatos deportivos. Según diversos estudios, la prevalencia de esta afección en la población general oscila entre el 2 y el 9%, dependiendo de la región estudiada.

La onicomicosis es una enfermedad fundamentalmente de los adultos, sobre todo de mayores de 55 años. Es poco frecuente en los niños antes de la pubertad, por la menor exposición a ambientes con alta densidad de esporas o hifas (duchas públicas), por el crecimiento más acelerado de la uña, por el menor área de uña susceptible de infección y por la existencia de menos traumatismos ungueales.

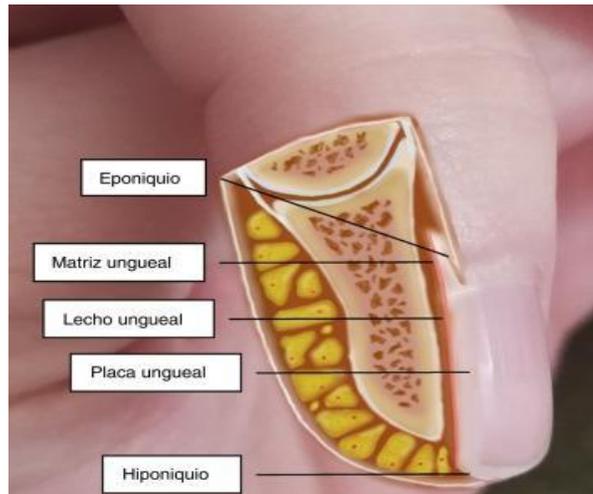


Imagen 3.3: Partes de la uña Fuente: (Matinez P,Ruiz E,Maya J et al (2019); Traumatismo ungueal, ¿qué es? y ¿cómo tratarlo?; Medicina de Familia. SEMERGEN Volume 46, Issue 2, Pages 140-144; [En línea] recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.semerg.2019.05.007>)

La onicomicosis más frecuente es la de los pies, y sobre todo la de la uña del primer dedo, cuando hablamos de dermatofitos o de mohos no dermatofitos. Por otro lado, las infecciones por levaduras del género *Candida*, son más frecuentes en las uñas de las manos y en las zonas del pliegue ungueal.

ETIOLOGÍA DE LAS ONICOMICÓISIS

Las onicomicosis pueden ser clasificadas por factores etiológicos:

- ONICOMICOSIS POR HONGOS DERMATOFITOS

Son los agentes etiológicos más frecuentes (se encuentran en más del 80% de las onicomicosis). Los 3 géneros implicados son *Epidermophyton*, *Trichophyton* y *Microsporum*. Las

especies que con más frecuencia causan onicomicosis son *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Epidermophyton floccosum*.



Imagen 3.4: Onicomicosis por dermatofitos Fuente: Saceda D (2019); Onicomicosis; [En línea] recuperado de <https://www.webconsultas.com/salud-al-dia/onicomicosis/causas-de-la-onicomicosis-13178>)

- ONICOMICOSIS POR LEVADURAS

La especie más frecuente aislada en todo el mundo es *Candida albicans*. Otras especies son la *C. parasilopsis*, *C. tropicalis*, *C. sake*, etc. Representan el 5-20% de todas las onicomicosis. También se han descrito enfermedad en uñas por el género *Malassezia*.

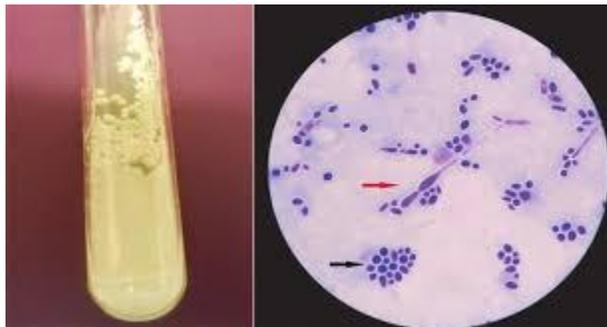


Imagen 3.5: A) Se observan colonias blancas, lisas, brillantes y convexas de *Candida albicans*.; B) Levaduras (flecha negra) y pseudohifas (flecha roja). Fuente: (Lizardo-Castro G, Lizardo A, (2012); PRESENTACIÓN INUSUAL DE ONICOMICOSIS POR *Candida albicans*: [En línea] recuperado de <http://www.bvs.hn/RMH/pdf/2012/pdf/Vol80-2-2012-7.pdf>)

- Onicomicosis por mohos no dermatofitos (oportunistas)

Hay 2 tipos de mohos no dermatofitos que pueden causar onicomicosis: los mohos hialinos y los mohos dermatiáceos. Si se presentan asociados a dermatofitos y/o levaduras se consideraran agentes contaminantes. Al no tener queratinasas no se considerarán patógenos primarios (excepto *Scytalidium dimidiatum* y *Fusarium solana*), sino que son especies invasoras secundarias de uñas alteradas o comensales secundarios no invasores. Los más frecuentes son el género *Aspergillus* y el *Fusarium*. La frecuencia de las onicomicosis causadas por este grupo oscila entre el 1 y el 5%, según las series.

Los hongos dermatofitos suelen causar infecciones primarias, mientras que las levaduras y los hongos saprofitos suelen causar invasiones secundarias a enfermedades previas de la uña o traumatismos.

Clasificación morfológica

Las onicomicosis también se pueden clasificar por criterios patogénicos y morfológicos, con una clínica característica en cada grupo.

Onicomicosis subungueal distal y lateral

La subungueal distal y lateral es la variedad clínica más frecuente de onicomicosis (fig. 1). La invasión micológica se inicia en el hiponiquio y en el borde distal y lateral de la lámina ungueal. La progresión de la enfermedad se produce de forma lenta hacia la parte proximal de la uña.

Suele observarse una superficie estriada o deprimida con una mancha blanco-amarillenta que se extiende hacia la parte proximal de la uña. Posteriormente aparece una hiperqueratosis subungueal con engrosamiento de la lámina y finalmente una distrofia de la uña que se vuelve friable.

La onicomicosis subungueal distal y lateral suele estar producida por dermatofitos, el más frecuente de los cuales suele ser *Trichophyton rubrum*.

Onicomicosis subungueal proximal

Es la forma clínica de onicomicosis menos frecuente. Suele iniciarse con la invasión del pliegue proximal de la uña, que pasa a la lámina ungueal y posteriormente migra distalmente afectando la matriz ungueal.

Suele presentarse con hiperqueratosis subungueal, leuconiquia y onicolisis proximal. Puede afectar a las uñas de los pies y de las manos y el principal agente causal suele ser *T. rubrum*, aunque también se observan con cierta frecuencia diversas especies de *Cándidas*.

Onicomicosis blanca superficial

Se caracteriza por la invasión de la parte más superficial de la lámina ungueal en cualquier zona de la uña (fig. 2). Suele producirse en las uñas del primer dedo del pie y representa menos del 10% de las onicomicosis.

Cursa con manchas blancas opacas de bordes irregulares que se van extendiendo progresivamente hasta que la uña se vuelve blanda y quebradiza. La infección puede llegar a afectar al hiponiquio.

La onicomicosis blanca superficial suele estar producida por dermatofitos, el más frecuente de los cuales suele ser *Trichophyton mentagrophytes*.

Onicodistrofia total

Es el estadio final de cualquier tipo de onicomicosis. La matriz ungueal resulta afectada y toda la uña se destruye formando masas hiperqueratósicas. Cualquier tipo de hongo puede producirla, en especial los dermatofitos.

Imagen 3.6: Clasificación morfológica de la onicomicosis Fuente: (Dalmaya J, Roéa E, Corellaa F,(2006); Onicomicosis; Vol. 20. Núm. 10.páginas 62-66; [En línea] recuperado de <https://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-articulo-onicomicosis-13095632>)

El diagnóstico de la onicomicosis es clínico, epidemiológico y micológico. El diagnóstico clínico es relativamente fácil con la experiencia y en presencia de lesiones típicas ungueales como las descritas anteriormente. Sin embargo, las onicomicosis pueden ser confundidas con una amplia serie de afecciones que se revisan en el apartado de diagnóstico diferencial. Por esta razón, ante la sospecha de una onicomicosis, hay que realizar un cultivo micológico, ya que la identificación del hongo en el laboratorio nos proporcionará la seguridad del diagnóstico.

En la mayoría de los casos los síntomas no están necesariamente asociados al dolor. La persona afectada tan sólo siente molestias, un ligero picor y un cambio estético progresivo del estado de sus uñas. Esta es la principal razón por la que no acuden al dermatólogo hasta que el estado de la afectación ungueal es avanzado y hay un cambio evidente en su forma y apariencia.

El cultivo micológico es indispensable y el estándar de oro para determinar el agente etiológico. En la actualidad se dispone de una gran variedad de medios de cultivo preparados

comercialmente, aunque los más utilizados suelen ser los medios simples y los enriquecidos con antibióticos Sabouraud glucosado, agar sangre-cisteína.

Para el diagnóstico de onicomicosis no se recomienda el examen directo con microscopio óptico de muestras ungueales con hidróxido potásico, ya que es lento y de difícil valoración para personal con poca experiencia en la observación de estructuras fúngicas.

Otras técnicas que se pueden utilizar para la identificación del hongo causante de onicomicosis son el examen histológico, la inmunohistoquímica, la citometría de flujo y la microscopía corporal *in vivo*, aunque estas técnicas son muy caras y no están disponibles en la mayoría de centros dermatológicos.

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Existen muchas alteraciones ungueales que pueden presentar características similares a las de la onicomicosis desde un punto de vista médico. Entre estas alteraciones se cuentan: la psoriasis, el liquen plano, las infecciones bacterianas, la onicodistrofia traumática, tumores del lecho ungueal, la dermatitis de contacto, la onicolisis idiopática, la onicolisis por productos cosméticos con formaldehído y el síndrome de las uñas amarillas.

La confusión con otras afecciones dermatológicas, la difícil identificación del hongo causal y la lenta respuesta al tratamiento provoca grandes dificultades a la hora de efectuar un diagnóstico correcto de esta alteración.

TRATAMIENTO

La onicomicosis es una enfermedad que afecta marcadamente la calidad de vida y el bienestar psicosocial del paciente, comprometiendo su actividad diaria, tanto laboral como social. Por otro lado, es una enfermedad que no se resuelve espontáneamente y es altamente contagiosa, por lo que el dermatólogo prescribirá siempre un tratamiento, aunque sea prolongado, difícil y costoso. Además, la lenta respuesta provoca múltiples abandonos y desalienta a los pacientes favoreciendo la aparición de resistencia en los hongos.

La efectividad del tratamiento depende de múltiples factores, de entre los que hay que destacar:

La edad del paciente.

El agente etiológico.

El número de uñas afectadas y la localización (manos, pies o ambos).

El compromiso de la matriz o de los bordes laterales ungueales.

El grado de engrosamiento de la uña.

- La ocupación del paciente.

- El estado inmunológico del paciente.

El tratamiento de las onicomicosis suele tener entre un 5 y un 25% de fracasos terapéuticos, dependiendo de los estudios seleccionados. Esta falta de respuesta al tratamiento puede ser debida al incumplimiento del tratamiento de forma parcial o completa, a las reinfecciones y a la farmacocinética de algunos fármacos.

Por esta razón la elección de un tratamiento correcto es de gran importancia. Se deben combinar las medidas no farmacológicas con los tratamientos tópicos y/o sistémicos, dependiendo del agente etiológico, la edad del paciente, las interacciones farmacológicas y el tipo de afectación fúngica de la uña.

MEDIDAS NO FARMACOLÓGICAS

Las onicomicosis se suelen producir en presencia de factores predisponentes que facilitan el desarrollo y crecimiento de las colonias de hongos. Es importante intentar evitar la aparición de estos factores. Estas medidas serán preventivas si nos encontramos en ausencia de clínica, o coadyuvantes al tratamiento específico cuando existe enfermedad.

Las medidas más importantes que se deben tomar para prevenir las onicomicosis son:

Tener una buena higiene personal.

Utilizar calcetines de algodón 100% y prendas de calzado transpirables y no oclusivas.

Evitar el traumatismo ungueal repetido.

Mantener secos los pies durante todo el día, sobre todo entre los dedos.



Imagen 3.7. Onicomicosis subungueal distal y lateral, con paroniquia aguda en el primer dedo Fuente: (Fuente: (Dalmaya J, Roéa E, Corellaa F,(2006); Onicomicosis; Vol. 20. Núm. 10.páginas 62-66; [En línea] recuperado de <https://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-articulo-onicomicosis-13095632>)



Imagen 3.8. Onicomicosis subungueal distal y lateral combinada con foco de onicomicosis blanca Fuente: (Fuente: (Dalmaya J, Roéa E, Corellaa F,(2006); Onicomicosis; Vol. 20. Núm. 10.páginas 62-66; [En línea] recuperado de <https://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-articulo-onicomicosis-13095632>)

MEDIDAS FARMACOLÓGICAS

TRATAMIENTO TÓPICO

El tratamiento tópico es cómodo, fácil de aplicar y no tiene efectos secundarios pero actualmente sólo se utiliza como monoterapia en onicomicosis blancas superficiales con menos del 50% de la lámina ungueal afectada y en pacientes en los que esté contraindicado el tratamiento sistémico. También se utiliza como coadyuvante de la terapia sistémica en el resto de onicomicosis y se utilizan principalmente los siguientes agentes:

- Ciclopiroxolamina. De acción fungicida, amplio espectro, buena potencia y rapidez de acción.
- Amorolfina (morfolinas). De acción fungistática. Interfiere en la síntesis del ergosterol, que es un componente fundamental de la membrana celular del hongo. Muy específico de onicomicosis. Posee un amplio espectro de acción.
- Imidazoles. Incluyen: miconazol, clotrimazol, econazol, bifonazol, ketoconazol, tioconazol, terconazol, sertaconazol, flutrimazol y el nuevo erbeconazol. Tienen acción fungistática, aunque algunos a altas concentraciones tienen efecto fungicida. Inhiben la síntesis del ergosterol. Tienen un amplio espectro de acción.
- Tiazoles. Presentan los mismos efectos y el mismo espectro de acción que los imidazoles.
- Terbinafina (alilaminas). De acción fungicida, tiene un amplio espectro por vía tópica. Es el grupo de más reciente aparición.
- Tolnaftato (tiocarbamatos). De acción fungistática, actualmente está en desuso.
- Nistatina (polienos). Es un antibiótico efectivo tópicamente sólo frente a las candidas. No sirve para el tratamiento de onicomicosis por dermatofitos.

-Clioquinol. Es activo frente a las candidas y frente a algunas bacterias. No es activo frente a los dermatofitos.

Lacas

Los tratamientos tópicos se han utilizado en forma de crema, ungüento y solución, pero ninguna de estas presentaciones tiene una buena difusión en la lámina ungueal, por lo que el descubrimiento de la laca como forma farmacéutica ha sido un avance muy importante para el tratamiento de las onicomicosis, ya que este vehículo permite que el fármaco contacte con la uña durante más tiempo, siendo la liberación del fármaco lenta, sostenida y en concentraciones adecuadas.

Entre las presentaciones en laca, los 2 fármacos más utilizados actualmente y con una eficacia elevada y comparable son la amorolfina y la ciclopiroxolamina. Ambos son fungicidas y presentan un amplio espectro, siendo efectivos contra los dermatofitos, las levaduras y los otros hongos filamentosos.

La amorolfina se utiliza en laca de uñas al 5% y se debe aplicar 1-2 veces por semana durante un período de 6-12 meses.

La ciclopiroxolamina se presenta en laca al 8% y se debe aplicar a días alternos durante el primer mes, disminuyendo progresivamente el número de aplicaciones hasta llegar a una vez por semana. El tratamiento nunca debe durar más de 6 meses.

En resumen, el tratamiento tópico con amorolfina o ciclopiroxolamina en laca de uñas únicamente debe utilizarse como monoterapia en onicomicosis sin hiperqueratosis y que no afecten ni la matriz ungueal ni más del 50% de la uña. Este tratamiento debería durar 6-12 meses. Para el resto de onicomicosis, estos 2 fármacos son buenos tratamientos coadyuvantes al sistémico durante un mínimo de 6 meses.

TRATAMIENTO SISTÉMICO

Los tratamientos sistémicos clásicos son la griseofulvina y el ketoconazol. Actualmente ambos fármacos se han eliminado del arsenal terapéutico en las onicomicosis, ya que son poco efectivos, presentando una elevada tasa de recidivas y efectos secundarios. Además, los tratamientos eran muy largos.

Los nuevos antimicóticos (itraconazol, fluconazol y terbinafina) tienen menos efectos secundarios, el período de tratamiento es más corto y presentan una penetración en la matriz ungueal más rápida y persistente en el tiempo, con un efecto terapéutico más prolongado (hasta 6-7 meses).

Estos son los nuevos antimicóticos sistémicos, las dosis a las que se han de utilizar y el tiempo de tratamiento:

-Itraconazol. Antifúngico fungicida de amplio espectro que actúa frente a dermatofitos, cándidas y pitiriasis. Su administración sistémica es exclusivamente oral. Se metaboliza en el hígado y su excreción se produce principalmente a nivel cutáneo. Su nivel de concentración en uñas permanece hasta 6 meses después de haber finalizado el tratamiento.

Tiene pocos efectos adversos y suelen ser de carácter leve: náuseas, dispepsia y dolor abdominal, aunque últimamente se han descrito algunos casos de hepatitis tóxica grave.

El mayor problema de este fármaco son las interacciones farmacológicas con diversos medicamentos como la simvastatina, la lovastatina, la terfenadina, el astemizol, la cisaprida, el midazolam, el triazolam, la quinidina, la ciclosporina, los hipoglucemiantes orales, la quinina, la digoxina y la pimozida.

La pauta clásica es la administración continua de 200 mg/día de itraconazol durante 6 semanas (onicomicosis de manos) o 12 semanas (onicomicosis de pies), aunque esta pauta se ha sustituido en la actualidad por una intermitente de 200 mg/12 horas 1 semana al mes durante 2 meses (manos) o 3 meses (pies). No existen diferencias significativas de eficacia entre las dos pautas anteriores, por lo que se recomienda la intermitente, ya que produce menos efectos secundarios.

El itraconazol produce una curación micológica del 80-85%, con un porcentaje de recaídas del 10%.

-Fluconazol. Es un antifúngico fungicida de amplio espectro que se une menos a la queratina que el itraconazol. Se puede administrar por vía oral o parenteral. Prácticamente no es metabolizado y se elimina por la orina, detectándose niveles altos en la piel hasta 10 días después de finalizar el tratamiento.

Tiene efectos secundarios gastrointestinales leves hasta en un 15% de los pacientes y presenta interacciones con las sulfonilureas, la warfarina, la fenitoína, la rifampicina y las benzodiazepinas.

Se administra de forma pulsátil con una dosis semanal de 150 o 300 mg durante 6 meses para las uñas de los pies, y durante 3 meses para las uñas de los dedos de las manos.

El fluconazol produce una curación micológica del 90-95%, con un porcentaje de recaídas del 20%.

-Terbinafina (alilaminas). Es un antifúngico con gran eficacia frente a los dermatofitos, pero con poca acción sistémica sobre las cándidas. Las concentraciones en la uña son similares a las del plasma y permanecen durante meses después de haber finalizado el tratamiento. Se metaboliza en el hígado y se excreta por la orina.

Tiene efectos secundarios gastrointestinales leves y, a diferencia de los anteriores, presenta muy pocas interacciones medicamentosas.

TRATAMIENTO COMBINADO

El tratamiento combinado, usando un antifúngico por vía sistémica y un antifúngico tópico en forma de laca de uñas ha demostrado mejores resultados que la utilización de cada tratamiento de forma separada. No se recomienda la utilización de 2 o más antifúngicos sistémicos por el riesgo de efectos secundarios graves.

Según diversos estudios, el tratamiento que obtiene mejores resultados, alcanzando una curación micológica superior al 95%, es la asociación de itraconazol oral en pauta pulsátil con amorolfina al 5% en laca de uñas o, si hay hiperqueratosis ungueal, el bifonazol asociado a urea en laca de uñas.

Se administra a dosis de 250 mg/día durante 12 semanas para las uñas del pie y durante 6 semanas para las uñas de los dedos de la mano. La terbinafina produce una curación micológica del 70-80%.

En grandes hiperqueratosis ungueales muchos autores recomiendan, además del tratamiento sistémico, la utilización de un antimicótico (por ejemplo, el bifonazol) en combinación con urea en laca de uñas para mejorar la penetración del fármaco e ir reduciendo la masa ungueal.

Un tema controvertido es la extracción de la uña antes de iniciar el tratamiento. Es una medida dolorosa y que en los diversos estudios analizados no aporta mayor eficacia en el tratamiento, por lo que únicamente cabe recomendar una extracción química con urea al 40% y posteriormente tratamiento tópico en aquellos pacientes que por algún motivo no puedan recibir la terapia sistémica.

Hasta la fecha no existe un agente terapéutico que por sí solo obtenga un éxito del 100% de efectividad, por esta razón, la asociación de un agente antifúngico sistémico con otro en laca de uñas durante 3 y 6 meses es el tratamiento más efectivo para las onicomycosis, tanto de pies como de manos.

Una vez finalizado el tratamiento, es importante realizar una valoración de la curación clínica (desaparición de las lesiones) y una valoración de la curación micológica (negativización de los cultivos).

Material:

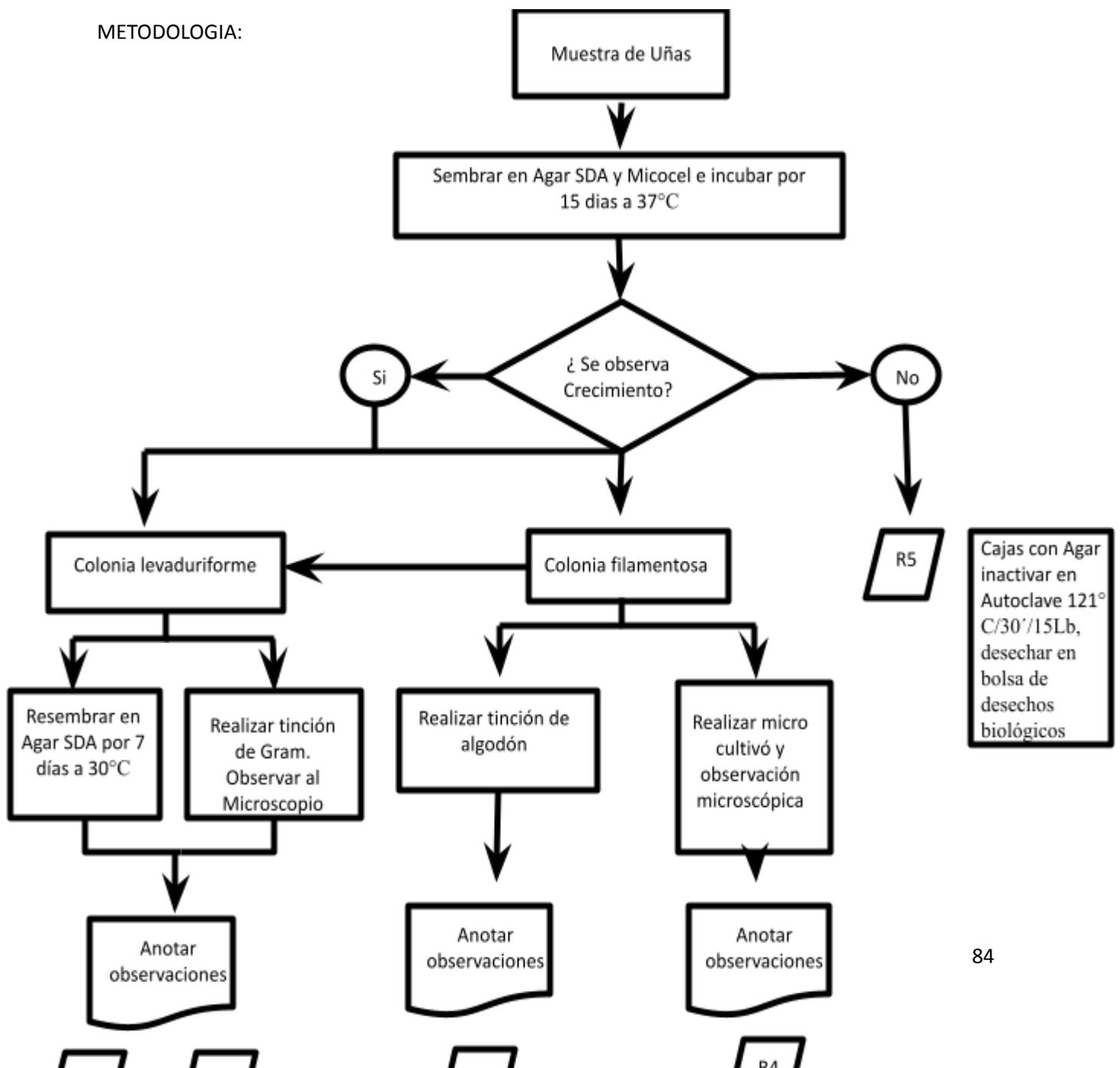
Por persona:

- 1.- Bata Blanca
- 2.- Plumón Indeleble
- 3.- Guantes de látex
- 4.- Lentes de seguridad

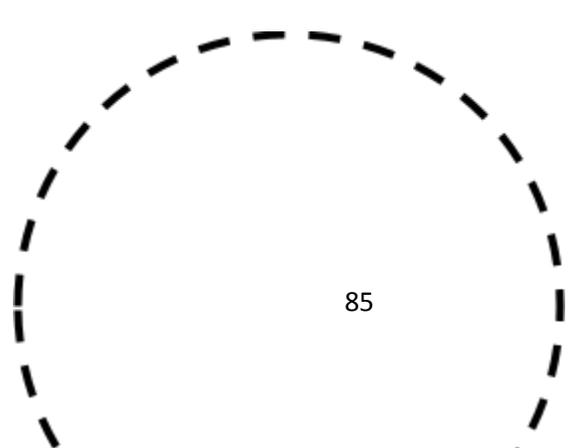
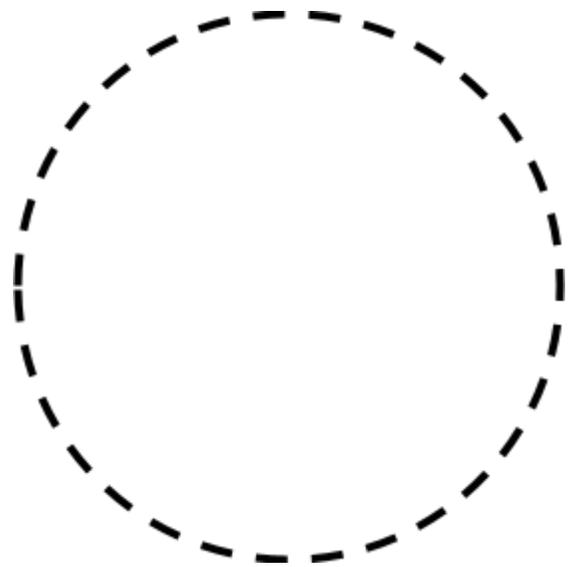
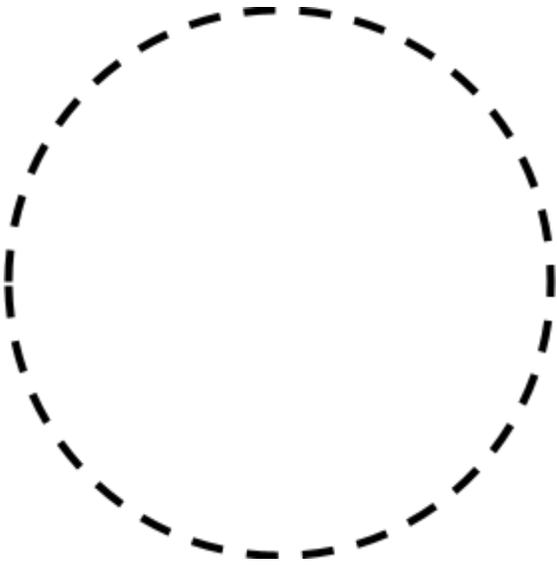
Por Equipo:

- 1.- Portaobjetos
 - 2.- Cubreobjetos
 - 3.- 2 Hisopos estériles
 - 4.- Asa bacteriológica redonda y en forma de L
 - 5.- Bisturí con hojas
 - 6.- 1 Caja Petri con medio Dextrosa Sabouraud con 1% de aceite
- Cultivo de Muestra es de Uña:
- Sembrar en Medio SDA y MycoCel e Incubar a 37°C por 15 Dias
- 7.- Pinzas
 - 8.- Benzal 50-70 %
 - 9.- 1 Tubo con agua destilada ESTÉRIL

METODOLOGIA:



RESULTADOS:



CONCLUSIONES:

BIBLIOGRAFÍA:

- Blanco S, Torrelo A, Zambrano A (2001) Onicomycosis en la infancia. *Piel*. Vol. 16. Núm. 10. páginas 511-516; [En línea] recuperado de <https://www.elsevier.es/es-revista-piel-formacion-continuada-dermatologia-21-articulo-onicomycosis-infancia-13023410>
- Dalmaya J, Roéa E, Corellaa F,(2006); Onicomycosis; Vol. 20. Núm. 10.páginas 62-66; [En línea] recuperado de <https://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-articulo-onicomycosis-13095632>).
- Elewski BE, Hay RJ, (1996) Update on the management of onychomycosis: highlights of the Third Annual International Summit on Cutaneous Antifungal Therapy. *Clin Infect Dis*;23:305-13; [En línea] recuperado de DOI:[10.1093/clinids/23.2.305](https://doi.org/10.1093/clinids/23.2.305)
- Elewski BE. (2000) Onychomycosis Treatment, Quality of Life, and Economic Issues. *Am J Clin Dermatol.*;1:19-26; [En línea] recuperado de DOI<https://doi.org/10.2165/00128071-200001010-00002>
- Elewski BE.(1998) Onychomycosis: pathogenesis, diagnosis, and management. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11:415-29; [En línea] recuperado de DOI:10.1128/CMR.11.3.415
- Hecker D, (1997) Current trends in onychomycosis therapy: a literature review. *Mt Sinai J Med.*; 64:399-405; [En línea] recuperado de <https://europepmc.org/article/med/9364835>
- Odom RB (1996); New therapies for onychomycosis. *J Am Acad Dermatol.* 1996;35:S26-30; [En línea] recuperado de DOI:[10.1016/s0190-9622\(96\)90067-5](https://doi.org/10.1016/s0190-9622(96)90067-5)

- Ribera M, Iglesias C, Zsolt I et al (2005); Estudio farmacoeconómico del tratamiento de la onicomicosis con lacas ungueales antifúngicas en España. Piel. Vol. 20. Núm. 4.páginas 160-166; [En línea] recuperado de DOI: 10.1016/S0213-9251(05)72253-X

DERMATOFITOSIS

Los dermatofitos son hongos hialinos, con dos propiedades fundamentales queratinolítica y queratinofílica. Estos factores le proporcionan al hongo la capacidad de digerir y utilizar la queratina de la piel y anexos.



Imagen 4.1: Dermatitis en manos Fuente: (Harrison GJ, Harrison LR,(1986) Clinical avian medicine and surgery. Philadelphia: W.B. Saunders; Uncommon mycoses; p. 467.

Los dermatofitos están estrechamente relacionados, cuyos ancestros, aparentemente existen desde la era Paleozoica. Esta teoría fue descrita por el Dr. Greer DL en su artículo acerca de la evolución de estos hongos. Robert Remark, Johann Lucas Schoenlein, David Gruby y Raimond Jaques Adrien Sabouraud, contribuyeron de manera significativa en el estudio de los dermatofitos, en los aspectos morfológicos, fisiológicos y la introducción de los géneros y especies, algunos usados en la actualidad. D. Gruby presentó la dermatofitosis denominada “Favus” como “*la vraie teigne*” (la verdadera tiña), ante la Academia de Ciencias en París (1841), basado en la apariencia clínica de la enfermedad; también reafirmó que la estructura parasitaria era de origen fúngico, antes descrita por JL Schoenlein y la demostración de una alta contagiosidad de esta infección. Después de múltiples observaciones microscópicas describió los tipos de parasitación del pelo:

ectotrix y endotrix, así como la introducción del género y especie *Microsporum audouinii*. Este nombre binomial es considerado el más antiguo de los dermatofitos (1853). R. Remak en 1845, acuñó el nombre *Achorion schoenleinii* para el agente etiológico de la tiña fávica. Las contribuciones de RJA Sabouraud se basaron en la observación de la estructura parásita en las escamas y la obtención de las colonias de los dermatofitos crecidos en el medio de cultivo para hongos, el cual lleva su nombre (agar dextrosa de Sabouraud). Por otro lado, la estandarización de las condiciones de crecimiento y la descripción de los cuatro géneros de dermatofitos: *Epidermophyton*, *Achorion*, *Microsporum* y *Trichophyton*. Después de 20 años de la publicación de los cuatro géneros de dermatofitos, se simplificaron en tres, eliminando *Achorion*.

El diagnóstico se realiza principalmente mediante el examen directo, de las escamas y pelos parasitados, usando sustancias como el hidróxido de potasio (KOH) e hidróxido de sodio (NaOH) a diferentes porcentajes (10, 15, 20%), estas son soluciones que aclaran y digieren el material de queratina, sin dañar la estructura parásita del dermatofito, de tal manera que facilitan la visualización de las hifas hialinas, ramificadas y septadas y permiten distinguir la estructura del hongo de la del pelo.

Los pelos parasitados pueden mostrar parasitación ectotrix, endotrix y fávica (Imágenes 4.2 y 4.3). La parasitación ectotrix, el exterior del tallo del pelo está cubierto por conidios, formando una vaina (*M. canis*). En la parasitación endotrix, la masa de conidios o arthroconidios se encuentran en el interior del pelo (*T. tonsurans*). En la parasitación tipo fávica se observa hifas largas intrapilares, por acción del KOH se liberan burbujas de aire a lo largo del axis del pelo, fenómeno que no se presenta con el uso de azul de algodón (*T. schoenleinii*).



Imagen 4.2: Examen directo con KOH donde se observa un pelo parasitado de forma exotrix con un hongo, se observan las estructuras de forma externa. Fuente: (Pestanaal J, Carmo A, Ribeiro J, (2019); Chronic invasive rhinosinusitis by *Conidiobolus coronatus*, an emerging microorganism *Journal de Mycologie Médicale* Volume 29, Issue 1, Pages 67-70; [En línea] recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2018.12.004>)

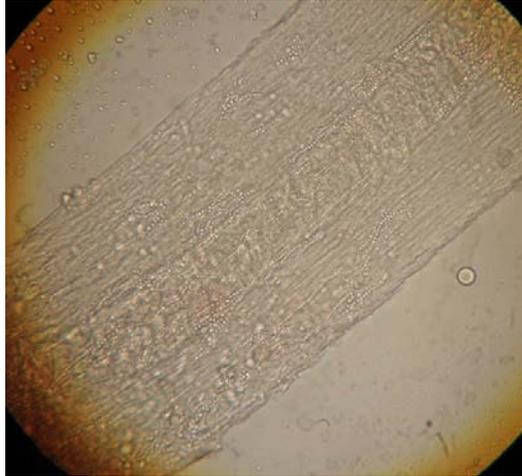


Imagen 4.3: Examen directo con KOH donde se observa un pelo parasitado de forma endotrix con un hongo, se observan las estructuras de forma interna. Fuente: (Pestanaa1 J, Carmo A, Ribeiro J, (2019); Chronic invasive rhinosinusitis by *Conidiobolus coronatus*, an emerging microorganism *Journal de Mycologie Médicale* Volume 29, Issue 1, Pages 67-70; [En línea] recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2018.12.004>)

MORFOLOGÍA DE LOS TRES GÉNEROS DE LOS DERMATOFITOS

Existe un grupo de hongos queratinofílicos que por tradición han sido llamados dermatofitos. Esta palabra deriva del griego “dermato” piel y del sufijo “phyto” vegetal. Los dermatofitos se dividen en tres géneros que se distinguen por las características de sus macroconidios: el género *Trichophyton* tiene macroconidios alargados cuya porción distal es redondeada, de pared delgada y lisa, miden de 8 a 50 μm , el número de septos va de 4 a 6. Los macroconidios del género *Microsporum* en forma de huso o fusiformes, de pared gruesa, rugosa, con hoyuelos o prominencias que semejan tubérculos denominados equínulas, miden de 8 a 15 μm , multiseptados (5 a 15 septos). Los macroconidios del género *Epidermophyton* nacen solos o en racimos, en forma que semejan un mazo o baston, redondeados en su polo distal, de pared gruesa y lisa, miden de 7 a 12 μm , con 4 septos transversos.



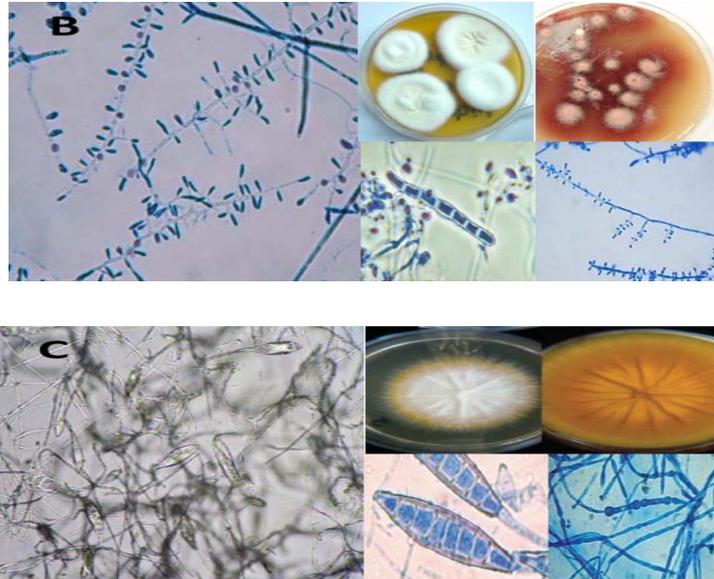


Imagen 4.4: A) Características Macroscópicas: Es una colonia de crecimiento moderado (10 a 14 días), de color verde oliva, al comienzo es bultosa y escasa, después se vuelve plegada y radiada, el reverso es al principio anaranjado y se vuelve café-marrón. (Larone, 2011. Arenas, 2008) Colonias verde oliva (caqui), radiadas pero con un centro bultoso levemente plegadas. Agar micosel. (Tangarife, 2011) A la izquierda los macroconidios con extremo redondeado, de pared gruesa sin espiculas, se forman en los extremos de las hifas y algunas veces forman racimos. A la derecha el micelio de una colonia vieja, en la que muchos macroconidios se convirtieron en clamidoconidios.

(Tangarife, 2011) B) Características Macroscópicas: Crecimiento moderado, de color blanco con difusión de pigmento, la colonia es vellosa, algodonosa o granulosa y plana, en el reverso se observa un color rojo sangre. (Arenas, 2008) en el cual se observa la difusión de pigmento más marcada; las colonias blancas, vellosas, de color blanco (con el tiempo se vuelven rosas) (Tangarife, 2011) Características Microscópicas: Presenta un micelio septado, hialino, microsifonado, ramificado; presenta numerosos microaleurioconidios, en forma de gota o piriformes, alternados en los dos lados de las hifas; en el extremo de las hifas presenta artroconidios, que son la formación de los macroconidios (son escasos o ausentes regularmente), tienen forma de "puro", es decir son alargados (hasta $60\mu\text{m}$) con un extremo redondeado, de 4 a 10 divisiones de paredes delgadas y lisas, hialinos. (Larone, 2011. Bonifaz, 2012). C) Características Macroscópicas: Colonias de crecimiento moderado de 6 a 10 días, blanco-amarillentas, vellosas, planas, radiadas o lanosas; el reverso suele ser amarillo oscuro. (Arenas, 2008. Larone, 2011) Características Microscópicas: Presentan un micelio septado, hialino, microsifonado, ramificado, algunas veces, presentan hifas en modalidad de raquetas; con numerosos macroconidios largos (hasta $110\mu\text{m}$), ahusados, de pared gruesa, equinulados, con los extremos puntiagudos, con más de seis septos; la variedad *M. canis* var. *distortum*, presenta los macroconidios pero de forma irregular, y con menos septos. (Bonifaz, 2012. Larone, 2011) los macroconidios con extremos puntiagudos, ahusados, con más de 6 septos, equinulados, hialinos de pared gruesa y a la derecha, el micelio con algunas hifas en raquetas (como huesos unidos). Azul de algodón, 40x. (Bonifaz, 2012)

ECOLOGÍA

Los dermatofitos se dividen en tres grupos ecológicos con base en su hábitat natural, la preferencia y especificidad por el hospedero se ha atribuido a las diferencias en su afinidad por la queratina de cada uno.

1) ANTROPOFÍLICO (del griego *anthrōpos*, hombre y *philico*, afinidad). Grupo de dermatofitos que parasitan el tejido humano. Se ha descrito que estas especies evolucionaron de los hongos zoofílicos y gradualmente fueron perdiendo su afinidad por la queratina del animal.

En el proceso de evolución, este grupo de dermatofitos han presentado cambios en su capacidad de reproducción. Por tanto, la producción de conidios va disminuyendo, lo que lleva a una alta simplificación morfológica y la pérdida de la reproducción teleomorfa. Es común que se observe polimorfismo morfológico por lo que se han reconocido variedades de especie, por

ejemplo *Trichophyton rubrum*. Este dermatofito presenta la mayor prevalencia en la población urbana, especialmente en ciudades desarrolladas, debido al uso de zapato cerrado, lo cual conduce a cambios en el microambiente, por el aumento en el calor y la humedad de los pies. También es la especie que causa principalmente infecciones crónicas, aparentemente atribuidas a la presencia de aminoácidos como lisina, leucina, asparagina e histidina en el sudor. Los dermatofitos antropofílicos son comúnmente transmitidos a partir de lesiones activas de otro individuo, de manera directa o indirecta a través de peines, calcetines, zapatos, ropa de cama, toallas, etc.

Los géneros y especies más importantes son: *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton violaceum*, *Trichophyton interdigitale*, *Microsporum audouinii* y *Epidermophyton floccosum*. En casos excepcionales *M. audouinii* y *T. rubrum* también han sido aislados de escamas y pelos de animales.

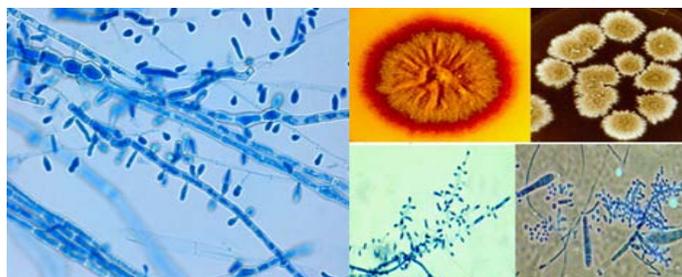


Imagen 4.5: *T. tonsurans* Microscópicamente, las macroconidias son escasas, se suelen disponer individualmente, casi nunca agrupadas.

Tienen una pared fina y lisa, en forma de cigarro, huso o cilindro y presentan de 1 a 12 septos. Las microconidias suelen ser muy abundantes, con forma globosa, piriforme o alargada y se disponen individualmente a lo largo de los lados de las hifas o agrupadas en racimos, pudiendo ser sésiles o pedunculadas. El aspecto macroscópico de este género es variable y presenta diferencias entre las distintas especies, por lo que las colonias pueden ser pulverulentas, algodonosas, cerebriformes, velludas. El reverso de éstas puede mostrar una pigmentación rojiza o marrón. Fuente: (Molina de Diego A (2009) *Enferm Infecc Microbiol Clin*;29(Supl 3):33-39; [En línea] recuperado de <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/micologia/ccs-2009-micologia.pdf>, Rebell and Taplin (1970), Ajello (1972), Vanbreusegham et al. (1978), Rippon (1988), McGinnis (1980), Domsch et al. (1980), Kane et al. (1997) and de Hoog et al. (2000, 2015)



Imagen 4.6: *T. rubrum* produce una colonia lisa, granular o algodonosa de color blanco o crema y en el reverso presenta un característico pigmento rojo que le da el nombre (*rubrum*), presenta escasas macroconidias y las microconidias tienen forma de maza, son piriformes o alargadas. (Fuente: (Molina de Diego A (2009) *Enferm Infecc Microbiol Clin*;29(Supl 3):33-39; [En línea] recuperado de <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/micologia/ccs-2009-micologia.pdf>, Rebell and Taplin (1970), Ajello (1972), Vanbreusegham et al. (1978), Rippon (1988), McGinnis (1980), Domsch et al. (1980), Kane et al. (1997) and de Hoog et al. (2000, 2015)).

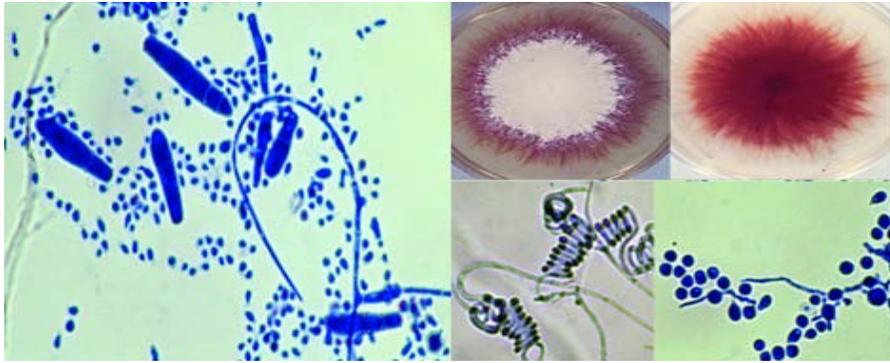


Imagen 4.7: *T. mentagrophytes* las colonias son granuladas y pulverulentas, de color crema y con un pigmento en el reverso que va desde el amarillo hasta el marrón. Presenta escasas macroconidias y abundantes microconidias en forma de lágrima o alargadas, dispuestas a lo largo de las hifas y formando estructuras conocidas como “aerialium”, también son frecuentes los “zarcillos” (hifas en espiral). (Fuente: (Molina de Diego A (2009) *Enferm Infecc Microbiol Clin*;29(Supl 3):33-39; [En línea] recuperado de <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/micologia/ccs-2009-micologia.pdf>, Rebell and Taplin (1970), Ajello (1972), Vanbreusegham et al. (1978), Rippon (1988), McGinnis (1980), Domsch et al. (1980), Kane et al. (1997) and de Hoog et al. (2000, 2015)

2) ZOOFÍLICO (del griego zoon, animal y philico, afinidad). Grupo de dermatofitos que básicamente afectan a una gran variedad de aves y mamíferos que actúan como hospedero. Estos dermatofitos raramente se desarrollan activamente como saprofitos, más bien sobreviven en un estado de latencia sobre el material contaminado de origen animal. La respuesta inflamatoria observada en el humano es mayor, cuando es parasitado por la especie zoofílicos. *M. canis* es la principal especie que infecta perros y gatos y como consecuencia las partículas infectantes son depositadas en el medio ambiente doméstico resultando infecciones familiares. Los animales jóvenes son más susceptibles a las infecciones por dermatofitos que los adultos. Los principales dermatofitos son: *Microsporium canis*, *Trichophyton interdigitale*, *Trichophyton verrucosum*.

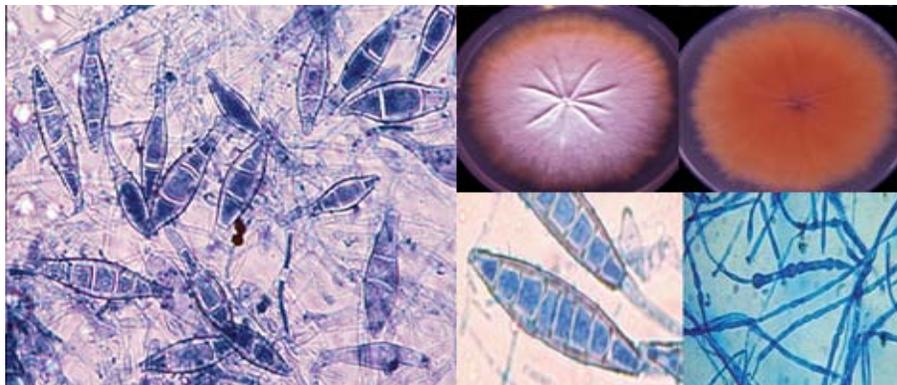


Imagen 4.8: *M. canis* Colonias de crecimiento moderado de 6 a 10 días, blanco-amarillentas, vellosas, planas, radiadas o lanosas; el reverso suele ser amarillo oscuro. (Arenas, 2008. Larone, 2011), se ve la colonia, blanca, radiada, vellosa. A la derecha, el reverso de la colonia, con el pigmento amarillo casi marrón. (Bonifaz, 2012), Presentan un micelio septado, hialino, microsifonado, ramificado, algunas veces, presentan hifas en modalidad de raquetas; con numerosos macroconidios largos (hasta 110µm), ahusados, de pared gruesa, equinulados, con los extremos puntiagudos, con mas de seis septos (Bonifaz, 2012. Larone, 2011) Se observa a la izquierda, los macroconidios con extremos puntiagudos, ahusados, con mas de 6 septos, equinulados, hialinos de pared gruesa y a la derecha, el micelio con algunas hifas en raquetas (como huesos unidos). Se observa a la izquierda, los macroconidios con extremos puntiagudos, ahusados, con mas de 6 septos, equinulados, hialinos de pared gruesa y a la derecha, el micelio con algunas hifas en raquetas (como huesos unidos Bonifaz 2012 Larone 2011).

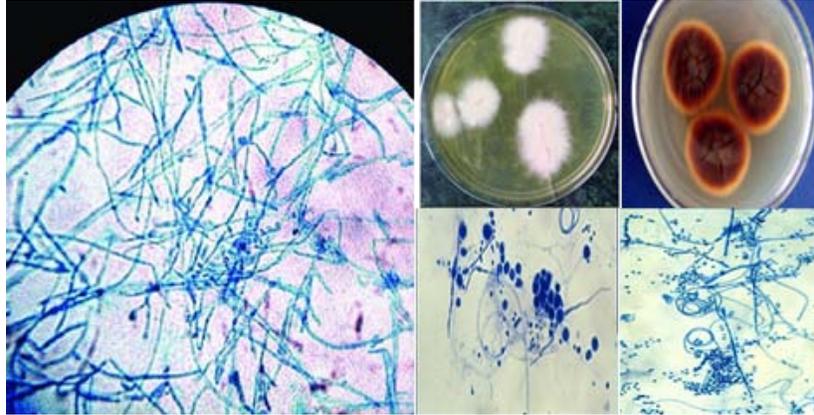


Imagen 4.9: *T. interdigitale* formando colonias de color blanco-crema, algodonosas, sobreelevadas que se extienden rápidamente; también hay zonas lisas y granulares, mientras que el reverso presenta un pigmento claro, amarillo o amarillo-marrón. Las microconidias tienen forma de perla o lágrima también pueden aparecer hifas en espiral y las macroconidias habitualmente están ausentes. (Fuente: (Molina de Diego A (2009) *Enferm Infecc Microbiol Clin*;29(Supl 3):33-39; [En línea] recuperado de <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/micologia/ccs-2009-micologia.pdf>, Rebell and Taplin (1970), Ajello (1972), Vanbreusegham et al. (1978), Rippon (1988), McGinnis (1980), Domsch et al. (1980), Kane et al. (1997) and de Hoog et al. (2000, 2015)

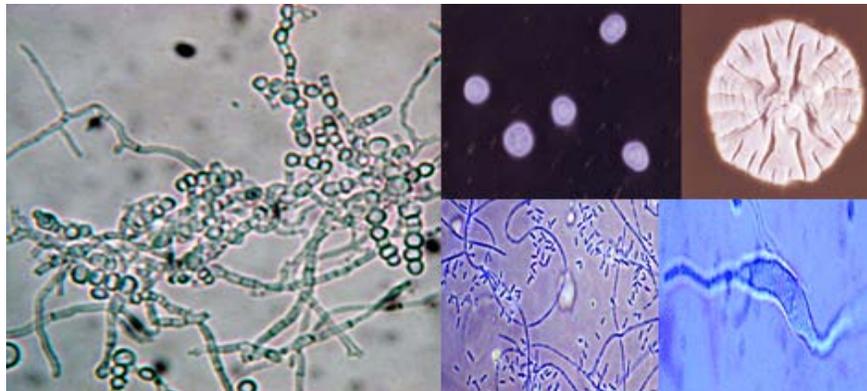


Imagen 4.10: *T. verrucosum* son de crecimiento lento (de 14 a 21 días), colonias blancas grisáceas, glabras (a diferencia de otras especies, como *T. mentagrophytes*), plegadas, la mayoría no presenta pigmento al reverso. (Larone, 2011. Arenas, 2008) Colonia blanca, glabra, de color blanca, vista del reverso sin producción de pigmento. Presenta un micelio septado, hialino, microsifonadas, con candelabros fávicos rudimentarios, deformadas y con cadenas de clamidoconidios intercalares a 37°C; presenta microconidios piriformes ligeramente alargados, y macroconidios en forma de puro y en ocasiones adelgazados. (Larone, 2011. Bonifaz, 2012)

3) GEOFÍLICO (del griego geo, tierra y philico, afinidad). Grupo de dermatofitos que viven en el suelo y tienen la habilidad para colonizar los sustratos de contenido de queratina. Aparentemente, la distribución está relacionada con la disponibilidad de queratina (pelos, plumas, escamas de piel y uñas de animales). La supervivencia de estos hongos en el suelo depende de los siguientes factores: 1) Abióticos: temperatura, luz, variación climática, altitud. 2) Bióticos: pH, nutrientes, humedad y sales. El aislamiento de estos hongos dependerá de la gran cantidad de productos orgánicos de desecho que se encuentren en el área de estudio. Ocasionalmente son patógenos para el humano y animales.

Las especies de este grupo presentan mayor producción de conidios y reproducción teleomorfa. Algunas de las especies son: *Microsporium gypseum*, *Microsporium fulvum*, *Trichophyton terrestre*. Los hongos geofílicos saprobios se han considerado como ancestros de los dermatofitos, que se han adaptado y con capacidad para parasitar al animal o al humano; así como por su habilidad de descomponer la queratina.

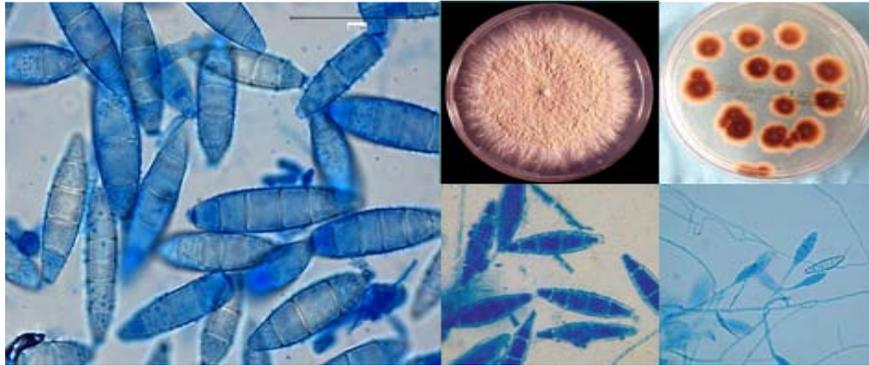


Imagen 4.11: *M. gypseum* Características macroscópicas, Son de crecimiento rápido (aproximadamente 6 días), de color café canela a beige, pulverulentas, granuladas, planas, el reverso de color café (marrón). (Arenas, 2008), Características microscópicas, Su micelio es septado, microsifonado, hialino, ramificado, presenta macroconidios de hasta 60 μ m de largo, son septados (de menos de 6 segmentos), equinulados, de pared gruesa, sus extremos son redondeados (lo que lo diferencia de *M. canis*), presenta microaleurioconidios en forma de lágrimas alternados. (Larone, 2011. Bonifaz, 2012)

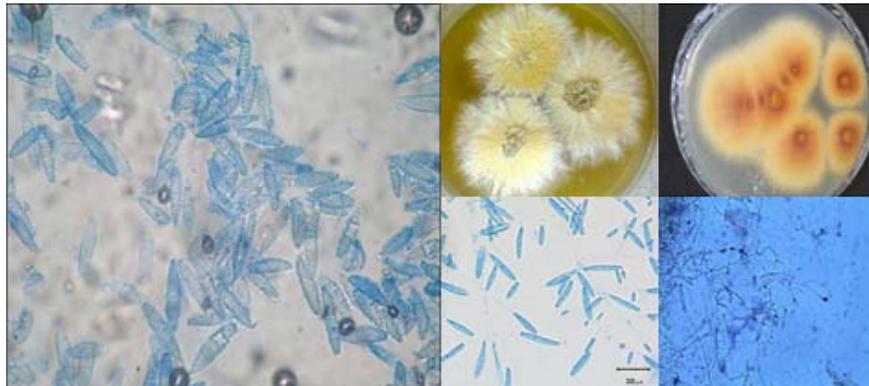


Imagen 4.12: Las colonias son pulverulentas, de crecimiento rápido, color cremoso o pardo claro, con una parte periférica blanquecina; el aspecto es más veloso. El reverso de la colonia es pardo-amarillento a rojo intenso. En la observación microscópica presenta numerosos macroconidios, más cilíndricos la pared de estos esporos es fina y rugosa. Los microconidios son piriformes o en forma de lágrima y no pueden diferenciarse de los de otras especies de dermatofitos. Puede presentar hifas en espiral. Fuente (NEGRONI, R.; BONVEHI, P.; ARECHAVALA, A. (2008) Historia y descripción de *Microsporium fulvum*, una especie válida del género descubierta en la República Argentina Revista Argentina de Microbiología, vol. 40, núm. 1, p. 47 [En línea] recuperado de ISSN: 0325-7541)

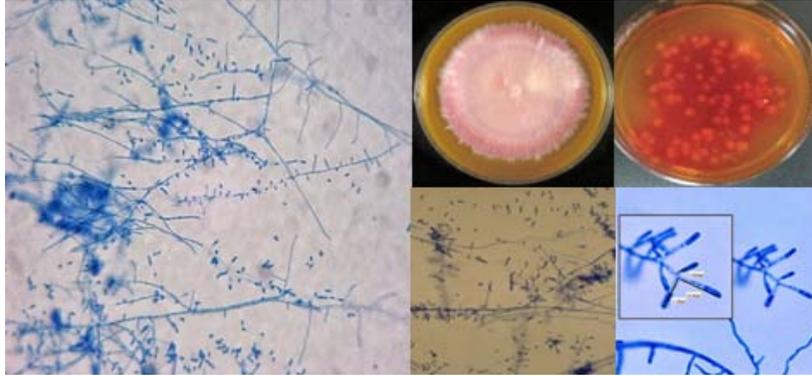


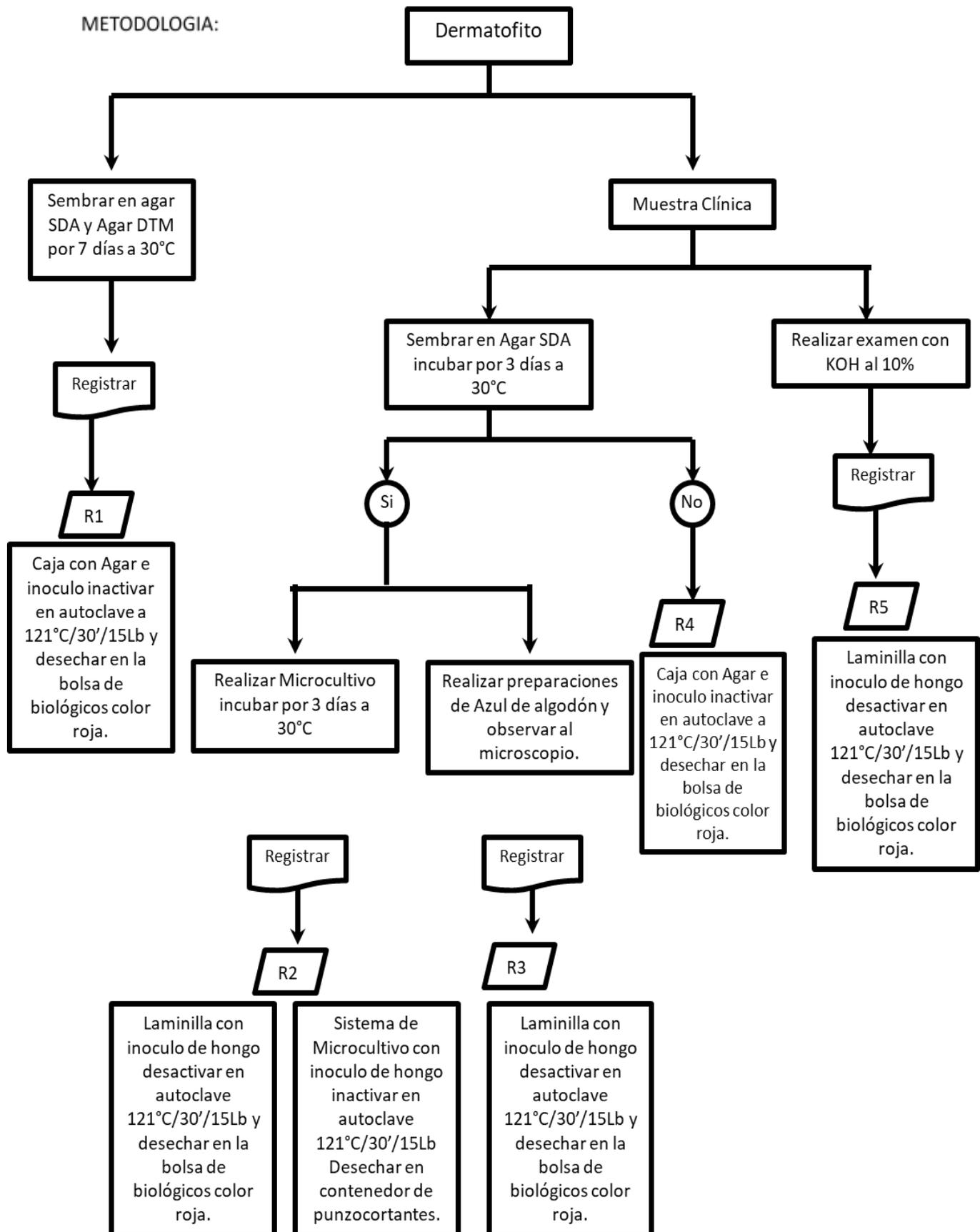
Imagen 4.13: Ramificado bajo el género *Trichophyton*, los hongos se encontró adicionalmente que sea un complejo en su etapa teleomorfo que comprende múltiples especies, por ejemplo, la insular *Arthroderma, sp.nov.* y *olidum sp Arthroderma. nov.* Además, los hongos muestran característica típica de *Trichophyton* que se extendió nódulos y estructuras de conidios en forma de espiral, con una naturaleza queratinófilos y queratinolítico, a menudo se identifican en células de pelo de mamíferos y, posiblemente, alimentados sobre el sustrato de queratina similares. (Fuente: (Molina de Diego A (2009) Enferm Infecc Microbiol Clin;29(Supl 3):33-39; [En línea] recuperado de <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/micologia/ccs-2009-micologia.pdf>, Rebell and Taplin (1970), Ajello (1972), Vanbreusegham et al. (1978), Rippon (1988), McGinnis (1980), Domsch et al. (1980), Kane et al. (1997) and de Hoog et al. (2000, 2015

Material:

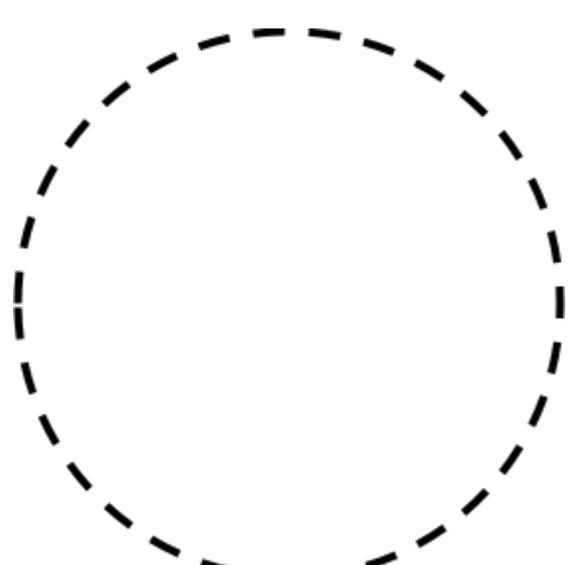
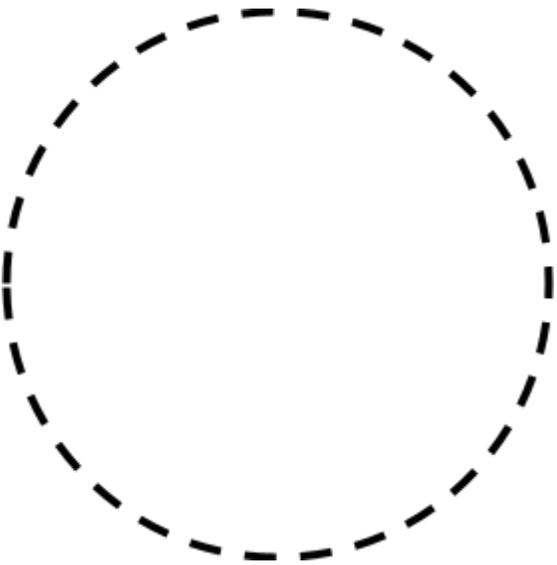
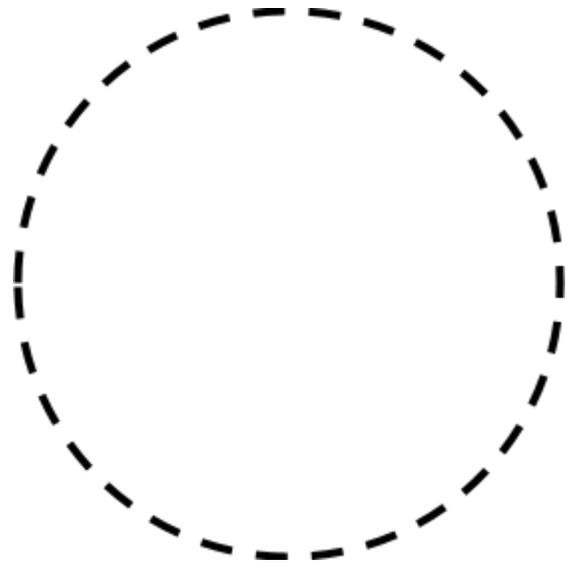
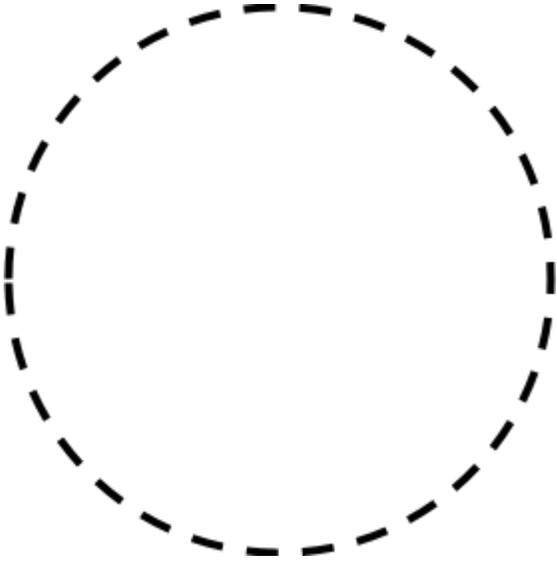
- 1.- Bata Blanca
- 2.- Plumón indeleble
- 3.- Guantes de látex
- 4.- Lentes de seguridad

Por equipo:

- 1.- Muestra clínica
- 2.- Tubo con agar DTM
- 3.-CAJA CON AGAR SDA, PDA y AGAR TIERRA PELOS PARA EVALUACIÓN DE PARASITACIÓN
- 4.- Sistema de Microcultivo
- 5.- Tubo de 10 mL con agua destilada
- 5.- Portaobjetos y Cubreobjetos
- 6.- Pinzas
- 7.- Bisturí con hojas
- 8.- Asa Bacteriológica en L



RESULTADOS:



BIBLIOGRAFÍA :

- Allevato MA (2005). Tiña capitis. Act Terap Dermatol;28:138-144. [En línea] recuperado de http://www.atdermae.com/pdfs/atd_28_02_05.pdf
- Arenas R. (2011) Micología Médica Ilustrada. Cuarta ed, México, D.F McGraw-Hill Interamericana.
- Badillet G. (2011) Dermatophyties et Dermatophytes. Atlas Clinique et biologique. Varia, Paris, Lavoisier
- Bonifaz A. (2010) Micología Médica Básica. México, D.F McGraw-Hill Interamericana.
- Crespo Erchiga V, Delgado Florencio V. (2007) Atlas de Micología Cutánea. El laboratorio en las micosis cutáneas. Loki y Dimas, Madrid.
- Elewski B, Cáceres H, DeLeon L, et al (2008) Terbinafine hydrochloride oral granules versus oral griseofulvin suspension in children with tinea capitis: Results of two randomized, investigator-blinded, multicenter, international, controlled trials. J Am Acad dermatol; 59:41-53[En línea] recuperado de DOI:[10.1016/j.jaad.2008.02.019](https://doi.org/10.1016/j.jaad.2008.02.019)
- García-Moran J, Jarabo-García M(2008) Estudio de 87 casos de tiñas en una zona rural; Enferm Infecc Microbiol Clin; Vol. 26. Núm. 3. páginas 179-180 [En línea] recuperado de DOI: [10.1157/13116757](https://doi.org/10.1157/13116757)
- Gupta A, Lynch L, Cooper E, (2009), The use of an intermittent terbinafine regimen for the treatment of dermatophyte toenail onychomycosis. J Eur Acad Dermatol Venereol;23:256-262 [En línea] recuperado de doi: [10.1111/j.1468-3083.2008.03036.x](https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2008.03036.x)

El Micetoma es una infección subcutánea crónica de origen micótico (*Eumicetoma*) o bacteriano (*Actinomicetoma*), cuyos agentes causales son exógenos. Clínicamente se manifiesta por aumento de volumen relativamente indoloro de la región afectada, fístulas que drenan material purulento o hemático, conteniendo micro-colonias del agente etiológico formando las estructuras parasitarias conocidas como granos. Este padecimiento tiene tendencia a afectar huesos.



Imagen 5.1: Pie con micetoma Fuente: (CC BY-SA 3.0 File:Madura foot..JPG Created: 23 October 2007)

EPIDEMIOLOGÍA

En México, el número de casos registrados no es tan elevado como en los países africanos; sin embargo, es el país latinoamericano que registra el mayor número. En países como Brasil y Venezuela, el número de casos reportados es bajo y comparativamente en México, en las últimas dos décadas se han reportado dos casuísticas nacionales. El objetivo del presente trabajo es dar a conocer los datos epidemiológicos actualizados de esta enfermedad en el país, registrados hasta 2012.

Frecuencia: El total de casos de micetoma detectados en los 11 centros de diagnóstico micológico fue de 3,933, con un promedio de 73 casos nuevos/año.

Género: De los 3,860 casos en que se registró este dato, 2,920 fueron hombres (75.6%) y 940 mujeres (24.4%). Los datos anteriores corresponden a una proporción de 3:1 (Fig. 1).

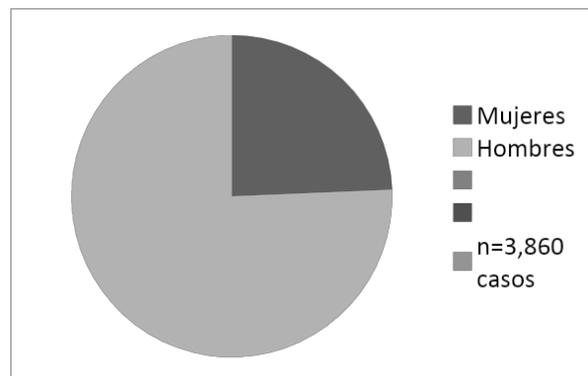


Imagen 5.2: Frecuencia de Micetoma por género n= 3,860

Fuente: (Lopez-Martinez R, Mendez-Tovar L, Bonifaz A (2013) Actualización de la epidemiología del micetoma en México. Revisión de 3,933 casos Gaceta Medica de Mexico 149:586-92 [En línea] recuperado de <https://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2013/gm135p.pdf>)

Edad. En la tabla 1 se muestra que de los 3,349 casos analizados, la mayor frecuencia se encontró en los grupos de edad entre los 16-50 años (2,535 casos, 75.69%). Es notorio que, en los grupos de 0-15 y 61-80 años, se presentó un número importante de casos.

Edad (Años)	Numero	%
0-15	132	3.94
16-30	1,172	35.00
31-40	747	22.32
41-50	616	18.40
51-60	392	11.70
61-80	290	8.64
Total	3,349	100.00

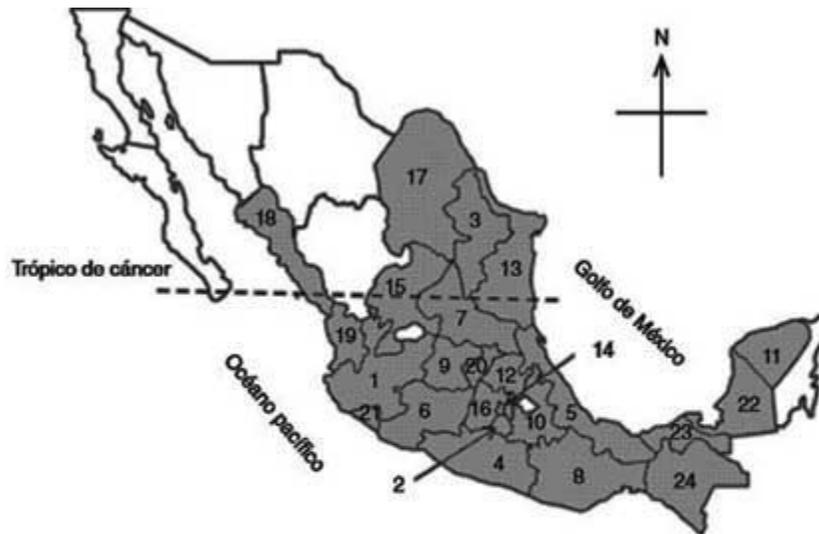
Tabla 1: Frecuencia por Grupo de edad en 3,349 casos Fuente: (Lopez-Martinez R, Mendez-Tovar L, Bonifaz A (2013) Actualización de la epidemiología del micetoma en México. Revisión de 3,933 casos Gaceta Medica de Mexico 149:586-92 [En línea] recuperado de <https://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2013/gm135p.pdf>)

Ocupación. Las ocupaciones en que se registraron casos de micetoma fueron muy diversas. El mayor número correspondió a campesinos, 1,823 casos (58.41%), seguido de amas de casa de zonas rurales (Tabla 2). Otras ocupaciones en que se observó un número relevante de micetomas fueron: obreros, estudiantes y albañiles, todos ellos habitantes de zonas rurales.

Ocupacion	Numero	%
Campesinos	1,823	58.41
Amas de casa	680	21.79
Obreros	179	5.74
Estudiantes	127	4.06
Albañiles	99	3.13
Empleados	63	2.02
Comerciantes	48	1.53
Trabajadores de limpieza	40	1.28
Choferes	26	0.83
Profesionistas	10	0.32
Otros	28	0.89
Total 3,123	3,123	100.00

Tabla 2: Ocupacion en 3,122 casos. Fuente: (Lopez-Martinez R, Mendez-Tovar L, Bonifaz A (2013) Actualización de la epidemiología del micetoma en México. Revisión de 3,933 casos Gaceta Medica de Mexico 149:586-92 [En línea] recuperado de <https://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2013/gm135p.pdf>)

Distribución geográfica. La distribución geográfica del micetoma fue muy amplia, ya que en 24 de los 31 estados que forman la República Mexicana se reportaron casos. Del total de 3,933 casos, el lugar de origen se reportó en 3,471 casos; las casuísticas más numerosas correspondieron a: Jalisco (676 casos), Morelos (429 casos), Nuevo León (347 casos), Guerrero (302 casos) y Veracruz (264 casos) (Imagen 5.3).



Estado	Casos	Estado	Casos	Estado	Casos	Estado	Casos	Estado	Casos
(1) Jalisco	676	(6) Michoacán	243	(11) Yucatán	94	(16) Edo. de Méjico	44	(21) Colima	13
(2) Morelos	429	(7) San Luis Potosí	229	(12) Hidalgo	87	(17) Coahuila	36	(22) Campeche	9
(3) Nuevo León	347	(8) Oaxaca	172	(13) Tamaulipas	66	(18) Sinaloa	34	(23) Tabasco	8
(4) Guerrero	302	(9) Guanajuato	163	(14) Distrito Federal	49	(19) Nayarit	24	(24) Chiapas	3
(5) Veracruz	264	(10) Puebla	138	(15) Zacatecas	40	(20) Querétaro	14	Sin reportar	462

Imagen 5.3: Distribución geográfica de 3,933 casos de micetoma. Fuente: (Lopez-Martinez R, Mendez-Tovar L, Bonifaz A (2013) Actualización de la epidemiología del micetoma en México. Revisión de 3,933 casos Gaceta Medica de Mexico 149:586-92 [En línea] recuperado de <https://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2013/gm135p.pdf>)

Región corporal. En la tabla 3 se observa que, de 3,418 casos analizados, las extremidades inferiores fueron el segmento corporal más afectado (2,061 casos, 60.29%), seguido de tronco (675 casos) y extremidades superiores (459 pacientes).

Tipo de micetoma (Figura 5.4), se muestra que, de los 3,933 casos de micetoma reportados, el actinomietoma se presentó en 3,796 (96.52%) y el eumietoma en 137 (3.48%).

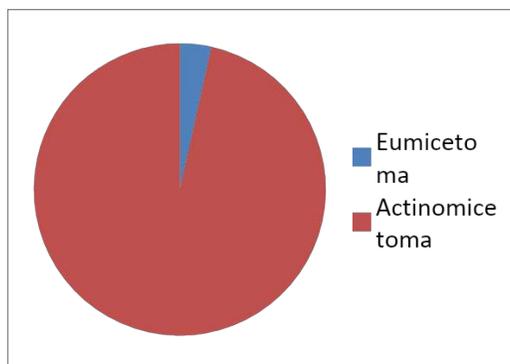


Imagen 5.4: Tipos de Micetoma en 3,933 casos. Fuente: (Lopez-Martinez R, Mendez-Tovar L, Bonifaz A (2013) Actualización de la epidemiología del micetoma en México.Revisión de 3,933casos Gaceta Medica de Mexico 149:586-92 [En línea] recuperado de <https://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2013/gm135p.pdf>)

Agentes de actinomicetoma. *Nocardia brasiliensis* fue la bacteria más frecuente en esta casuística, observándose en 2,489 casos (65.58%), seguida de *Actinomadura madurae* con 301 casos (7.93%). Otras especies identificadas con mucho menor frecuencia fueron *N. asteroides* con 27 casos y dos casos de una especie de reciente descripción (*N. harenae*) (Tabla 4). La asociación del género de los pacientes con el agente etiológico fue estudiada solamente en los casos de infección por *Actinomadura madurae*. En este estudio, la frecuencia de *A. madurae* fue superior en la mujer en más del 10% con respecto al hombre (Tabla 2).

Genero	Numero	%
Mujeres	166	55.14
Hombres	135	44.86
Total	301	100.00

Tabla 3: Micetoma por *Actinomadura madurae*. Distribución de acuerdo con género en 301 casos Fuente: (Lopez-Martinez R, Mendez-Tovar L, Bonifaz A (2013) Actualización de la epidemiología del micetoma en México.Revisión de 3,933casos Gaceta Medica de Mexico 149:586-92 [En línea] recuperado de <https://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2013/gm135p.pdf>)

Agentes de eumicetoma. En este estudio se registró un 3.48% de casos de eumicetoma (Imagen 5.4). Se aislaron ocho géneros diferentes; de ellos, *Madurella* fue el más frecuente, aislándose en 81 de 137 pacientes. Las especies más frecuentes fueron *M. grisea* y *M. mycetomatis*. Es importante anotar que por primera vez se reportan casos de eumicetoma por *Fusarium subglutinans*, *Cladophialophora mycetomatis*, *Phaeoacremonium parasiticum* y *C. bantiana* (Tabla 6). En 18.98% de casos de eumicetomas (como se presentó en 10.23% de casos de actinomicetoma) no se determinó género ni especie del agente causal, lo cual demuestra que en muchos laboratorios se tiene dificultad para hacer la identificación de estos agentes.

Agente	n.º	%
<i>Nocardia brasiliensis</i>	2,489	65.58
<i>Actinomadura madurae</i>	301	7.93
<i>Streptomyces somaliensis</i>	39	1.02
<i>Nocardia asteroides</i>	27	0.71
<i>Actinomadura pelletieri</i>	11	0.29
<i>Nocardia oitidis-caviarum</i>	7	0.18
<i>Nocardia harenae</i>	2	0.05
<i>Nocardia transvalensis</i>	1	0.02
<i>Nocardia</i> sp	531	13.99
Actinomicetos	388	10.23
Total	3,796	100.00

Tabla 4: Agentes de actinomicetoma en 3,796 casos. Fuente: (Lopez-Martinez R, Mendez-Tovar L, Bonifaz A (2013) Actualización de la epidemiología del micetoma en México. Revisión de 3,933casos Gaceta Medica de Mexico 149:586-92 [En línea] recuperado de <https://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2013/gm135p.pdf>)

Agentes de eumicetoma en 137 casos		
Agente	nº	%
<i>Madurella grisea</i>	39	28.47
<i>Madurella mycetomatis</i>	36	26.28
<i>Scedosporium apiospermum</i>	8	5.84
<i>Fusarium solani</i>	5	3.65
<i>Pyrenochaeta romeroi</i>	3	2.18
<i>Petriellidium boydii</i>	2	1.46
<i>Cladophialophora bantiana</i>	2	1.46
<i>Pyrenochaeta mackinnonii</i>	1	0.73
<i>Cladophialophora mycetomatis</i>	1	0.73
<i>Phaeoacremonium parasiticum</i>	1	0.73
<i>Fusarium subglutinans</i>	1	0.73
<i>Madurella</i> sp	6	4.38
<i>Acremonium</i> sp	4	2.92
<i>Fusarium</i> sp	2	1.46
Eumicético	26	18.98
Total	137	100.00

Tabla 5. Agentes de eumicetoma en 137 casos. Fuente: (Lopez-Martinez R, Mendez-Tovar L, Bonifaz A (2013) Actualización de la epidemiología del micetoma en México. Revisión de 3,933casos Gaceta Medica de Mexico 149:586-92 [En línea] recuperado de <https://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2013/gm135p.pdf>)

Mecanismo de infección

El micetoma es adquirido por lesiones traumáticas que interrumpen la continuidad de la piel, permitiendo la introducción del agente patógeno de origen exógeno al tejido del hospedero.

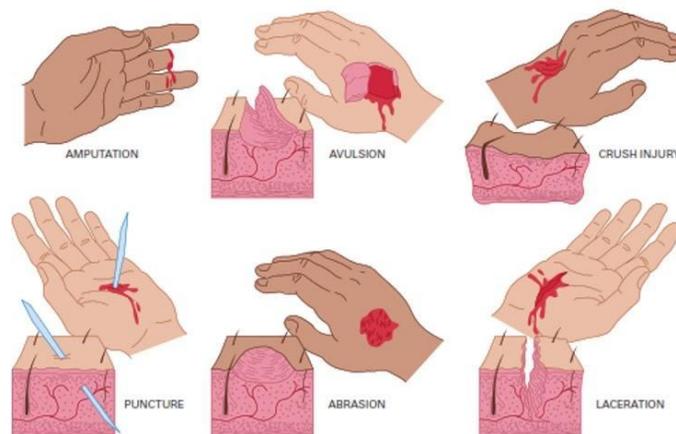


Imagen 5.5: Mecanismo de producción de Heridas Fuente: (Luciano J. Gandini, TSEM Luciano J. Gandini Rosario, Argentina Traducido y modificado de: Blesde; Porter: Cherry)

Sin embargo, durante un interrogatorio dirigido, son muy escasos los pacientes que confirman este antecedente, debido probablemente a que las personas más afectadas por sus condiciones socioeconómicas le dan poca importancia a eventos tan cotidianos como los traumatismos. Se cree que en las regiones altamente endémicas, los factores que favorecen la enfermedad son la exposición continua al agente, la desnutrición, higiene y estado general de salud deficientes. Los traumatismos son muy diversos, pero en África las heridas por espinas en las regiones de la sabana son muy frecuentes. En Senegal, se ha encontrado que *Leptosphaeria senegalensis* abunda en diversas espinas, en particular de acacias; 50% de éstas albergan al hongo; no así las espinas verdes, por lo que se cree que el agente proviene del suelo. La misma distribución se ha encontrado con *L. tomkinsii*. (Segretain et al, 1968; Segretain G, 1972). En un estudio retrospectivo de Maiti et al, de 264 casos solo en 130 se estableció el antecedente de traumatismo. Para actinomicetoma los mecanismos de infección fueron pinchazo, 20 casos; heridas extensas, 27; heridas pequeñas, 17; lesiones superficiales, 19; lesiones no aparentes, 114. Para eumicetoma: pinchazo, 18 casos; heridas extensas, 12; heridas pequeñas, 8; lesiones superficiales, 9; lesiones no aparentes, 20. Considerando el antecedente de pinchazo, éste generalmente fue producido con espinas, astillas de madera, fibras de plantas, arañazo o agujas. De las 39 heridas extensas, 19 correspondieron a heridas quirúrgicas (9 drenajes de absceso, 7 escisiones quirúrgicas de tumoraciones, quistes o cuerno y 3 injertos de piel).

AGENTES ETIOLÓGICOS

El micetoma es una patología de etiología diversa, por lo que su clasificación ha sido simplificada en dos tipos:

- Actinomicetoma: infección causada por bacterias del orden Actinomycetales (Imagen 5.4), particularmente de los géneros *Nocardia*, *Actinomadura* y *Streptomyces*. Las principales especies involucradas son el complejo *Nocardia asteroides*, *Nocardia brasiliensis*, *Nocardia otitidiscaviarum*

(*caviae*), *Actinomadura madurae*, *Actinomadura pelletieri* y *Streptomyces somaliensis*. Son raros los casos causados por otros actinomicetos como *Nocardiopsis dassonvillei*, *Nocardia farcinica* o *Nocardia transvalensis* (Kwon Ch., 1992, Rippon 1988).

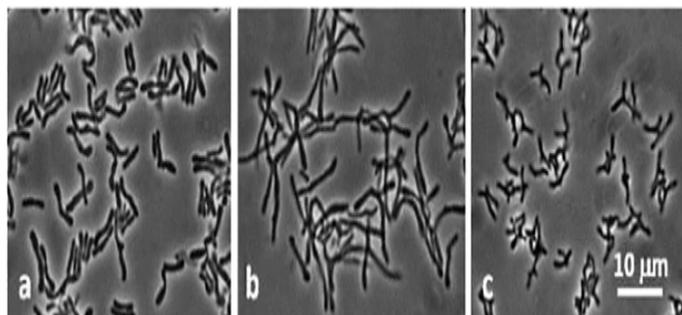


Imagen 5.6: *Actinomycetos* Fuente: (Mattarelli P, Brand G, Calabrese C (2014) Occurrence of Bifidobacteriaceae in human hypochlorhydria stomach, *Microbial Ecology in Health and Disease* [En línea] recuperado de DOI: 10.3402/mehd.v25.21379)

Los actinomicetales son microorganismos que se encuentran en el suelo, agua dulce y agua marina. Crecen en forma de filamentos finos y rectos, son productores de ácidos micólicos, que miden de 0.5 a 0.8 µm de diámetro; muestran ramificaciones laterales o dicotómicas y pueden crecer sobre el medio formando filamentos aéreos. Se reproducen por fragmentación de los filamentos formando estructuras bacilares o cocoides. Forman colonias de un aspecto céreo característico, de color variable dependiendo de la especie. La temperatura de crecimiento oscila entre los 20 y 30°C, aunque algunas especies patógenas crecen mejor a 37°C. Otra característica de los actinomicetos es su olor a tierra húmeda. En los últimos años, a través de las técnicas moleculares, se han dado a conocer alrededor de 50 especies de *Nocardia*, de las cuales *N. brasiliensis* sigue siendo predominante como causante de micetoma (Imagen 5.5).



Imagen 5.8: *Nocardia brasiliensis* Fuente: (Public Domain Files)

Recientemente se describieron otras especies como *N. pseudobrasiliensis*, *N. mexicana* y *N. cyriacigeorgica*. Respecto al género *Actinomadura*, predomina *A. madurae* y en algunas regiones de África como Senegal y Chad, *A. pelletieri* es causante del 23-25% de los casos de micetoma.

Streptomyces somaliensis es causante de un número muy reducido de casos de actinomicetoma en América, pero es causante hasta del 50% de casos de micetoma en Somalia y de la mayoría de casos en Kenia. Estas especies de interés médico habitualmente son identificadas por procedimientos bioquímicos, pero el tiempo que consumen estos y la falta de confiabilidad en los resultados han hecho necesario el uso de los procedimientos moleculares.

Hoy en día se cuenta con la tecnología de MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) para la identificación de las especies más importantes, ahorrando mucho tiempo en el diagnóstico pues las técnicas bacteriológicas convencionales ya que estas toman 1 mes mínimo para lograr el aislamiento e identificación debido a que estas bacterias se clasifican como de lento crecimiento.



Imagen 5.9: Micetoma por *Nocardia brasiliensis* donde se observa una gran cantidad de fistulas. Fuente: (Mendez- Tovar 2016)

- Eumicetoma: padecimiento causado por hongos. Han sido reportadas aproximadamente 25 especies involucradas, predominando *Madurella mycetomatis*, el complejo *Scedosporium apiospermum*, *Trematosphaeria* (antes *Madurella*) *grisea*, *Falciformispora* (antes *Leptosphaeria*) *senegalensis*, *Medicopsis* (antes *Pyrenochaeta romeroi*) (Kwon Chung, 1992; Rippon, 1988). Esta lista cada día crece progresivamente debido a que, por un lado los factores de oportunidad en el hospedero también aumentan, pero los procedimientos para determinar agentes causales desconocidos han mejorado y cada vez se reportan especies nuevas como causantes de esta patología.

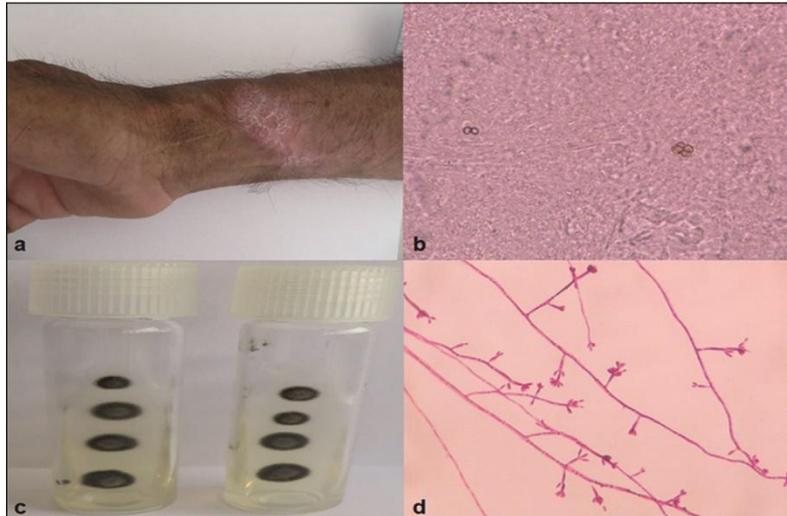


Imagen 5.10: Cromoblastomicosis por *Fonsecaea pedrosoi*: a) Lesión eritemato-escamosa; b) células muriformes de color café y tabique central (400 aumentos); c) Colonia negruzca a 10 días de incubación en agar Sabouraud; d) Hifas tabicadas con conidios elípticos 400 aumentos. Fuente: (Ventura-Flores R, Failoc-Rojas V, Silva-Díaz H (2017) Cromoblastomicosis: características clínicas y microbiológicas de una enfermedad desatendida Rev. chil. infectol. vol.34 no.4 [En línea] recuperado de <http://dx.doi.org/10.4067/s0716-10182017000400404>)

Cuando se sospecha clínicamente de un caso de micetoma, el material drenado debe ser examinado microscópicamente para determinar las características de los granos como su color, tamaño, forma y estructura. A través de este procedimiento la mayoría de veces es posible tener una orientación hacia el diagnóstico general (actinomicetoma o eumicetoma), fundamental para iniciar un tratamiento adecuado.

El tejido obtenido por biopsia es un material muy valioso para establecer el diagnóstico de micetoma. La tinción más útil es la de hematoxilina-eosina (HE), ya que permite evidenciar muy bien la respuesta tisular al agente causal, además de la estructura fúngica parasitaria que son los granos. La mayoría de eumicetomas son causados por hongos pigmentados, por lo que los granos generalmente tienen un pigmento marrón claro u oscuro. Además, es importante observar la estructura de los mismos buscando filamentos de 2-4 μm , que son más evidentes en la periferia, característica que también puede observarse en el examen directo, estas estructuras se conocen como clavos.

Una parte del material drenado debe ser sembrado en Agar Dextrosa Sabouraud (ADS) para aislar y determinar las características macro y microscópicas del cultivo del agente causal definiendo así la especie. En general, tanto hongos como bacterias crecen muy bien en ADS; sin embargo, cuando sea posible, se recomienda sembrar el espécimen (secreción o tejido obtenido por biopsia) en otros medios para aumentar las posibilidades de aislamiento. Cuando se sospecha de un micetoma causado por hongos, puede utilizarse Agar Papa Dextrosa (APD) o Agar Extracto de Malta (AEM); cuando se considera a los actinomicetos como posibles agentes causales puede utilizarse, agar infusión cerebro corazón (BHI) Agar Lowenstein Jensen o Agar Czapek). Es conveniente considerar que el crecimiento de los hongos causantes de micetoma es sensible a la

cicloheximida; sin embargo sí se puede adicionar algún antibacteriano al medio. En algunas ocasiones es necesario utilizar medios especiales para estimular la conidiación o la formación de estructuras específicas de los eumicetos, particularmente de aquellos que en un primo cultivo solo desarrollan micelio.

PRINCIPALES HONGOS ASOCIADOS A MICETOMA

Género: *Acremonium*

Especies: *A.kiliense*, *A.falciforme*, *A.recifei*

CARACTERÍSTICAS PARA SU IDENTIFICACIÓN

Granos: blanco a amarillo pálido, blandos, forma variable, compuestos de masas de hifas hialinas vesiculosas.

Cultivo:

Colonia blanca, grisácea, marrón o grisácea violeta; el reverso presenta pigmento rojo violeta. Microscópicamente conidios que se producen en fiálides largas; los conidios se mantienen agrupados gracias a la presencia de un material mucilaginoso.

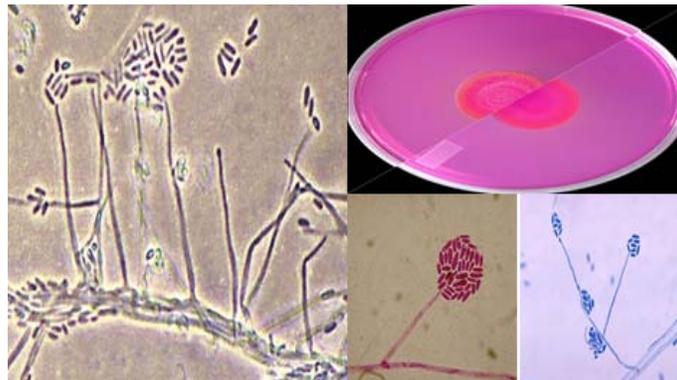


Imagen 5.11: *Acremonium spp* Macro y micro conidias, imagen de cultivo en Agar Rojo brillante Fuente: (Patovirta, R. L., Reiman, M., Husman, T., Haverinen, U., Toivola, M., and Nevalainen, A. (2003). Mould specific IgG antibodies connected with sinusitis in teachers of mould damaged school: a two-year follow-up study. *Int J Occup.Med Environ Health*. 16[3], 221-230. Groll, A. H. and Walsh, T. J. (2001). Uncommon opportunistic fungi: new nosocomial threats. *Clin Microbiol Infect*. 7 Suppl 2:8-24., 8-24. Simmons, R. B., Price, D. L., Noble, J. A., Crow, S. A., and Ahearn, D. G. (1997). Fungal colonization of air filters from hospitals. *Am Ind.Hyg.Assoc.J*. 58[12], 900-904)

Características microscópicas:

A. kiliense produce conidios de una sola célula que miden de 3-6 x 1-1.6 μm . *A. recifei* produce conidios de una célula en forma de media luna, de 4-6 x 1.3-2 μm . *A. falciforme* forma conidios de una o dos células en forma de media luna, de 7-8.5 x 2.7-3.2 μm . Las tres especies presentan clamidoconidios terminales o intercalares. Un género morfológicamente similar a *Acremonium* que ha sido reportado como causante de micetoma es *Phaeoacremonium*. La

diferenciación morfológica es difícil; una característica que hace pensar en este género es la presencia de pigmento, pero la diferenciación de especie a menudo requiere de estudio molecular.

Género: *Exophiala*

Especie: *E. jeanselmei*

Granos: oscuros y de forma regular. Los granos que son eliminados con el material purulento tienen forma de gusano. En el tejido los granos aparecen como esferas con hoyos o como bandas sinuosas. Las hifas de la superficie del grano son oscuras, de pared gruesa, abultadas, que miden de 5 a 10 μm . Las hifas de la parte central del grano son más pequeñas y degeneradas. Dentro del grano también pueden observarse leucocitos y células gigantes.



Imagen 5.12: *Exophiala jeanselmei* macro y microcinidios y cultivo Fuente: (de Hoog and Hermanides-Nijhof (1977), McGinnis (1980), Hohl et al. (1983), Nishimura and Miyaji (1983), Matsumoto et al. (1984), Dixon and Polak-Wyss (1991), de Hoog et al. (2000, 2015).)

Cultivo:

Colonia oscura, de crecimiento lento, de aspecto levaduriforme o membranoso. Con los sub-cultivos la colonia toma un aspecto micelial, con hifas aéreas cortas tipo aterciopelado.

Características microscópicas:

En los cultivos levaduriformes generalmente las células conidiógenas nacen lateralmente a la hifa y son cortas con anelaciones. Este tipo de conidiación se parece a la que presenta *Aureobasidium* o *Exophiala (Wangiella) dermatitidis*. En los primeros aislamientos se pueden observar fiálides, las cuales tienden a desaparecer con los sub-cultivos repetidos. Las células conidiógenas tienen un tamaño variable, pero en general miden de 1.5 a 3.5 μm de diámetro y de 5 a 10 μm de longitud. Los conidios se producen sucesivamente en la punta de anélices. Los conidios son de forma elíptica y miden de 1-2 x 2-6 μm .

Complejo *Scedosporium apiospermum*

Granos: blancos a amarillos, blandos a firmes, sub-globosos a lobulados, de 1 a 2 mm. Las hifas son hialinas, de 2 a 5 μm de diámetro. En la periferia del grano, las hifas son globosas, produciendo

otras células similares secundarias de 10 a 20 micras. Estas células al parecer son hifas modificadas.

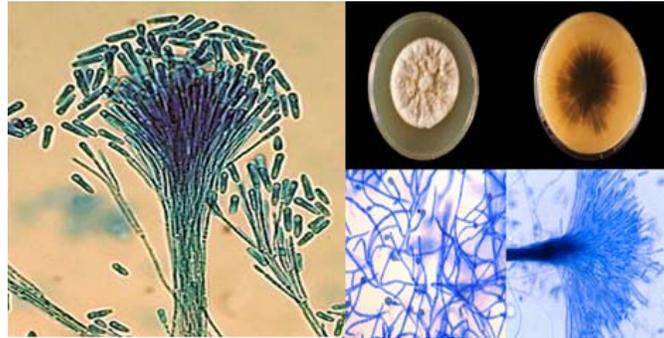


Imagen 5.13: Micro y macrocinidios y cultivo de *Scedosporium apiospermum* Fuente: (McGinnis (1980), Domsch et al. (1980), McGinnis et al. (1982), Campbell and Smith (1982), Rippon (1988), de Hoog et al. (2000, 2015), Gilgado et al. (2005), Rainer and de Hoog (2006), Guarro et al. (2006), Lackner et al. (2014a))

Cultivo:

Colonia algodonosa, de color gris oscuro a marrón grisáceo, que con el tiempo adquiere un color más claro. Con los sub-cultivos la colonia adquiere un color blanco. Este hongo es homotálico y en medios pobres (agar harina de maíz o papa dextrosa)

Características microscópicas:

Muchas de las cepas producen cleistotecios de color marrón de 100 a 200 μm . Las ascas son ovales o sub-globosas (12 – 18 X 8 –13 μm) y contienen 8 ascosporas. Cuando se rompe la pared de lasca, se liberan las ascosporas que miden de 4-5 x 7-8 μm de forma elíptica y de color oscuro. En el interior de las ascosporas se observa con frecuencia una pequeña “gota de aceite”.

Género: *Madurella*

Especies: mycetomatis, grisea

Granos: negros, firmes y quebradizos; de forma globosa, ovales o lobulados. Generalmente miden 0.5–1 mm, pero pueden alcanzar hasta 5 mm cuando se agregan varios granos. Están compuestos de hifas de color marrón claro que miden de 1–5 μm de diámetro. En la periferia de los granos, las hifas pueden alcanzar hasta 12–15 μm de diámetro. Las hifas contienen partículas pigmentadas y están inmersas en una matriz oscura cuando el grano se encuentra compacto. Cuando se tiñen con hematoxilina-eosina, los granos aparecen uniformemente de color marrón rojizo. En el grano de tipo vesicular, el centro es de color claro y las hifas de la periferia son de color marrón y presentan vesículas de 6–15 μm de diámetro, semejantes a los de *M. grisea*.

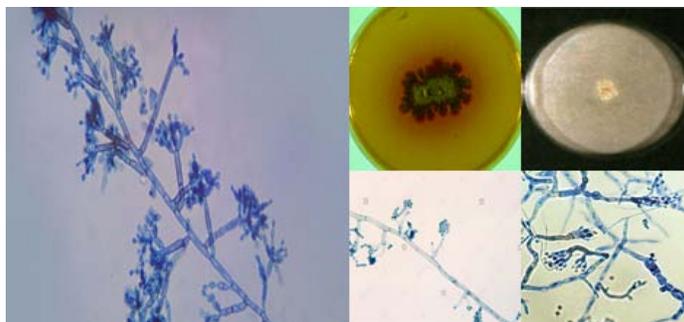


Imagen 5.14: Micro y macroconidios, cultivo de *Madurella mycetomatis* Fuente: (Arenas 2014)

Cultivo:

Colonias ampliamente variables. En los primeros días son blancas y membranosas, pero con el tiempo se vuelven de color amarillo oliváceo o marrón, con pigmento oscuro que difunde al medio. Este hongo crece mejor a 37°C. Se pueden observar esclerotes compuestos de células poligonales pseudo-parenquimatosas. Cuando se cultiva en agar extracto de suelo o agar agua, se pueden producir conidios ovales o piriformes, de 3.5– 5 µm a partir de conidióforos simples o ramificados. También pueden observarse fiálides productoras de conidios pequeños y esféricos, especialmente en agar papa-zanahoria o agar harina de maíz.

Trematosphaeria grisea (antes *Madurella grisea*)

Granos: negros, globosos o lobulados que alcanzan 1 mm de diámetro, inicialmente suaves, para después convertirse en firmes y quebradizos. La zona central no presenta pigmento y en la periferia se observan hifas de color marrón, las cuales carecen de los gránulos de pigmento marrón intracelulares característicos de *M. mycetomatis*.

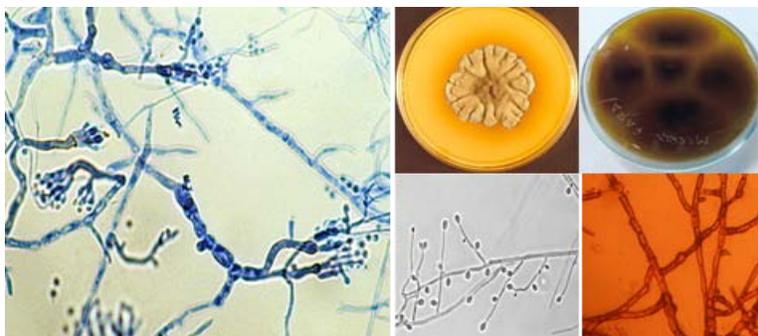


Imagen 5.15: Morfología microscópica y colonial, micro y macroconidios de *Madurella grisea* Fuente:(McGinnis (1980), Chandler et al. (1980), Rippon (1988), de Hoog et al. (2000, 2004a, 2012, 2015), Desnos-Ollivier et al. (2006))

Cultivo:

Colonia gris u olivácea, de lento crecimiento, voluminosa, corácea, algunas veces presentan pliegues con hifas aéreas cortas. Las colonias pueden adquirir un pigmento marrón rojizo. La temperatura óptima de crecimiento es de 30° C. Las hifas son de pared pigmentada, septadas, de

1–3 μm de diámetro. Los aislamientos generalmente son estériles y algunos solo presentan clamidoconidios (4–7 x 3–4 μm). Ocasionalmente se pueden observar picnidios en medios pobres.

Medicopsis romeroi (antes *Pyrenochaeta romeroi*)

Granos: blandos, negros, oscuros, esféricos, tubulares o irregularmente curvados de 0.5–1.5 mm de diámetro. Carece de material intersticial y el centro es pálido. Las hifas presentan abundante pigmento en la periferia del grano; igualmente a este nivel las células son voluminosas.



Imagen 5.16: Morfología colonial y microscópica de *Medicopsis romeroi* Fuente: (Guégan S, Garcia-Hermoso D, Sitbon K et al(2016), Ten-Year Experience of Cutaneous and/or Subcutaneous Infections Due to Coelomycetes in France [En línea] recuperado de DOI: 10.1093/ofid/ofw106)

Cultivo:

Colonia gris oscura y algodonosa, con margen claro. Crece lentamente a 37° C, y con mayor rapidez a 30° C. Produce picnidios casi negros (50–150 x 40–300 μm). En la pared interna de los picnidios se forman conidióforos que a su vez producen conidios hialinos, elípticos, de 1–1.5 x 2–5 μm .

Falciformispora senegalensis (antes *Leptosphaeria senegalensis*) (no reportado en México)

Granos: suaves, negros, alcanzan hasta 1 mm de diámetro. En ocasiones se observan grandes agregados de hifas viejas que no adquieren la forma de un grano normal. Pueden ser tubulares o huecos, con la periferia más oscura que semeja a los granos de *E. jeanselmei*, *M. romeroi* o *T. grisea*. Sin embargo, *F. senegalensis* presenta vesículas más grandes (15–40 μm) y la distribución de las hifas es más irregular que los otros tres hongos. La periferia un cemento oscuro en el cual se encuentran inmersas las vesículas. El centro del grano puede estar libre de filamentos fúngicos o presentar una substancia marrón con unos cuantos filamentos y vesículas.

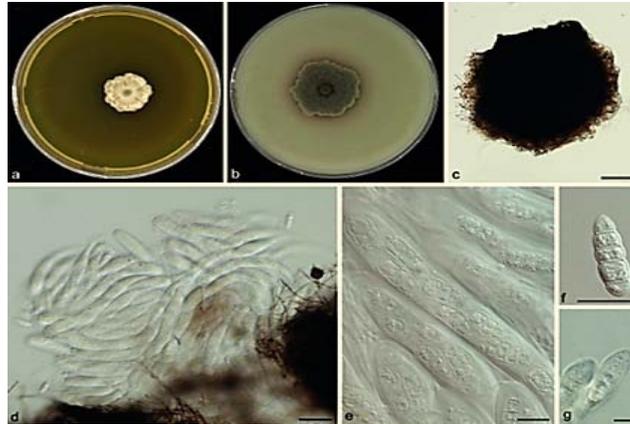


Imagen 5.17: Morfología colonial y microscópica de *Falciformispora senegalensis* Fuente: (Ahmed, S.A.; van de Sande, W.W.J.; Stevens, D.A (2014) Revision of agents of black-grain eumycetoma in the order Pleosporales, Volume 33, pp. 141-154(14) Naturalis Biodiversity Center [En línea] recuperado de DOI: <https://doi.org/10.3767/003158514X684744>)

Cultivo:

Colonia de rápido crecimiento, de color gris a marrón. El reverso es negro aunque a veces es ligeramente rosado. No produce conidiación asexual. En agar harina de maíz, a 25-27° C producen peritecios en 1 a 5 meses, los cuales miden de 100 a 300 μm . Las ascas miden de 17–22 x 80–100 μm y contienen 8 ascosporas. Las ascosporas generalmente tienen 4 septos siendo la segunda célula más ancha que las demás.

Material:

- 1.- Bata Blanca
- 2.- Plumón indeleble
- 3.- Guantes de látex
- 4.- Lentes de seguridad

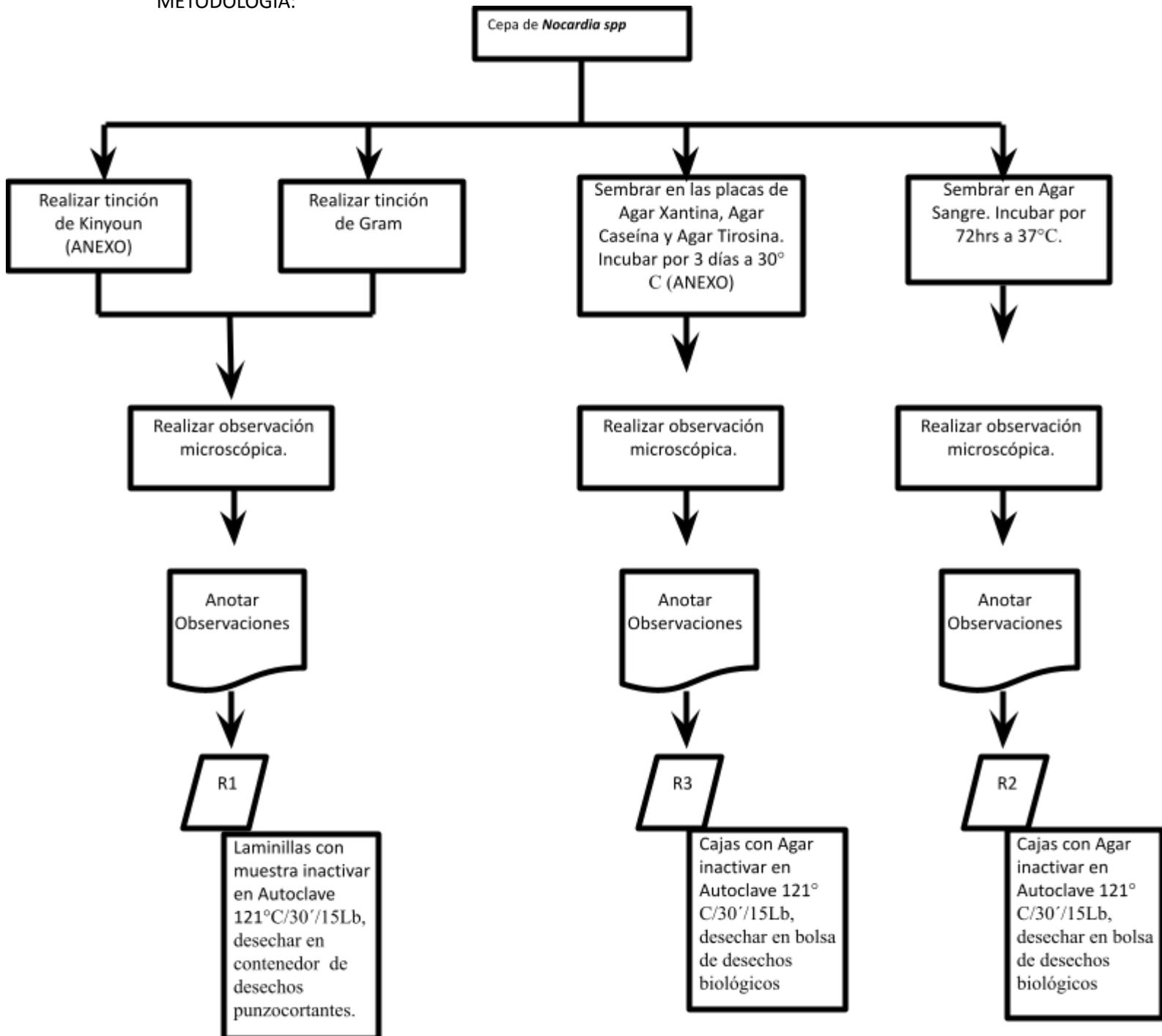
Por equipo:

- 1.- Muestra clínica
- 2.- Tubo con agar DTM
- 3.-CAJA CON AGAR SDA, PDA y AGAR TIERRA PELOS PARA EVALUACIÓN DE PARASITACIÓN
- 4.- Sistema de Microcultivo
- 5.- Tubo de 10 mL con agua destilada
- 5.- Portaobjetos y Cubreobjetos
- 6.- Pinzas

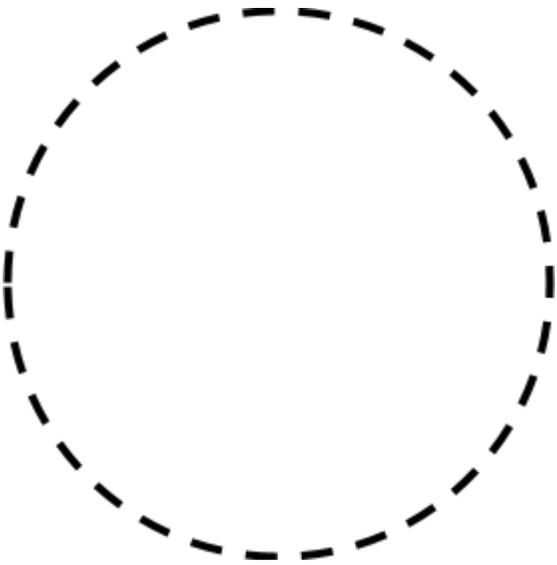
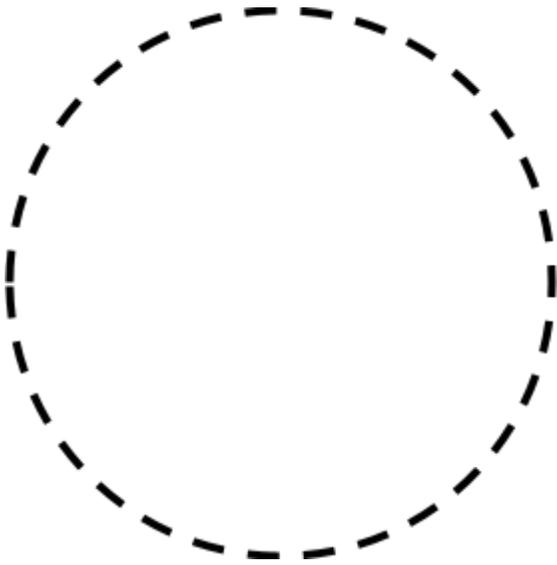
7.- Bisturí con hojas

8.- Asa Bacteriológica en L

METODOLOGIA:



Resultados:



Conclusiones:

Bibliografía:

- Aguilar A, Torres E, Arenas R, López L (2011) Mycetoma caused by *Phaeoacremonium parasiticum* –a case confirmed by B-tubulin sequence analysis *Mycoses*;54(5):e615-8 [En línea] recuperado de DOI:[10.1111/j.1439-0507.2010.01929.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2010.01929.x)
- Ahmed S, van de Sande W, Stevens D et al (2014) Revision of agents of black-grain eumycetoma in the order Pleosporales. *Persoonia*;33:141-154 [En línea] recuperado de doi: [10.3767/003158514X684744](https://doi.org/10.3767/003158514X684744)
- Brown-Elliott B, Brown J, Conville P et al (2006) Clinical and laboratory features of the *Nocardia* spp. based on current molecular taxonomy. *Clin Microbiol Rev* 19:259–282 [En línea] recuperado de doi: [10.1128/CMR.19.2.259-282.2006](https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.259-282.2006)
- Develoux M, Audouin J, Tregerr J (1988) Walter A. Mycetoma en Republic of Niger. Clinical features and epidemiology. *Am J Trop Med Hyg*, 38:368-390 [En línea] recuperado de DOI: [10.4269/ajtmh.1988.38.386](https://doi.org/10.4269/ajtmh.1988.38.386)
- Dieng MT, Sy MH, Diop BM, et al 2003 Mycetoma: 130 cases. *Ann Dermatol Vénéréol*; 130:16-19 [En línea] recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12605151>
- Guégan S, Garcia-Hermoso D, Sitbon K et al (2016), Ten-Year Experience of Cutaneous and/or Subcutaneous Infections Due to Coelomycetes in France [En línea] recuperado de DOI: [10.1093/ofid/ofw106](https://doi.org/10.1093/ofid/ofw106)
- Lopez-Martinez R, Mendez-Tovar L, Bonifaz A (2013) Actualización de la epidemiología del micetoma en México. Revisión de 3,933 casos *Gaceta Medica de Mexico* 149:586-92 [En línea] recuperado de <https://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2013/gm135p.pdf>
- Ventura-Flores R, Failoc-Rojas V, Silva-Díaz H (2017) Cromoblastomicosis: características clínicas y microbiológicas de una enfermedad desatendida *Rev. chil. infectol.* vol.34 no.4 [En línea] recuperado de <http://dx.doi.org/10.4067/s0716-10182017000400404>

MICOSIS PRODUCIDAS POR EL GÉNERO CÁNDIDA

El género *Candida* es un grupo de levaduras de origen polifilético, no relacionadas, por lo que puede considerarse como un género artificial y anamórfico (ciclo sexual no descrito). La definición del género incluye las siguientes características: i) colonia con ausencia de pigmentos carotenoides o melánicos; ii) forma celular variable (globosa, elíptica, cilíndrica, o triangular); iii) pared celular con 2 capas; iv) el hidrolizado de la célula completa no contiene xilosa; v) prueba con azul B de diazodio (DBB), negativa; vi) compuestos similares al almidón, ausentes; vii) pseudo hifas o hifas verdaderas, presentes o ausentes; viii) gemación holoblástica; ix) balistosporas ausentes; y x) arthroconidios ausentes. Existen aproximadamente 180 especies de *Candida*, pero sólo una docena son de interés médico. La clasificación taxonómica del género es la siguiente: Dominio: *Eukarya* Reino: *Fungi* Division: *Deuteromycota* Clase- *Blastomycetes* Orden- *Cryptococcales* Familia- *Cryptococcaceae* Género- *Candida*.

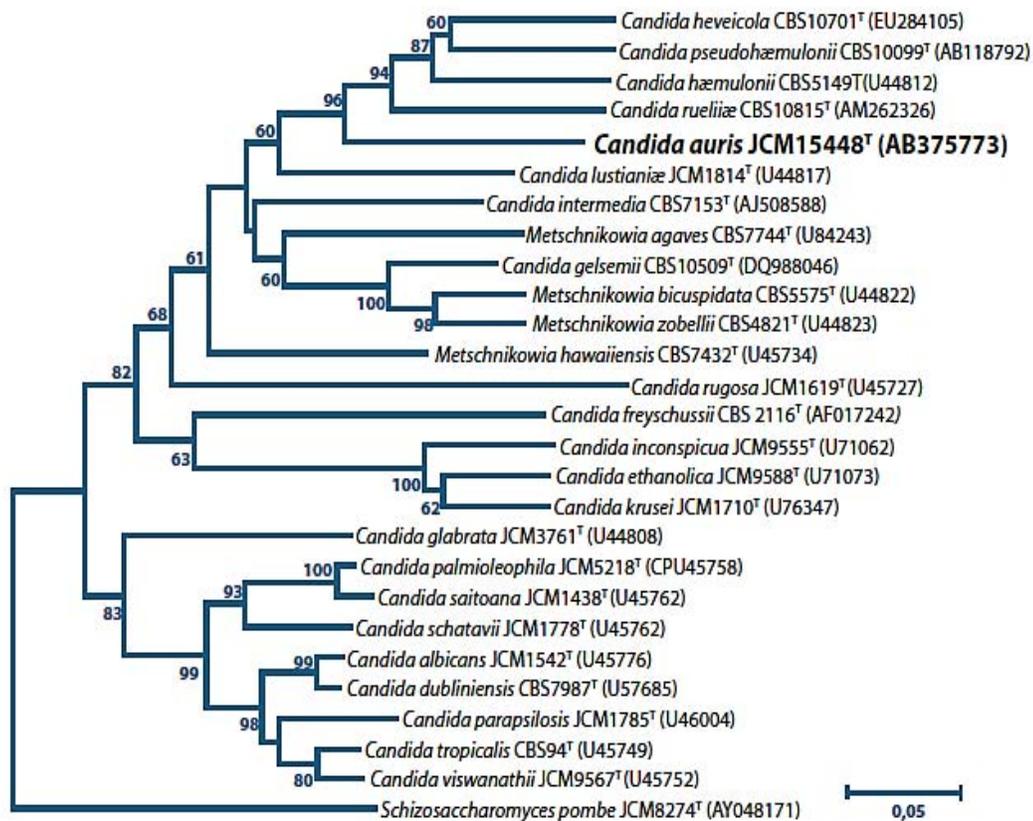


Imagen 6.1: Árbol filogenético de la familia *Candida* Fuente: (Satoh, K., et al. "Candida auris sp. Noviembre, una novela de levadura ascomicética aislada del canal externo de un paciente hospitalizado en un hospital japonés". *Microbiol. Immunol.* 2009; 53: 41-44 Lockhart S., et al. "Emergencia simultánea de *Candida auris* multirresistente en 3 Continentes confirmada por secuenciación de genoma completo y análisis epidemiológicos". *Clin. falta. Dis.* 2017; 64: 134-139)

C. albicans es la especie de mayor frecuencia de aislamiento, se ha aislado del tracto digestivo y de la cavidad oral de humanos y de diversas especies animales como: primates, bovinos, equinos, cerdos, gatos, perros, conejos, cobayos, hurones, jirafas, pájaros, urracas,

pavorreales, tortugas, entre otros. En los seres humanos, *Cándida albicans* forma parte del microbioma, habitan en individuos sanos como comensales en mucosas (boca, faringe, laringe, tracto gastrointestinal y vagina) sin causar enfermedades y la colonización se presenta a partir de los primeros días del nacimiento. En individuos sanos, *C. albicans* es la especie más frecuentemente aislada (70-80%), le siguen, *Cándida glabrata* y *Cándida tropicalis*. La frecuencia de aislamiento, de las diferentes especies, está en función del sitio anatómico afectado, cuadro clínico, edad de los pacientes, factor predisponente, y sitio geográfico de residencia.

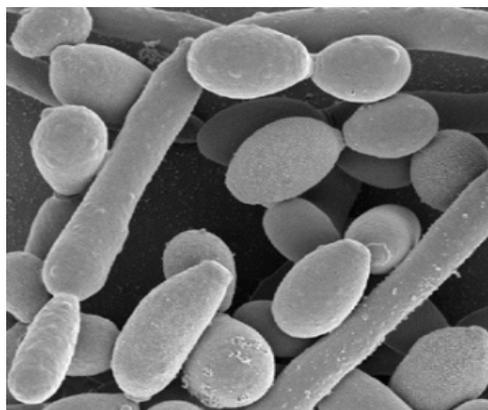


Imagen 6.2: Fotografía de microscopía electrónica de barrido de *Cándida albicans* Fuente: (Segebre 2016)

EPIDEMIOLOGÍA EN MÉXICO

Existen más de 200 especies de *Cándida*, pero solo cerca de 15 son reconocidas como patógenos frecuentes en el humano incluyendo *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. pelliculosa*, *C. kefyr*, *C. lipolytica*, *C. famata*, *C. inconspicua*, *C. rugosa*, y *C. norvegenis*. E. Shekelle, Pfaller MA, 2007

Las diferentes especies de *Candida* son capaces de producir todos los síndromes clínicos aunque la infección con *Candida albicans* siendo por mucho la más frecuente. (E. Shekelle, Kauffman CA, 2010) La identificación de la especie de *Cándida* es de importancia crítica, no solo porque está relacionado con la susceptibilidad antifúngica, si no por la diferencia en la potencia de virulencia entre las diferentes especies. (E. Shekelle, Wisplinghoff H, 2004) La distribución de especies aisladas en candidemias es: *C. albicans* (50.4-47.4%), *C. glabrata* (18.1-17.5%), *C. parapsilosis* (18.9-15.1%), *C. tropicalis* (10.5- 9.6%), *C. krusei* (2.1%) y otras (4.4-4.0%) (*C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*) (E. Shekelle, Pfaller MA, 2011) *C. krusei* se considera intrínsecamente resistente a azoles, es responsable de aproximadamente 2.1% del total de las candidemias con predilección de pacientes adultos neutropénicos. (E. Shekelle, Pappas PG, 2009.) *C. glabrata* se aísla con mayor frecuencia en pacientes ancianos, pacientes con cáncer, exposición previa a fluconazol y aquellos que fueron tratados con piperacilona/tazobactam y vancomicina. (E. Shekelle, Alangaden GJ, 2011) La susceptibilidad de *C. glabrata* a azoles varía de sensible a intermedio, el 20% desarrollan resistencia durante la terapia o profilaxis con fluconazol. (E. Shekelle, Faller MA, 2011.)

Candidemia se refiere la presencia de *Candida* en el torrente sanguíneo, las presentaciones clínicas más frecuentes son:

- Infección focal Invasiva (endoftalmitis, infección osteoarticular, meningitis, endocarditis, peritonitis y otras infecciones intraabdominales, neumonía, empiema, mediastinitis).
- Infección sistémica. (E. Shekelle, Kauffman CA, 2012) La candidiasis invasiva puede involucrar virtualmente cualquier órgano, y por tanto, tiene una amplia variedad de manifestaciones. No hay características clínicas distintivas que predigan candidiasis invasiva y que permitan guiar a una terapia antifúngica específica. (E. Shekelle, Pappas PG, 2006) Las claves clínicas en el examen físico de que ocurre una invasión hematógena por *Cándida* incluyen: lesiones características de los ojos (corioretinitis con o sin vitritis), lesiones en piel, y con menor frecuencia abscesos musculares. La frecuencia de las lesiones oftálmicas en los pacientes con candidemia es variable, con un rango de 28 a 37% según diferentes estudios y se presenta con mayor frecuencia a las 2 semanas posterior a la candidemia. (E. Shekelle, Kauffman CA, 2012.) Las lesiones en la piel tienden a aparecer súbitamente como un grupo de pústulas dolorosas con base eritematosa; pueden presentarse en cualquier parte del cuerpo. Varían desde pequeñas pústulas que pueden ser fácilmente pasadas por alto, hasta otras que son nodulares, de varios centímetros de diámetro, y con necrosis en el centro. En pacientes con neutropenia severa, las lesiones pueden ser maculares más que pustulosas. En pacientes con hemocultivos negativos, el reconocimiento de estas lesiones es una manifestación de Candidemia y una biopsia en sacabocado pudiera definir el diagnóstico. Los pacientes pueden describir dolor en un grupo muscular específico causado por micro abscesos por *Candida*. (E. Shekelle, Kauffman CA, 2012.)

Los síndromes clínicos comúnmente asociados son:

- Candidemia.
- Candidiasis diseminada aguda.
- Endocarditis por *Cándida*.
- Osteomielitis vertebral o disquitis.
- Endoftalmitis.
- Candidiasis diseminada crónica.
- Con menor frecuencia tracto gastrointestinal, sistema nervioso central, empiema, neumonía, mediastinitis, pericarditis.

Candidiasis diseminada aguda.

- Es vista en pacientes que recibieron quimioterapia citotóxica por patología hematológica.

- En la mayoría se ha documentado candidemia, son enfermos críticos y muchos tienen afección o falla multiorgánica.
- Los pacientes neutropénicos pueden manifestar discreto eritema o pápulas hemorrágicas palpables las cuales son características de vasculitis de pequeños vasos. (E. Shekelle, Pappas PG, 2006)

Endocarditis por *Cándida*

- El 2% de las endocarditis infecciosas son causadas por hongos.
- *Cándida spp* representa el 66% de los casos de endocarditis fúngica.
- Se presenta en individuos que tienen dispositivos intravenosos de forma crónica (ej. Hickman, Broviac) o catéter de gran calibre.
- Otros factores de riesgo son anomalías valvulares, válvulas protésicas, anomalías congénitas (defectos ventriculoseptales) uso de drogas ilícitas, especialmente heroína. (E. Shekelle, Quagliarello V, 2005 Pappas PG, 2006)

Osteomielitis Vertebral y diskitis

- Su presentación asociada a candidemia no tratada o no reconocida es común.
- Puede ser causado por cualquier especie de *Cándida*.
- Los síntomas usualmente se manifiestan varias semanas a meses después del episodio de candidemia.
- Presentan típicamente dolor crónico progresivo en región lumbosacra, usualmente sin fiebre, pérdida de peso u otros síntomas consuntivos.
- En la enfermedad avanzada pueden desarrollar síndromes compresivos con pérdida completa de la función. (E. Shekelle, Pappas PG, 2006)

Endoftalmitis

- Hasta en un 37% de los pacientes con candidemia no tratada se pueden observar lesiones en retina.
- La forma completa de endoftalmitis es poco común; en áreas con efectividad de azoles menos del 1% desarrollan retinitis o endoftalmitis si son tratados.
- Presentan lesiones coroidales que progresan a necrosis retinal seguida de vitritis y endoftalmitis.
- Las formas no tratadas desarrollan ceguera.
- El involucro unilateral es la regla pero puede ser bilateral.

- Cerca del 90% de los casos son debido a (*C. albicans*. E. Shekelle, Pappas PG, 2006)

Candidiasis crónica diseminada (*Candidiasis Hepatoesplénica*)

- Es vista casi exclusivamente en pacientes con malignidades hematológicas quienes se recuperan de cuadro de neutropenia.
- Presentan fiebre de bajo grado dolor en hipocondrio derecho, hepato-esplenomegalia, elevación de transaminasas.
- Los estudios de imagen demuestran lesiones focales múltiples en hígado, bazo, riñones, y raramente pulmones. (E. Shekelle, Pappas PG, 2006)

Peritonitis e infecciones intraabdominales:

- Asociada a perforación del tracto gastrointestinal, fugas anastomóticas o pancreatitis necrotizante, colecistitis gangrenosa y como complicación de diálisis peritoneal.
- Puede ocurrir obstrucción del conducto biliar común por “bola fúngica” por *Candida*.
- Los síntomas de peritonitis no difieren de las formas bacterianas. (E. Shekelle, Kauffman CA, 2010) Neumonía:
- Se considera una entidad extremadamente rara, expertos consideran a esta entidad clínica prácticamente inexistente.
- Los cultivos sólo reflejan colonización o contaminación orofaríngea. (E. Shekelle, Kauffman CA, 2010)

Otro ejemplo es el reportado por (Iglesias-Benavides y cols., 2007) realizado en México, en muestras ginecológicas, *C. glabrata* presentó el mayor número de aislados (57%), especialmente con cuadros clínicos de vaginitis e infertilidad, seguido de *C. albicans* (38%) (mujeres asintomáticas) y en menor frecuencia *C. tropicalis* (3.5%) y *C. famata* (1.7%).

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DEL GÉNERO *Candida*.

La diferenciación entre especies del género *Candida* en ocasiones es altamente compleja, en otras, se encuentran diferencias que requieren separar, en una nueva especie, aquellas que presentan características “atípicas” (*C. dubliniensis* se diferenció de *C. albicans*; y *C. nivariensis* de *C. glabrata*) o en otros casos son integradas a especies comúnmente aceptadas y son consideradas como sinónimos o variantes de éstas. Así, con base en la similitud significativa entre sus DNAs, *C. stellatoidea*, *C. clausenii* y *C. langeronii* son sinónimos de *C. albicans*; *C. pseudotropicalis* es sinónimo de *C. kefyr*; y *C. paratropicalis* es sinónimo de *C. tropicalis*. Otro grupo de especies estudiado es el grupo psilosis, en el cual se encontraron diferencias suficientes para integrarlas en los grupos I, II y III y que actualmente han sido designadas como *Candida parapsilosis sensu stricto* (corresponde a la mayoría de los aislados clínicos), *Candida orthopsilosis* y *Candida metapsilosis*, su

frecuencia de aislamiento varía de acuerdo a la distribución geográfica estudiada. Por otro lado, una de las características diferenciales del género *Candida* es la formación de pseudohifas, sin embargo, *Torulopsis glabrata*, actualmente denominada como *C. glabrata*, no forma pseudohifas, por lo que es posible que posteriormente sea reclasificada. La nueva especie fue aislada de casos clínicos. Entre las características fenotípicas de esta nueva especie se presentan: *C. nivariensis* no es capaz de formar tubo germinativo, clamidoconidios, pseudohifas o ascosporas, aún en periodos largos de incubación, y fermenta la trémalos.

Cuando se requiere hacer la identificación de especies del género *Candida* a partir de muestras clínicas, ésta se inicia con la sospecha de Candidosis a partir del cuadro clínico, tiempo de evolución, sitio anatómico afectado, factores predisponentes, etc., destacando, la existencia de tratamientos específico en función de la especie aislada. A partir de los especímenes clínicos se recomienda efectuar examen directo con KOH al 20%, tinción de Gram. En las preparaciones teñidas a partir de muestras clínicas, es muy importante observar la aparición de blastoconidios o comúnmente conocidos como levaduras en gemación para tener un indicio de que estas poseen la capacidad de fungir como agente patógeno y no estrictamente como parte de la microbiota.

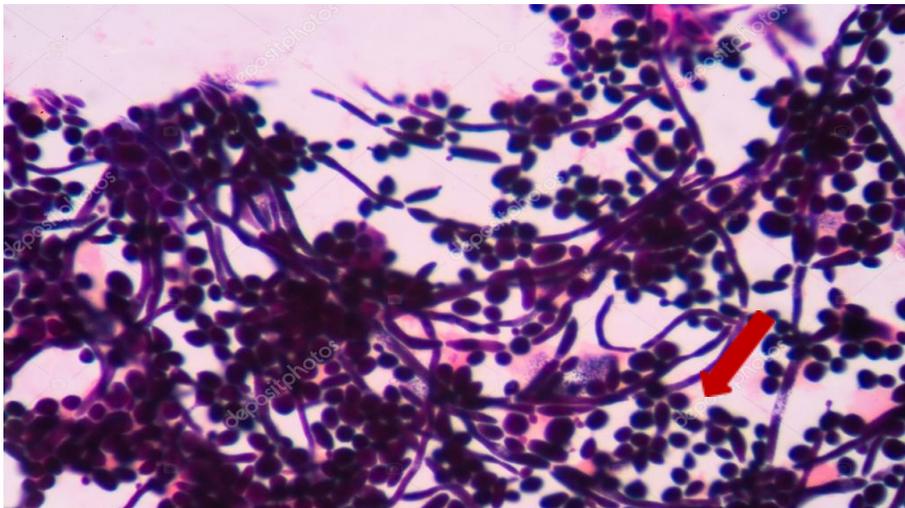
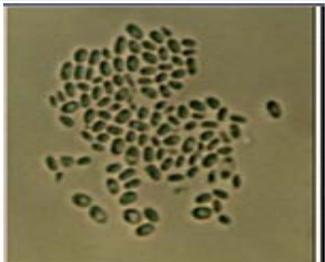
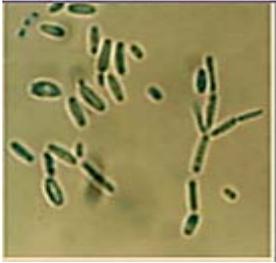


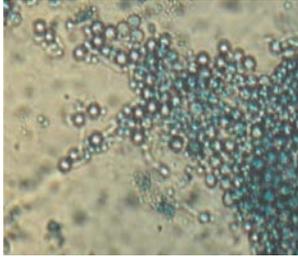
Imagen 6.3: Preparación de muestra clínica teñida con Gram. Se pueden observar filamentos, levaduras y blastoconidios señalados con una flecha.. (Fuente: ID imagen:97030460 Copyright: toeytoey Fecha de carga: Jan 25, 2016).

Al igual que en la identificación de las bacterias, es importante conocer la morfología de las colonias en ciertos agares y la morfología microscópica para incrementar las posibilidades de un diagnóstico diferencial certero. Las levaduras del género *Candida* son microscópicamente diferentes, unas son ligeramente más grandes que otras, algunas son más redondeadas y otras más ovaladas, en algunos agares unas producen colonias lisas y otras producen colonias más rugosas, por ello es necesario contar con todos estos datos antes de emitir un diagnóstico definitivo.

TABLA 1.- Morfología colonial y microscópica del Genero *Candida*

Especie	Crecimiento en SDA	Morfología microscópica	Características de diferenciación
<i>C. albicans</i>	 <p>Durante un tiempo de 24- 48hrs se obtienen colonias lisas, blandas, de color blanco o beige, que con el tiempo van cambiando su aspecto a colonias plegadas, rugosas o membranosas. Fuente: (Ami 2008, Robles 2004,Pineda 2008)</p>	 <p><i>Candida albicans</i> es una levadura de forma oval (de 2 a 4 micras de diámetro) y paredes finas que se reproducen por yemas (también denominadas blastosporas); en ocasiones después de la división por gemación, las levaduras y las blastosporas quedan adheridas, formando cadenas o pseudohifas. También pueden existir verdaderas hifas normales de tipo filamentosas. Las células fungosas generalmente se limitan al tejido epitelial y rara vez se extienden más profundamente. Fuente: (Stanchi. 2007. Microbiología veterinaria. Intermedica editorial XX-2007. Buenos Aires, Republica de Argentina.)</p>	<p>Se caracteriza por presentar clamidosporos globosos, terminales, de espesa pared celular, a veces en gran número. El pseudomicelio es abundante y ramificado y el micelio verdadero puede ser encontrado en los cultivos más viejos. Los Blastosporos ovoides o globosos reunidos generalmente en forma de bola. La hifa verdadera posee varios septos, al contrario de la pseudo-hifa que nos muestra un número escaso. Fuente: (Gresham, G. A. & Wittle, C. H. (2001) Studies of the invasive mycelial form of <i>Candida albicans</i>. Sabouraud)</p>
<i>C. glabrata</i>	 <p>Origina en 24-48 h, unas colonias lisas, no adherentes, de color blanco o cremoso, más o menos brillantes e indiferenciables de la mayoría de otras especies de levaduras del mismo género Fuente:(BODEY GP. Candidiasis. Pathogenesis, diagnosis, and treatment, (1993) ed. New York: Raven Press,)</p>	 <p><i>C. glabrata</i> crece a 37 °C en agar glucosado de Sabouraud (AGS), con o sin antibióticos, pero es inhibida por la presencia de cicloheximida. En AGS, en 24-48 hs., da lugar a colonias lisas, no adherentes, de color blanco o cremoso, más o menos brillantes e indiferenciables de la mayoría de otras especies de levaduras del mismo género. Fuente:(HARRIS AD, CASTRO J, SHEPPARD DC, et al. Risk factors for nosocomial candiduria due to <i>Candida glabrata</i> and <i>Candida albicans</i>. Clin Infect Dis 1999 DOI: 10.1086/520460)</p>	<p>Blastoconidios, 2,5-4,5x4-6 μm Seudohifas, No, Clamidosporas, No, Número de cromosomas, diploide 11, haploide, Asimilación de azúcares, Glucosa, Trealosa, Color en medios cromogénicos CHROMagar, Lila-Purpura, <i>Candida</i> ID, Blanco, Crecimiento en cicloheximida 0,1% -, Virulencia experimental +, Resistencia triazoles +++. Fuente:(HARRIS AD, CASTRO J, SHEPPARD DC, et al. Risk factors for nosocomial candiduria due to <i>Candida glabrata</i> and <i>Candida albicans</i>. Clin Infect Dis 1999 DOI: 10.1086/520460)</p>

<p><i>C. tropicalis</i></p>	 <p>Las colonias de <i>C. tropicalis</i> presentan un aspecto cremoso, blando, liso, brillante, con borde rugoso, micelios cerca del margen y olor a levadura de pan o cerveza. Fuente: (HARRIS AD, CASTRO J, SHEPPARD DC, et al. Risk factors for nosocomial candiduria due to <i>Candida glabrata</i> and <i>Candida albicans</i>. Clin Infect Dis 1999 DOI: 10.1086/520460)</p>	 <p>En cornmeal-Tween 80 agar a 25°C durante 72 horas forma blastoconidias de entre 4-8 x 5-11µm de tamaño individuales o en muy pequeños grupos en cualquier lugar a lo largo de la pseudohifa, y abundantes pseudomicelios, que consisten en elementos largos y pobremente ramificados frecuentemente estrechados en la punta, con conidias laterales. Fuente: (HARRIS AD, CASTRO J, SHEPPARD DC, et al. Risk factors for nosocomial candiduria due to <i>Candida glabrata</i> and <i>Candida albicans</i>. Clin Infect Dis 1999 DOI: 10.1086/520460)</p>	<p>Produce pseudomicelio abundante y ramificado, con verticilos de blastosporos dispuestos en cadenas simples, irregulares o ramificadas. El micelio verdadero puede estar presente en cultivo. Los blastosporos son ovoides o semiglobosos. El Clamidosporos en forma más o menos periforme (en gota o lágrima) puede estar formado. Fuente: (HARRIS AD, CASTRO J, SHEPPARD DC, et al. Risk factors for nosocomial candiduria due to <i>Candida glabrata</i> and <i>Candida albicans</i>. Clin Infect Dis 1999 DOI: 10.1086/520460)</p>
<p><i>C. krusei</i></p>	 <p>Fuente: (https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1529&sectionid=98865937) El desarrollo de las levaduras se torna visible a las 24-48 hs a 28 °C aunque no conviene eliminar los tubos sembrados antes de los 7 días para los materiales superficiales y de 1 mes para los profundos. Las colonias obtenidas son generalmente lisas, blandas, brillantes, de color blanco o ligeramente beige; con el tiempo pueden tornarse rugosas, plegadas o membranosas. Fuente: (Kwong-Chung K.J., Bennet M.D. (1992). Medical Micology. Lea & Febiger. Philadelphia -London)</p>	 <p>Es una levadura de forma oval (de 2 a 4 micras de diámetro) y paredes finas que se reproducen por yemas (también denominadas blastosporas); en ocasiones después de la división por gemación, las levaduras y las blastosporas quedan adheridas, formando cadenas o pseudohifas. También pueden existir verdaderas hifas normales de tipo filamentoso. Las células fungosas generalmente se limitan al tejido epitelial y rara vez se extienden más profundamente. Fuente: (Kwong-Chung K.J., Bennet M.D. (1992). Medical Micology. Lea & Febiger. Philadelphia - London)</p>	<p>Presenta pseudomicelio constituido de células alargadas y delgadas, ramificándose como tallos de árbol. Los Blastosporos ovoides y predominantemente cilíndricos, dispuestos verticiladamente en las constricciones del pseudomicelio. Los blastosporos se desintegran fácilmente, permaneciendo a los lados del pseudomicelio en pequeños aglomerados, asemejándose a palitos amontonados de fósforos entrecruzados. El crecimiento en un cultivo en lámina es opaco, aspecto más evidente en una macro colonia. Fuente: (Kwong-Chung K.J., Bennet M.D. (1992). Medical Micology. Lea & Febiger. Philadelphia - London)</p>

<p><i>C. parapsilosis</i></p>	 <p>Son levaduras ovales de 3 X 8 μm y forman colonias cremosas que en ocasiones desarrollan un aspecto rugoso. Fuente: ((Lasker et al., 2006; Kuhn et al., 2004., López et al., 2010)</p>	 <p>Ausencia de cualquier tipo de filamentos en cuyo caso se diferencian dos patrones: a) blastoconidias pequeñas (menores de 5 μm) redondas y uniformes, características. Fuente: (Lasker et al., 2006; Kuhn et al., 2004., López et al., 2010)</p>	<p>En esta especie el pseudomicelio forma células gigantes que se diferencian fácilmente cuando comparamos al pseudomicelio constituido de células pequeñas. El pseudomicelio generalmente es bastante ramificado, verificándose en sus constricciones pocos blastosporos dispuestos en verticilos. Los Blastosporos globosos y/o ovoides ligeramente alargados pueden ser observados. Fuente: ((Lasker et al., 2006; Kuhn et al., 2004., López et al., 2010)</p>
<p><i>C. dubliniensis</i></p>	 <p>Fuente: https://www.researchgate.net/figure/Figura-3b-Aspecto-microscopico-de-C-dubliniensis-en-agartabaco-con-presencia-de_fig4_260765551 Al cabo de las 24-48 h se pueden observar las colonias características de color blanco o crema, de consistencia opaca, elevadas, lisas, brillantes o mates, y con un diámetro de 1 a 3 mm. Fuente: (López et al., 2005, Price et al., 1994)</p>	 <p>Fuente: https://www.researchgate.net/figure/Figura-3b-Aspecto-microscopico-de-C-dubliniensis-en-agartabaco-con-presencia-de_fig4_260765551 Presencia de pseudohifas: blastoconidias acompañadas de prolongaciones que se inician desde un septo, las cuales exhiben una relación mayor entre el ancho y el largo que las hifas o tubos germinales; además, presentan múltiples constricciones septadas y se pueden observar como una secuencia de blastoconidias gemantes no separadas. Fuente: (López et al., 2005, Price et al., 1994)</p>	<p>Capacidad de crecimiento a 42°C en agar glucosado de Sabouraud; producción de tubos germinativos, pseudohifas y clamidoconidios en agar leche con Tween 80 sobre portaobjetos; capacidad de crecimiento en agar hipersalado con NaCl a 11%; producción de lipasas en medio de opacidad con Tween 80; color y aspecto macroscópico de las colonias y capacidad de formación de clamidoconidios en agar tabaco; características macro y micromorfológicas de las colonias en agar Pal CHROM; utilización de diversos sustratos mediante el uso de galerías API ID 32C® (Laboratorio BioMérieux SA, Marcy L'Étoile, Francia). Fuente: (Carballo G, (2019) Identificación fenotípica de Candida dubliniensis aislada de candidosis de mucosa oral en pacientes Inmunodeprimidos, Dermatol Rev Mex 63(1):14-25.)</p>

Posteriormente a la observación de las primeras preparaciones teñidas, se realiza el aislamiento del agente etiológico inoculando la muestra en los diferentes medios de cultivo. *Candida spp* crece en la mayoría de los medios de cultivos habituales, como son: Sabouraud dextrosa agar (SDA), papa dextrosa agar, gelosa sangre, infusión de cerebro corazón, extracto de levadura y soya tripticasa. *C. albicans* crece en micosel, sin embargo, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* y *C. zeylanoides* son inhibidas por la actidiona presente en el medio, por lo que se recomienda hacer siembras a la par en SDA. En este medio, en general se presentan como colonias de crecimiento rápido (2 a 3 días a 28 ó 35 °C), limitadas, planas, de color blanco a crema, húmedas, lisas (aunque algunas pueden ser rugosas), butirosas, brillantes u opacas, en ocasiones puede observarse pseudomicelio. El medio de biggy (Nickerson modificado), este medio es

selectivo para el género *Candida*, contiene gran cantidad de citratos los cuales eliminan la microbiota bacteriana, y contiene sulfitos, los cuales son reducidos a sulfuros. La diferenciación, en este medio, está basada en la morfología colonial y la pigmentación típica que se produce por la reducción de sulfito de bismuto, la pigmentación de la colonia en ocasiones difunde al medio, se desarrollan colonias color café claro a oscuro con brillo metálico. En muestras clínicas de sangre el pretratamiento con lisis de eritrocitos y centrifugación incrementan la detección de las levaduras de *Candida*.

Una herramienta útil para distinguir las especies más frecuentes del género *Candida*, es el desarrollo en medios cromogénicos, también conocidos como Chromagar. Existen medios cromogénicos para distintas finalidades y de diversas marcas comerciales, pero de forma general, al medio se adicionan componentes que las levaduras emplearán de forma selectiva y generarán colonias de diferentes colores. En el caso del Chromagar BD Biosciences*, las levaduras de la especie *C. albicans* desarrollarán colonias de color verde, a diferencia de las colonias típicas de *C. glabrata* de color paja. En el caso de *C. tropicalis* genera colonias azul oscuro y *C. krusei* da origen a colonias rosas (Imagen 6.4).

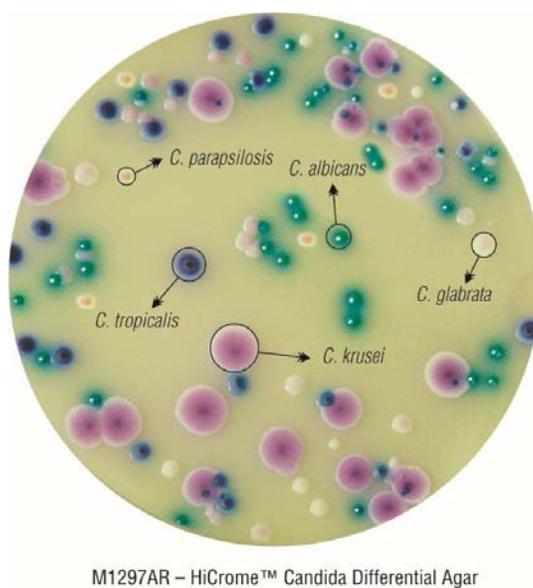


Imagen 6.4: Desarrollo de colonias del género *Candida* en Chromagar BD Biosciences* donde se observa un patrón de coloración que permite distinguir a las especies más frecuentemente aisladas. (Fuente: <https://ridacom.com/en/products/view/5017>).

Aunque el uso de herramientas como el Chromagar es actualmente muy difundido y de fácil acceso, no es un mecanismo definitivo de diagnóstico diferencial pues depende del observador quizá la identificación de las tonalidades de las colonias presentes y además, cuando en la muestra se encuentra presente alguna especie poco frecuente, esto puede dar lugar a impresiones en la identificación. Por ello es necesario sumar otras pruebas para lograr la identificación con alto grado de certeza, en el caso de *C. albicans*, se ha mencionado su capacidad de generar estructuras de resistencia en presencia de condiciones hostiles en el medio, por ejemplo baja concentración de nutrientes o cambios bruscos de temperatura. Estas estructuras de

resistencia (similares en función a las esporas bacterianas), se conocen como clamidoconidias y constituyen otra herramienta más en el identificación de la especie *C. albicans*.

Para identificar si la levadura es capaz o no de producir clamidoconidias, se siembra en agar Corn meal (Agar Harina de Maíz, que es un medio pobre en nutrientes) mediante estría profunda y se coloca sobre esta estría un cubreobjetos estéril. Se incuba por algunas horas y posteriormente se busca al microscopio en este cubreobjetos la producción de estructuras redondas y grandes en los filamentos de hifas. En el caso de *C. albicans* se generan clamidoconidias aisladas y para *C. dubliniensis*, las clamidoconidias se generan en racimos o grupos de varias (Imagen 6.5).

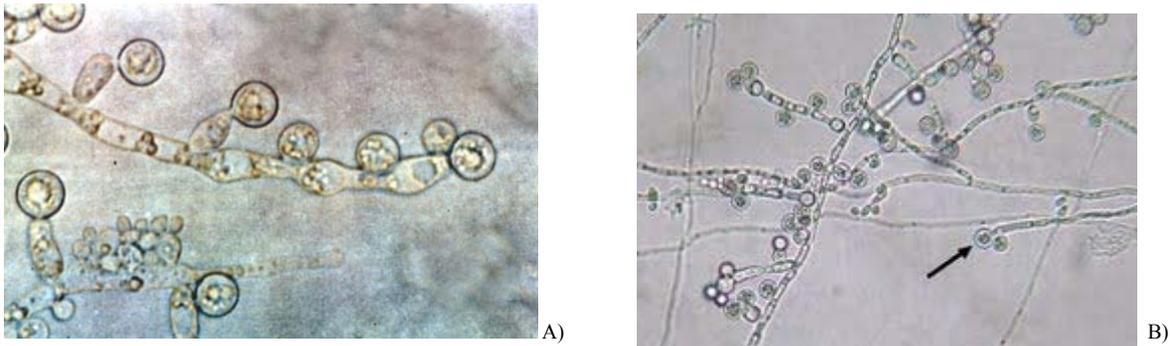


Imagen 6.5: Desarrollo de clamidoconidias en levaduras del género *Candida* en agar Corn Meal donde se observa la producción diferencial de estas estructuras de resistencia. En el caso de *C. albicans*, se observan clamidoconidias aisladas y para *C. dubliniensis*, se observan en racimos o agrupadas. Fuente: (Mendoza M (2005) Importancia de la identificación de levaduras Rev. Soc. Ven. Microbiol. v.25 n.1 [En línea] recuperado de ISSN 1315-2556)

Una tercera herramienta para generar un diagnóstico con mayor certeza para la especie *C. albicans*, se trata de su habilidad para desarrollar estructuras invasivas conocidas como tubo germinativo a las 2 horas de incubación. Algunas otras especies de *Candida* son capaces de formar esta estructura pero tardan más en llevarlo a cabo.

En esta prueba, contrario a la anterior, se provee a la levadura de un medio muy alto en nutrientes, por ejemplo suero fetal bovino o suero humano y se incuba 2 horas. Posteriormente, se toma una muestra de este medio y se observa al microscopio las estructuras conocidas como tubo germinativo (Imagen 6.6). *C. albicans* produce estas estructuras en 2 horas de incubación pero existe la posibilidad de que *C. tropicalis* desarrolle estructuras parecidas pero requiere más tiempo para ello y se observa una constricción visible adyacente a la célula madre.

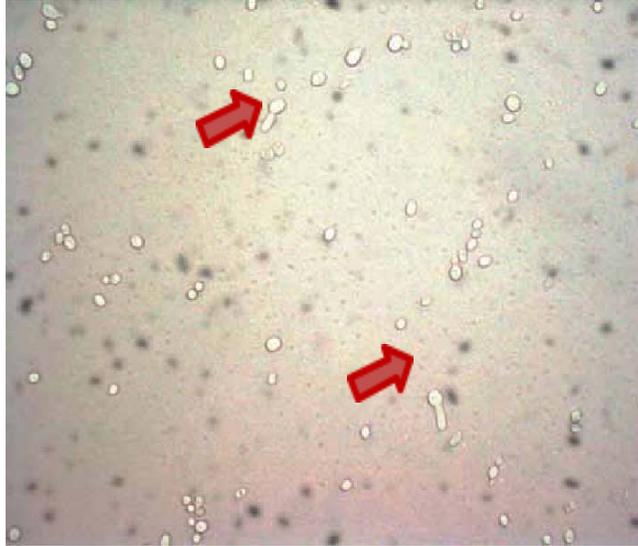


Imagen 6.6: Desarrollo de tubo germinativo en levaduras del género *Candida* en suero donde se observa la producción de estructuras invasivas. En el caso de *C. albicans*, se observan a las 2 horas de incubación. (Fuente: Baena Del Valle et al., 2011).

Si se emplean estas tres técnicas para la identificación de las levaduras, habremos superado el 90% de certeza en el proceso, sin embargo, si deseamos una identificación con 100% de certeza, es necesario probar las características metabólicas de las levaduras realizando pruebas de asimilación y fermentación de carbohidratos, mejor conocidas como auxonograma y zimograma respectivamente. Estas pruebas consisten en inocular medios de cultivo (como base sin carbohidratos) y se adiciona a cada uno, un carbohidrato diferente a probar y en algunos casos, con indicadores como rojo de fenol o púrpura de bromocresol para identificar con más facilidad el desarrollo de las levaduras. Se incuban estos medios unos días a 25°C y luego de unos 5 días, se evalúa la capacidad de estas levaduras de asimilar o fermentar los carbohidratos que se están probando.

También existen sistemas comerciales estandarizados para realizar estas pruebas de carbohidratos, el más conocido es de la marca Biomérieux*(Imagen 6.7) API® 20 C AUX en que es posible probar una cantidad considerable de carbohidratos y lograr una identificación con completa certeza.



Imagen 6.7: Sistema para auxanograma API®20 AUX de Biomérieux® para evaluar asimilación de carbohidratos en levaduras.

Una herramienta más para el diagnóstico diferencial es la filamentación en medio de Staib (semillas de *Guizotia abyssinica*) pues es un medio diferencial para *C. dubliniensis*, en él se observa en esta especie, la producción de clamidoconidios, mientras que *C. albicans* sólo filameta. Esta prueba requiere de periodos de incubación largos (7 a 10 días). La menor velocidad de formación de hifas de *C. dubliniensis* se considera que contribuye a su menor virulencia comparándola con *C. albicans*

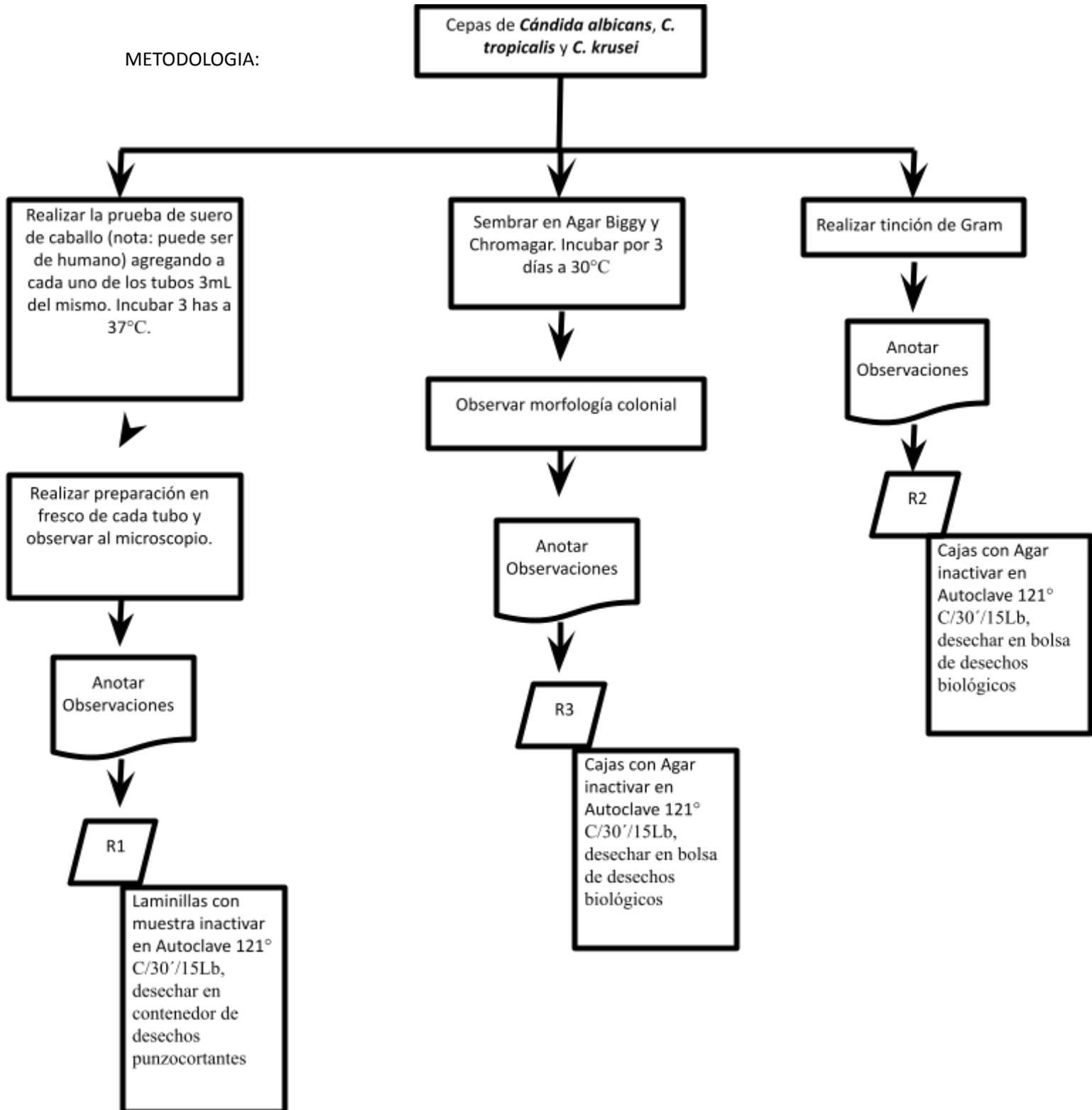
Material:

- 1.- Bata Blanca
- 2.- Plumón indeleble
- 3.- Guantes de látex
- 4.- Lentes de seguridad

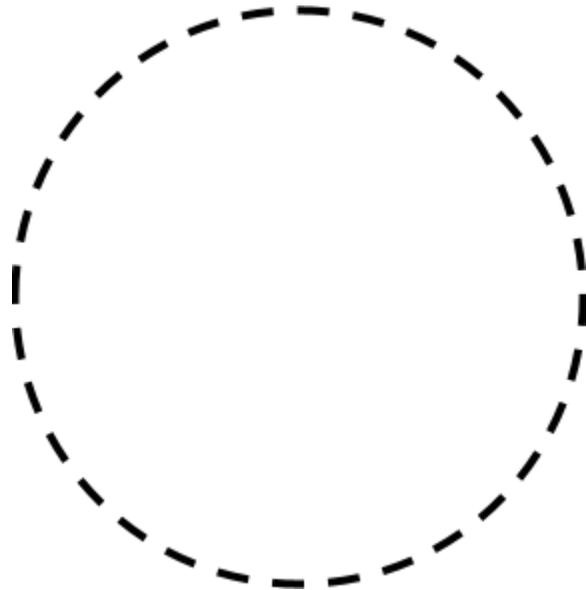
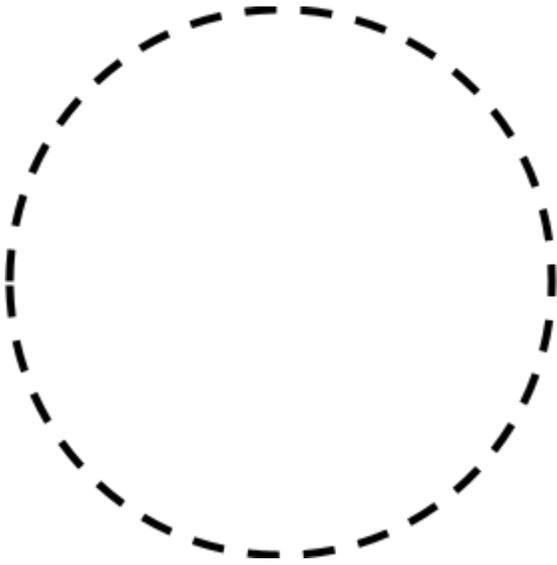
Por equipo:

- 1.- Muestra clínica
- 2.- Tubo con agar DTM
- 3.-CAJA CON AGAR SDA, PDA y AGAR TIERRA PELOS PARA EVALUACIÓN DE PARASITACIÓN
- 4.- Sistema de Microcultivo
- 5.- Tubo de 10 mL con agua destilada
- 5.- Portaobjetos y Cubreobjetos
- 6.- Pinzas
- 7.- Bisturí con hojas
- 8.- Asa Bacteriológica en L

METODOLOGIA:



RESULTADOS:



ANÁLISIS DE RESULTADOS:

CONCLUSIONES:

BIBLIOGRAFÍA:

- <http://www.imss.gob.mx/sites/all/statics/guiasclinicas/562GER.pdf>
- Alcoba-Flores J, Méndez-Álvarez S, Cano J et al (2005) Phenotypic and molecular characterization of *Cándida nivariensis* sp. nov., a possible new opportunistic fungus. *J Clin. Microbiol*; 43:4107-4111 [En línea] recuperado de DOI:10.1128/JCM.43.8.4107-4111.2005
- Alfonso C, López M, Arechavala A et al (2010) Identificación presuntiva de *Cándida* spp. y de otras levaduras de importancia clínica: utilidad de Brilliance *Cándida* Agar. *Rev Iberoam Micol*; 27(2): 90-93 [En línea] recuperado de DOI: 10.1016/j.riam.2010.01.008
- Anaissie E, McGinnis MR & Pfaller M (2003) *Clinical Mycology Annals of Internal Medicine*; Philadelphia Tomo 138, No 9, 776 [En línea] recuperado de <https://search.proquest.com/openview/eb3b715672b4d5db1b35e8b11dc3f37b/1?pq-origsite=gscholar&cbl=42137>
- Brand A. Review Article (2012) Hyphal Growth in Human Fungal Pathogens and Its Role in Virulence. *Internal Journal of Microbiol* Volume 2012, Article ID 517529, 11 pages [En línea] recuperado de doi:10.1155/2012/517529
- Brunke S & Hube B (2012) Two unlike cousins: *Cándida albicans* and *C. glabrata* infection strategies. *Microreview. Cellular Microbiol*; 1-8 [En línea] recuperado de doi: 10.1111/cmi.12091
- Camacho J, Martínez-Rivera M, Manzano-Gayosso P et al (2016) Detección molecular de especies de *Cándida* en especímenes de pacientes hospitalizados en diversos centros de la Ciudad de México. *Gaceta Médica de México* [En línea] recuperado de https://www.anmm.org.mx/GMM/2017/n5/GMM_153_2017_5_581-589.pdf
- Castaño I, Cormack B, De Las Peñas A. (2006) Virulencia del hongo patógeno oportunista *Cándida glabrata*. *Rev Latinoam Microbiol*; 48 (2): 66-69 [En línea] recuperado de <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=11434>
- Chow BDW, Linden JR, Bliss JM (2012) *Cándida parapsilosis* and the neonate: epidemiology, virulence and host defense in a unique patient setting. *Expert Rev Anti Infect Ther* 10: 935–946 [En línea] recuperado de doi: 10.1586/eri.12.74.
- Clement KM, Tsui, Heide-Marie D, Vincent R, Meyer W. 2008 Re-examining the phylogeny of clinically relevant *Cándida* species and allied genera based on multigene analyses doi:10.1111/j.1567-1364.2007.00342.x

CRIPTOCOCOSIS

El género *Cryptococcus* está integrado por levaduras capsuladas, gemantes, generalmente no formadoras de pseudomicelio y sensibles a la cicloheximida. *Cryptococcus* tiene 39 especies fúngicas heterobasidiomicetas, de las cuales *C. neoformans* y *C. gattii* son consideradas como las patógenas para los mamíferos. En el laboratorio mediante pruebas bioquímicas sencillas, es fácil diferenciar entre esas dos especies.

TAXONOMÍA.

Reino: Fungi

Phylum: *Basidiomycota*

Orden: *Tremellales*

Familia: *Tremellaceae*

Género: *Cryptococcus*

Especies: *neoformans* var. *grubii*, *neoformans* var. *neoformans*, *gattii*, *albidus*, *laurentii* Y aproximadamente, otras 35 especies más que continuamente se están reclasificando. Se han registrado casos raros provocados por *Cryptococcus albidus*, *C. laurentii* y *C. uniguttulatus*; formalmente se reconoce a *C. neoformans* y *C. gattii*, como los agentes etiológicos de la criptococosis en mamíferos. Fuente: (T. Uribarren (2011); Micología Criptococosis; http://microypara.facmed.unam.mx/?page_id=818)

EPIDEMIOLOGIA DE LA CRIPTOCOCIS:

La criptococosis es adquirida fundamentalmente por la inhalación de las células de levadura desecadas de fuentes ambientales, particularmente en los suelos contaminados por guano de palomas. Debido a su contenido en nitrógeno, creatinina y una elevada concentración de sales, las levaduras pueden mantenerse viables en excrementos de paloma durante un período largo de tiempo, incluso años si están protegidas de los rayos del sol y en el caso de *C. gattii* en la madera y otras partes de diversas especies de árboles de Eucaliptus. Las aves particularmente las palomas se creen que pueden haber sido las responsables de la dispersión de *Cryptococcus spp* en todo el mundo ocasionando en el humano una infección pulmonar primaria que frecuentemente es asintomática y puede ser erradicada dentro de un granuloma. Sin embargo, dependiendo de los factores del huésped, el tamaño del inóculo y posiblemente la virulencia de la cepa, el microorganismo puede diseminarse de forma aguda o luego de un período de latencia a sitios extra pulmonares produciendo diferentes cuadros clínicos siendo el más grave el ataque al sistema nervioso central. Inicialmente se consideró que *C. gattii* presentaba una distribución geográfica muy restringida relacionada con zonas de ríos y bosques donde se encontraban especies de Eucalytus canalduensis pero a lo largo de los años se ha aislado de muestras ambientales de suelo y árboles a diferencia de *C. neoformans* que se ha aislado en todo el mundo.

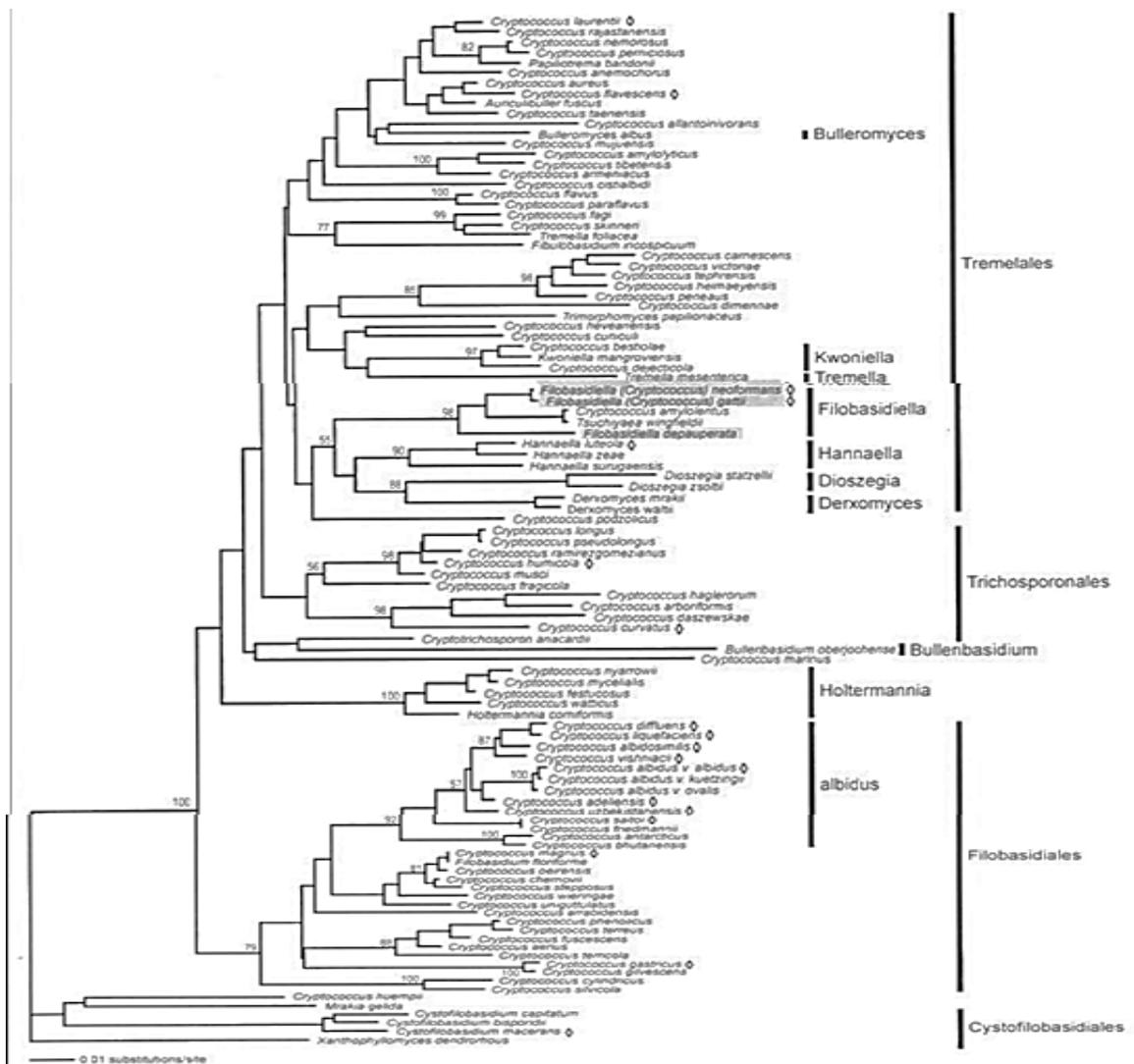


Imagen 7.1: Árbol filogenético de los miembros representativos de los Tremellomycetes para demostrar la diversidad del género *Cryptococcus*. Fuente: (Ngamskulrunroj, P., et al. (2009), Genetic diversity of the *Cryptococcus* species complex suggests that *Cryptococcus gattii* deserves to have varieties. PLoS One., 4(6): p. e5862 [En línea] recuperado de <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005862>)

La criptococosis por *C. gattii* se ha considerado una micosis de países tropicales debido que la mayoría de los casos se han registrados en países con clima tropical. Los casos clínicos descritos fuera de esas zonas se consideran casos excepcionales y siempre se trata de establecer relaciones entre el paciente o el ambiente que lo rodea con algún elemento importado, viaje o procedencia de un país tropical. La Criptococosis aumentó a principios de la década de 1980 por la aparición del virus de inmunodeficiencia humana. Hasta 1998, la criptococosis fue considerada la cuarta causa de muerte en pacientes con SIDA pero afortunadamente con el desarrollo y aplicación de las terapias inhibitoras de la proteasa y los tratamientos antirretrovirales de gran actividad (TARAA) se ha reducido significativamente en países desarrollados. Fuente: (Perfect, J.R., et al. (1998), *Cryptococcus neoformans*: virulence and host defences. Med Mycol., 36 Suppl 1: p. 79-86 [En línea] recuperado de PMID: 9988495)

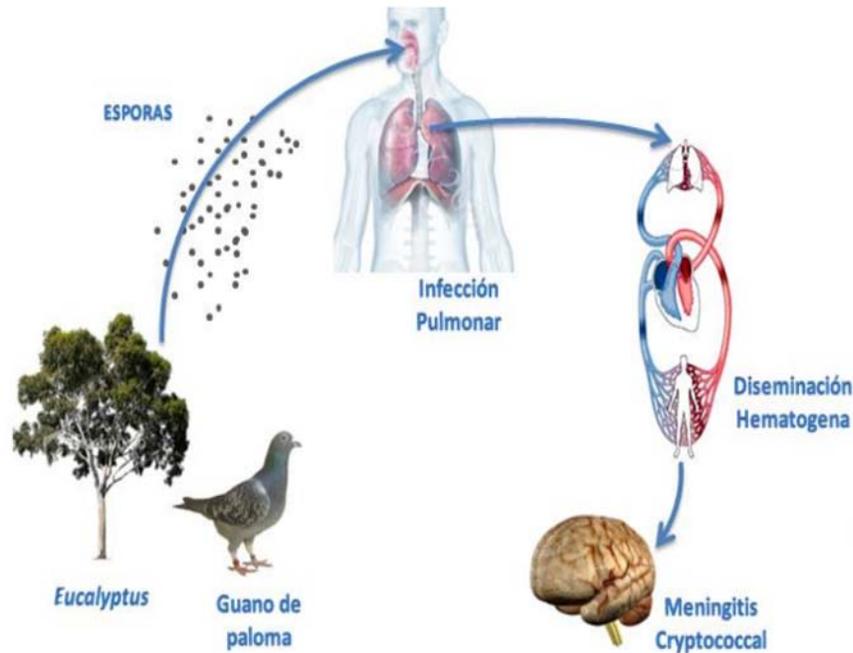


Imagen 7.2: Ciclo de vida del complejo *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii* Fuente: (Ellis, D, and Pfeiffer T,(1990) Ecology, life cycle, and infectious propagule of *Cryptococcus neoformans*.Lancet., 336(8720): p. 923-5 [En línea] recuperado de DOI:10.1016/0140-6736(90)92283-n)

Uno de los trabajos reportados sobre la genotipificación del complejo *C. neoformans* / *C. gattii* es el realizado por Meyer y una red de colaboración entre investigadores de varios países iberoamericanos a finales de 1990. La red fue creada para estudiar la epidemiología molecular de los agentes de la criptococosis en América Latina y España. Mediante las técnicas de PCR fingerprinting con el primer específico de la secuencia del microsatélite del fago 13 y el análisis de Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica (RFLP) del gen Orotininda Pirofosforilada URA5. En el estudio se agruparon las 340 cepas en ocho tipos moleculares, de los cuales la especie *C. neoformans* se aisló con una frecuencia del 80% y el 20% restante fue de *C. gattii*. El patrón VNI se presentó en gran proporción en Guatemala, Perú, Brasil y Argentina. VNII en Chile con 16% de frecuencia y Colombia con un 11%. España presentó un porcentaje elevado del patrón molecular VNIII, el cual representó un 42% de frecuencia. En cuanto a los genotipos correspondientes a *C. gattii*, el patrón molecular VGI solo se presentó en España, Venezuela y Perú con un 32%, 28% y 7% de frecuencia respectivamente. El genotipo VGII, se presentó en Brasil con 14%, Colombia con 13% y Argentina con una frecuencia baja de 2%; VGIII solo se presentó en Colombia en un 24% de frecuencia y en Argentina con un 2 %. En conclusión se confirmó que la mayoría de infecciones fueron causadas por el tipo molecular VNI que pertenece a *C. neoformans* var. *grubii* el cual representó un 68.2% de los aislamientos totales. Fuente: (Escandon, P., et al. (2006), Molecular epidemiology of clinical and environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex reveals a high genetic diversity and the presence of the molecular type VGII mating type a in Colombia.FEMS Yeast Res., 6(4): p. 625-35 [En línea] recuperado de DOI: 10.1111/j.1567-1364.2006.00055.x)

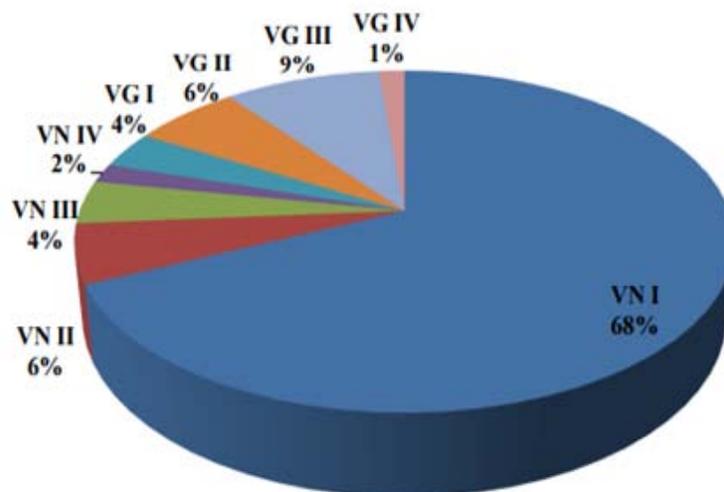


Imagen 7.3: Distribución de los ocho tipos moleculares en países Iberoamericanos. Fuente: (Meyer, W., et al (2003), Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg Infect Dis*, 9(2): p. 189-95 [En línea] recuperado de DOI: 10.3201/eid0902.020246)

En la imagen 7.4 se muestra la distribución de los 8 distintos tipos moleculares en las diferentes regiones del mundo. Se encontró que los tipos moleculares VNIII y VNIV no sólo se encuentran principalmente en Europa como se informó anteriormente, también están presentes en América del Norte. El genotipo VGI se encontró en mayor proporción en Oceanía en donde existen reportes de Criptococosis por *C. gattii* a diferencia del resto del mundo. En África existe mayor frecuencia de aislamientos correspondientes al genotipo VNI de *C. neoformans* debido a que la mayoría se ha aislado de pacientes con inmunosupresión. En los países de América se observó una relación homogénea en cuanto a los porcentajes de los diferentes patrones moleculares. En conclusión se analizaron un total 2755 aislamientos, entre los cuales 2046 eran clínicos, 68 veterinarios y 604 ambientales, con un 58% de los aislamientos fueron clasificados como *C. neoformans* var. *grubbi*. Fuente: (Meyer W, et al (1999)., Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA-a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. *Electrophoresis*,. 20(8): p. 1790-9

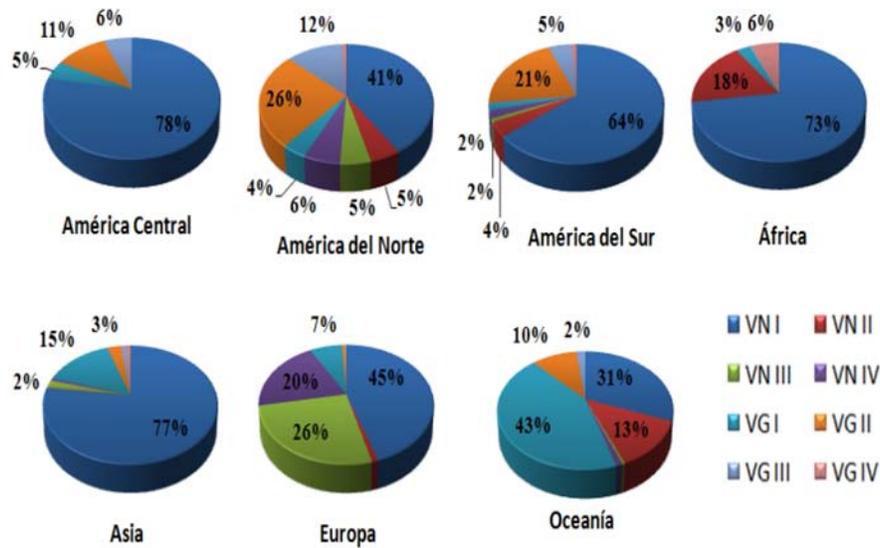


Imagen 7.4: Distribución de los ocho tipos moleculares identificados en América central, América del Norte, América del Sur, África, Asia, Europa y Oceanía. Fuente: (Chen, S., et al (2000) Epidemiology and host-and variety-dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. Australasian Cryptococcal Study Group. Clin Infect Dis., 31(2): p. 499-508 [En línea] recuperado de DOI: 10.1086/313992)

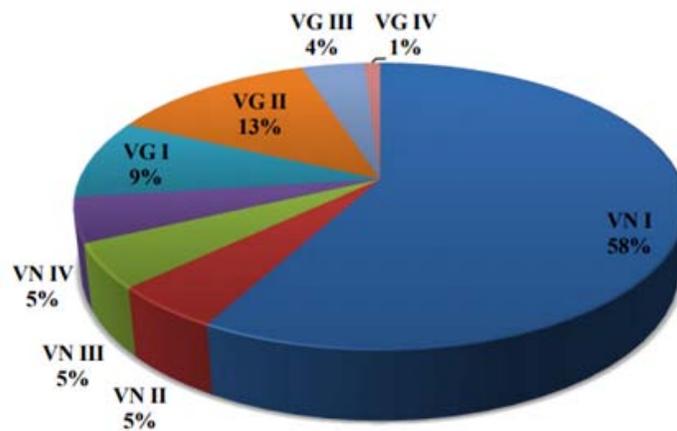


Imagen 7.5: Distribución de los ocho tipos moleculares a nivel mundial. Fuente: (Escandon, P., et al. (2006), Molecular epidemiology of clinical and environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex reveals a high genetic diversity and the presence of the molecular type VGII mating type a in Colombia. FEMS Yeast Res., 6(4): p. 625-35 [En línea] recuperado de DOI: 10.1111/j.1567-1364.2006.00055.x)

Uno de los últimos estudios realizados en América Latina, se llevó a cabo en México por Castañón Olivares y colaboradores, el cual incluyó 72 aislamientos de 72 pacientes ingresados desde 1994 a 2004 en tres hospitales de referencia en el Distrito Federal. Los aislamientos fueron identificados sobre la base del tamaño de la cápsula y la morfología colonial en agar SDA. Las pruebas de susceptibilidad in vitro revelaron que el 100% de los aislamientos fueron susceptibles a ketoconazol, fluconazol (FLC), itraconazol, anfotericina B (ANB) y los 72 aislamientos resistentes a caspofungina. La genotipificación se realizó mediante la técnica de PCR fingerprinting en base a los

criterios propuestos por Meyer y colaboradores; la frecuencia del genotipo se muestra en la imagen 7.6. Todos los genotipos VN fueron aisladas de pacientes con SIDA y todos los genotipos VG fueron aisladas de los pacientes que no padecían de SIDA. La identificación de *C. gattii* de climas medio seco y cálido en México confirma eficazmente, una vez más, que la distribución de *C. gattii* no se limita a las zonas tropicales y subtropicales como tradicionalmente se había considerado. Fuente: (Meyer, W., et al., Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA-a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. *Electrophoresis*, 1999. 20(8): p. 1790-9 [En línea] recuperado de DOI: 10.1111/j.1567-1364.2006.00055.x)

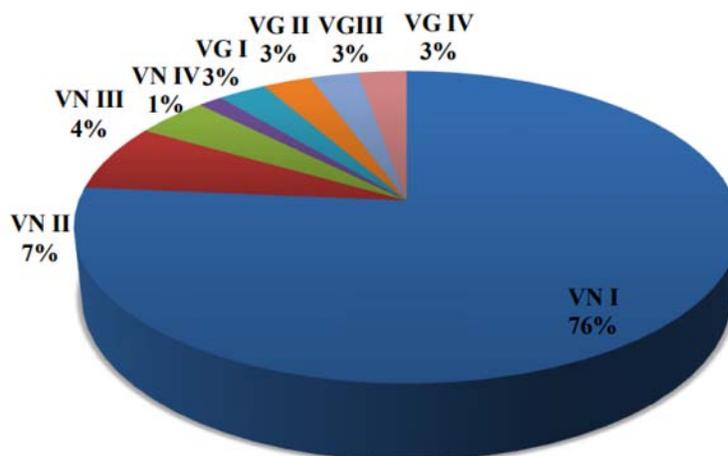


Imagen 7.6: Distribución de los ocho tipos moleculares identificados en México. Fuente: (Olivares, L.R, et al. (2009), Genotyping of Mexican *Cryptococcus neoformans* and *C.gattii* isolates by PCR-fingerprinting. *Med Mycol.* 47(7): p. 713-21 [En línea] recuperado de DOI: 10.3109/13693780802559031)

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DEL GÉNERO *Cryptococcus*.

Microscópicamente, la mayoría de los *Cryptococcus* aislados de especímenes clínicos aparecen como levaduras esféricas encapsuladas en tejidos y cultivo de los mismos. El tamaño de la cápsula varía de acuerdo con la cepa y las condiciones de cultivo, estimando que en la mayoría de los aislamientos tiene un tamaño promedio de 20 μm . Independientemente del tamaño, la cápsula está formada principalmente por glucoronoxylomana, que basándose en su estructura espacial y la proporción de sus componentes, la nomenclatura convencional clasificó a *C. neoformans* en cinco serotipos (A, B, C, D y el híbrido intra-variedad AD) y en tres variedades: *C. neoformans* var. *grubii* (serotipo A), *C. neoformans* var. *neoformans* (serotipo D) y *C. neoformans* var. *gattii* (serotipos B y C). En la última década, un número de técnicas de biotipificación han sido usadas para conocer el genotipo de las levaduras y colaborar en el estudio de la epidemiología de la enfermedad que producen. Un resultado de esos estudios fue la elevación a nivel de especie de *C. neoformans* var. *gattii*, basada en la variabilidad genómica, la falta de evidencia para la recombinación genética entre *C. neoformans* y *C. gattii*, además de las diferencias ya conocidas en

caracteres fenotípicos, hábitat natural, epidemiología, manifestaciones clínicas de la enfermedad y respuesta al tratamiento antifúngico.

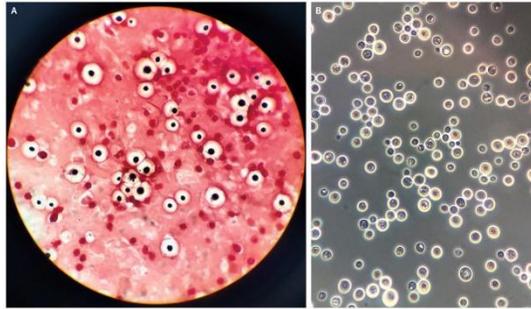


Imagen 7.7: *Cryptococcus neoformans* Fuente: (Bonifaz 1991)

Principalmente a través de los patrones obtenidos con la PCR-“huella digital” (fingerprinting), generados con el iniciador “core” M13 y la amplificación de fragmentos del gene URA5 (generados por la doble digestión del gene con Sau961 y HhaI), se considera que las especies *C. neoformans*-*C. gattii* forman un complejo integrado en ocho tipos moleculares o genotipos principales:

C. neoformans var. *grubii* corresponde a los tipos moleculares VNI y VNII; *C. neoformans* var. *neoformans* corresponde al VNIV y el serotipo AD corresponde al genotipo VNIII. *C. gattii* está integrado por cuatro tipos moleculares: VGI, VGII, VGIII y VGIV, los cuales ha sido propuesto tratarlos como taxones diferentes (variedades).

Aún falta por acordar si el recientemente descrito genotipo VNB, asociado a aislados clínico y ambiental de Botswana, es realmente un genotipo independiente o debe ser considerado como un subtipo del ya bien caracterizado genotipo VNII (Cuadro 7.3), asimismo, la situación de identidad genotípica es incierta para aquellos aislados híbridos intraespecíficos correspondientes a los serotipos BD y AB.

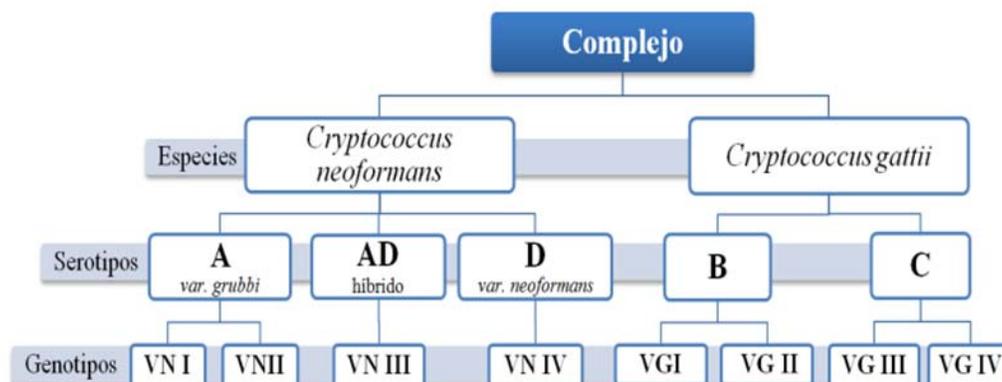


Imagen 7.8: Representación esquemática de la relación y nomenclatura del complejo *C. neoformans*/*C. gattii* Fuente: (Ngamskulrungrroj, P., et al., Genetic diversity of the *Cryptococcus* species complex suggests that *Cryptococcus gattii* deserves to have varieties. PLoS One, 2009. 4(6): p. e5862 [En línea] recuperado de <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005862>)

Cryptococcus neoformans.

Con algunas excepciones, *C. neoformans* normalmente infecta pacientes inmunocomprometidos. Puede ser aislado del ambiente de cualquier lugar del mundo, es un patógeno ubicuo y está frecuentemente asociado con materias fecales aviares, madera en putrefacción o suelo. La mayoría de los aislamientos de *C. neoformans* son var. *grubii* (serotipo A) y en menor frecuencia var. *neoformans* (serotipo D). Una propuesta reciente es que esas variedades deberían ser tratadas como especies diferentes debido a que han divergido lo suficiente (desde hace 18 millones de años) por lo que un apareamiento normal no puede ser posible, además de que la comparación de sus genomas muestra que, entre estas dos variedades, no existen recientemente intercambios de ADN importantes. El serotipo A es responsable del 95% de todas las infecciones causadas por *C. neoformans* en pacientes. Ha sido subdividido en tres tipos moleculares: VNI (AFLP1), VNII (AFLP1B) y VNB (AFLP1A). VNI es el tipo molecular más común, integrando el 78% de los aislados de *C. neoformans*. El grupo VNB, inicialmente restringido a Botswana, recientemente ha sido recuperado de excrementos de palomas en Brasil y de pacientes de Ruanda, Portugal y Brasil, lo que ha dividido al genotipo en tres subgrupos: VNB-A, VNBB y VNB-C. Las cepas serotipo A MAT α (A α) han mostrado ser más patógenas que las cepas Aa. Es interesante que el grupo VNB incluye una gran proporción de aislados fértiles de MATa.

Las cepas serotipo D se encuentran en todo el mundo pero son prevalentes en áreas con climas templados, como las de los países europeos, donde el 30% de los aislados pertenecen a este serotipo. Esta distribución restringida puede ser debida al hecho de que las cepas del serotipo D son más sensibles a altas temperaturas. Se ha reportado que el serotipo D es menos virulento y más sensible al fluconazol que las células serotipo A. Las manifestaciones clínicas de las infecciones humanas causadas por los serotipos A y D son similares. En modelos muridos, cepas D α son más virulentas que sus congénitas Da. El serotipo AD es el resultado de la fusión eventual entre cepas serotipo A y serotipo D. Las cepas serotipo AD son relativamente comunes, un análisis de poblaciones ambientales y clínicas de *C. neoformans* en América del norte reveló que, aproximadamente, el 75% de las cepas aisladas del ambiente son híbridos AD. Cepas A α Da han sido reportadas como más virulentas que las cepas AaD α y el genotipo híbrido A α D α ha sido recientemente recuperado de EUA e Italia, confirmando el apareamiento entre sexos iguales α/α dentro de la misma especie. Se postula que las cepas serotipo AD aisladas en el mundo tienen su origen en África.

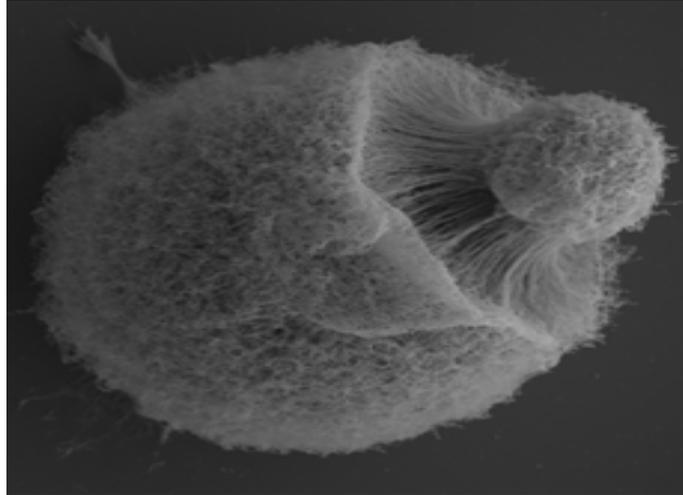


Imagen: 7.9 Microscopía de barrido electrónico de la imagen de un *Cryptococcus neoformans* aisladas de células gigantes de los pulmones de ratones infectados en un estudio. La imagen representa una de las características fenotípicas más características de las células gigantes, que es la alta densidad de fibras de polisacáridos presentes en la cápsula. Esta estructura presenta una red altamente reticulada, que se acumula en una capa muy compacta en todo el cuerpo de la célula. Fuente: (Zaragoza et al.(2010) Fungal Cell Gigantism during Mammalian Infection. PLoS Pathogens, published: -6-17, Doi: 10.1371/journal.ppat.1000945.)

Cryptococcus gattii.

Principalmente infecta a individuos sin defectos inmunológicos, aunque se han reportado infecciones por *C. gattii* asociadas a pacientes con VIH-SIDA. Se considera que *C. gattii* es la causa de criptococomas y tiene una menor sensibilidad a varios agentes antifúngicos, por lo que es necesaria una terapia prolongada en el paciente y es causa de una tasa de mortalidad alta. Ha sido consistentemente aislado de madera en descomposición de varias especies de árboles, especialmente de aquellas pertenecientes al grupo *Eucalyptus spp.*

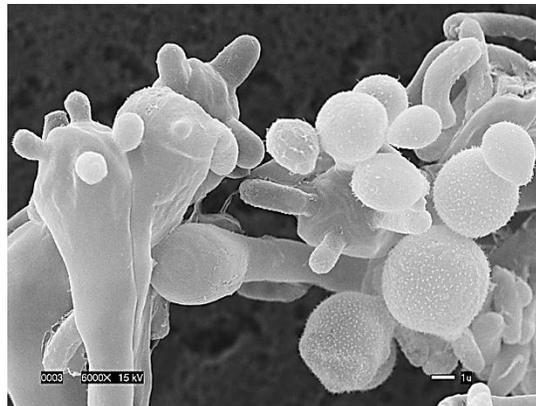


Imagen 7.10: Microscopía electrónica de barrido de *Cryptococcus gattii* Fuente: (EDMOND BYRNES AND JOSEPH HEITMAN, DUKE DEPT. OF MOLECULAR GENETICS AND MICROBIOLOGY)

Se pensó inicialmente que la distribución geográfica de *C. gattii* estaba limitada a regiones tropicales o sub-tropicales del mundo; sin embargo, estudios recientes y el reporte del brote en la Isla Vancouver han revelado una distribución mucho más amplia de esta especie. Se considera que

las cepas VGI (AFLP4) son las de mayor frecuencia mundial. Las cepas VGII (AFLP6) predominan en regiones de Australia y EUA, el genotipo VGIII (AFLP5) en países ibero-americanos y en la India, mientras que el tipo VGIV ha sido asociado con infecciones en pacientes VIH positivos encontrados en Sudáfrica y en América Central. Hasta hace poco, *C. gattii* había sido poco estudiado debido a que sólo representaba al 1% de las infecciones en los casos mundiales de Criptococosis; sin embargo, el brote epidémico de criptococosis causado por *C. gattii* registrado en 1999 en la Isla Vancouver (Columbia Británica, Canadá) ha estimulado la investigación a detalle de este organismo. En esta isla poco más del 97% de los aislamientos criptococales se han identificado como del tipo molecular VGII y el resto, VGI. En Columbia Británica, entre los años 2002 y 2006, el promedio anual de la incidencia de criptococosis fue de 6.5 casos/millón y 27.9 casos/millón en Isla Vancouver. Además de las infecciones humanas, la micosis ha sido diagnosticada en animales como perros, gatos, caballos y marsopas; de hecho, los casos veterinarios han sido reportados de dos a tres veces más frecuentemente que los casos humanos. Esto significa que el hongo ha infectado a más de 176 individuos y se ha diseminado de Isla Vancouver a otras regiones del noroeste del Pacífico de EUA y Canadá. Dentro de los aislados VGII se han identificado dos subtipos: una forma común principal en aislados clínicos y ambientales (VGIIa/AFLP6a, hipervirulento) 87% de los casos humanos y el 78% de los veterinarios, y un tipo raro presentado en un aislado clínico y varias muestras ambientales (VGIIb/AFLP6b, virulento atenuado). El análisis de genealogía por MLST (Multi Locus Sequence Typing) reveló que las cepas VGIIa y VGIIb encontradas en Isla Vancouver presentan genotipos similares o idénticos con otros aislados de otras partes del mundo, lo que hace difícil asegurar y determinar un origen específico. Las hipótesis actuales son: 1) Las especies han sido residentes en Columbia Británica desde hace mucho tiempo (población ancestral) ó 2) Las especies representan un genotipo particularmente virulento que pudo estar bien adaptado a condiciones locales y ha sido introducido recientemente a Columbia Británica.

Después de examinar 30 alelos de cepas VGIIa y VGIIb de la Isla Vancouver, se observó que muestran 14 loci idénticos y se hipotetiza que los aislamientos VGIIa podrían ser el resultado de un apareamiento del mismo sexo (α/α), entre un aislamiento VGIIb y un segundo aislamiento VGII desconocido, en tránsito en Australia o en el Pacífico noroeste; sin embargo, se ha revelado que desde 1986 han sido recuperados aislamientos VGIIa y VGIIb en América del Sur, sugiriendo que estos genotipos han estado presentes desde hace mucho tiempo en América, más que haber sido el resultado de una recombinación reciente.

En cuanto a las técnicas micológicas, es necesario iniciar con una observación en fresco de la muestra con tinción de Gram, otra preparación con tinta china para poner en evidencia la cápsula del hongo y una más si es posible con tinción de Kinyoun.

El siguiente paso en la identificación es la inoculación de la muestra en medios de cultivo, para ello se emplea Agar Dextrosa Sabouraud (SDA), Agar Semilla de girasol, Agar Níger y Agar L-Canavanina-Glicina-Azul de Bromotimol (CGB) y Urea de Christensen.

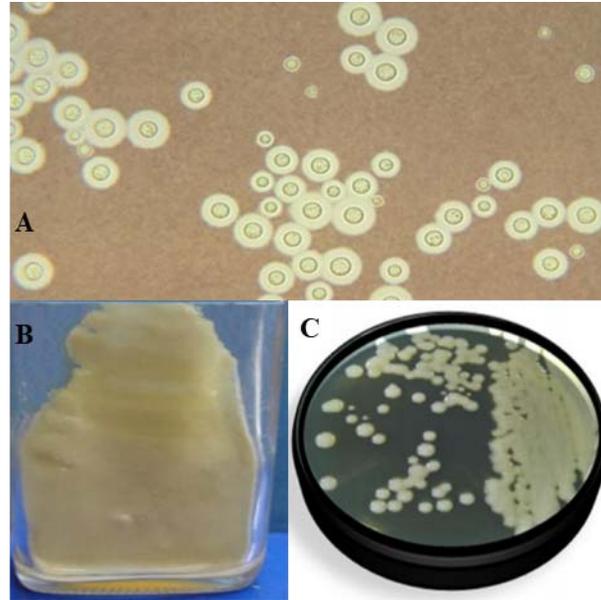


Imagen 7.11: A) Micrografía de *C. neoformans*; B) Crecimiento de *C. neoformans* en Agar SDA en botella; C) Crecimiento de *C. neoformans* en placa de Agar SDA. Fuente: (Castilla vega N (2010), “FENOTIPIFICACIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DEL COMPLEJO *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* EN AISLAMIENTOS CLÍNICOS DEL NORESTE DE MÉXICO”, [En línea] recuperado de <https://docplayer.es/62422752-Universidad-autonoma-de-nuevo-leon-facultad-de-medicina.html>)

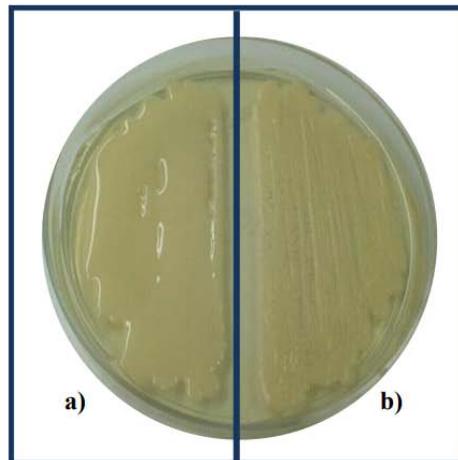


Imagen 7.12: a) Cultivo de *C. Gatti*; b) Cultivo de *C. neoformans*. *C. neoformans* y *C. gatti* producen una cápsula mucopolisacárida que les confiere el aspecto macroscópico mucoso cremoso. La cápsula en el huésped infectado puede llegar a ser muy voluminosa con un diámetro mayor que el de la propia levadura. En cambio en cultivo y luego de realizar varias resiembras de la misma cepa en medio SDA, la cápsula disminuye su tamaño y puede llegar a perderse. Fuente: (Castilla vega N (2010), “FENOTIPIFICACIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DEL COMPLEJO *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* EN AISLAMIENTOS CLÍNICOS DEL NORESTE DE MÉXICO”, [En línea] recuperado de <https://docplayer.es/62422752-Universidad-autonoma-de-nuevo-leon-facultad-de-medicina.html>)

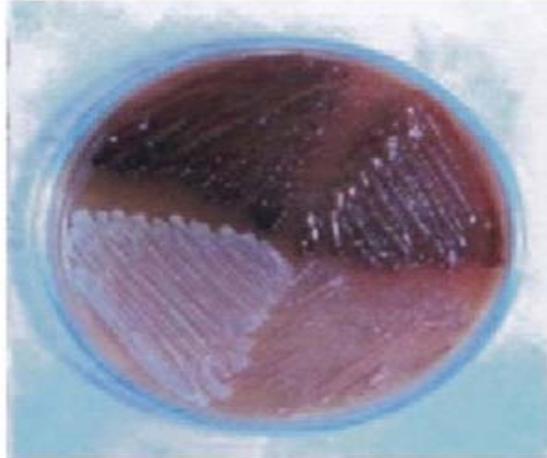


Imagen 7.13: *C. neoformans* produce un pigmento marron en el Agar Semilla de girasol a temperatura ambiente debido a la actividad Fenol Oxidasa localizada en la pared celular de este hongo. Ninguna otra especie de este Género ni otras levaduras, poseen esta propiedad

Fuente: (Arenas 2014)

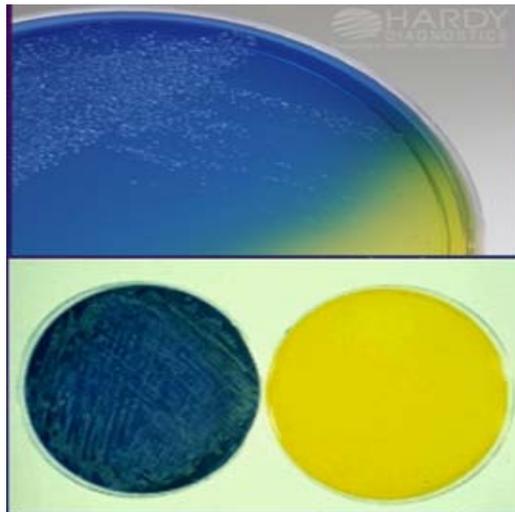


Imagen 7.14: Este medio se caracteriza porque su única fuente de carbono y nitrógeno son la glicina y L-canavanina, un aminoácido no proteico. Este medio permite discriminar entre las especies *C. gatti* y *C. neoformans*. La primera es capaz de crecer utilizando la glicina como fuente de carbono y no es sensible a la L-canavanina. Al producir amoniaco como residuo de la asimilación de la glicina se produce un cambio de pH en el medio y el azul de bromotimol vira de amarillo a azul. En cambio *C. neoformans* es sensible al L-canavanina, excepto el serotipo A que es capaz de asimilar la glicina aproximadamente un 20% [28], pero el crecimiento es mínimo y no es suficiente para que se produzca un cambio de pH. Se realiza la siembra en el medio y se incuba a 30 °C durante 24-48 horas Fuente: (Arenas 2014)

PRODUCCIÓN DE UREASA

Se basa en la capacidad de producir la enzima ureasa, la cual desdobla la urea en dióxido de carbono y amonio, incrementando el pH del medio y produciendo un cambio de color rojo – púrpura en el indicador rojo de fenol.

Procedimiento

Se utiliza el medio de Christensen, en el cual se inocula una asada de la levadura en estudio. Los medios se incuban a 37 °C durante 6 h o a temperatura ambiente durante tres días.

INTERPRETACIÓN:

La prueba se considera positiva cuando se alcaliniza el medio lo que produce un cambio de color original (amarillo) a rosa o rojo.

Una reacción positiva a la prueba ureasa es sugestiva de pertenecer al género *Cryptococcus*, la cepa de *C. neoformans* son productoras de ureasa.



Imagen 7.15: *C. neoformans* y otros *Cryptococcus spp* e incluso otras levaduras produce ureasa y otras especies del genero *Candida* no la producen. El medio Urea contiene Rojo de Fenol, que vira a color Rojo cuando de Hidroliza la Urea y libera amonio alcalinizando el medio de cultivo Fuente: (Arenas 2014)

HISTOPATOLOGÍA

Criptococosis: Es una micosis oportunista causada por una levadura encapsulada: *Cryptococcus neoformans*, se adquiere por vía inhalatoria, iniciando la infección pulmonar en 90% de los casos, pero tiene afinidad particular por el sistema nervioso central. Es una infección oportunista, de evolución subaguda, crónica o rara vez aguda, La fuente natural mas importante de *C.neoformans* son las excretas desecadas de aves como palomas, en las heces desecadas permanece viable por un periodo de hasta dos años, aislándose en las mismas y desechos acumulados, en los nidos de palomos como asi como aticos, cupulas, cornisas, y aleros.

La lesión pulmonar es inespecifica y muchas veces pasa inadvertida. A partir del foco pulmonar puede haber diseminacion linfohematogena. Por razones aun desconocidas *C. neoformans* es extremadamente neurotropico, por lo que la forma clínica mas común de criptococosis es la cerebromeningea.

Menos frecuentemente puede presentarse en otros órganos como parte de la diseminación tales como en piel, hueso, riñón.

En individuos inmunodeficientes casi no hay reacción tisular y los órganos afectados, principalmente el cerebro, muestran cavidades llenas de hongos con aspecto mucoso.

individuos inmunocompetentes *C.neformans* provoca una inflamación mixta supurativa y granulomatosa con grados variables de necrosis.

Las lesiones pulmonares residuales inactivas de criptococosis están constituidas por tejido fibroso denso con muy escasos parásitos difícilmente reconocibles.

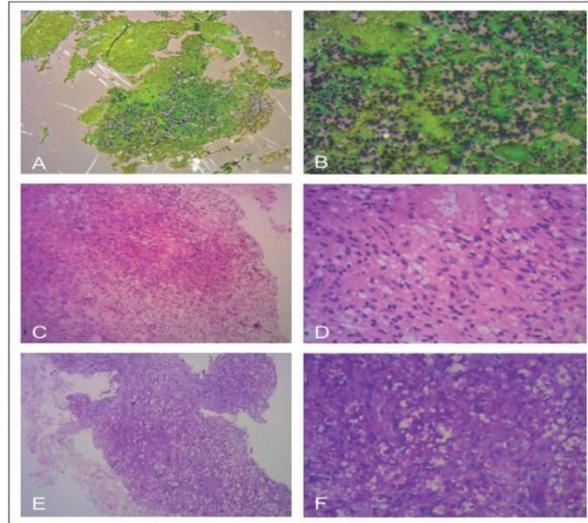


Imagen 7.16: Cortes histológicos de la muestra tomada del paciente por punción biopsia guiada por tomografía computada. Las imágenes

A, C y E son con un aumento de 40x y las imágenes B, D y F con 400x. En la muestra de tinción de hematoxilina y eosina (A y B) se evidencian numerosas levaduras redondeadas, cápsuladas e intracelulares. Las mismas resultan negativas en hematoxilina y eosina (A y B), e intensamente positivas para PAS (Periodic Acid-Schiff) (C y D) y Grocott (E y F). Fuente: (Pereira-Duarte I M, Camino G, Estefan M (2019) Criptococosis vertebral. Comunicación de un caso y revisión bibliográfica Rev. chil. infectol. vol.36 no.5 [En línea] recuperado de <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182019000500656>)

Auxonograma y zimograma: Ver anexo 6

PRODUCCIÓN DE MELANINA:

Se realiza la siembra en medio Staib o L-Dopa. La gran mayoría de las cepas del género *Cryptococcus* son capaces de producir melanina y forman colonias de color marrón al crecer en este medio. Este parámetro se tiene en cuenta pero no es decisivo para la identificación de la especie. Se incuba a 30 °C durante 24 horas hasta una semana, dependiendo de la cepa.



Imagen 7.17: Siembra en medio Staib de *C. gattii* CCA232. Colinas marrones, indican cepas productoras de melanina. Fuente: (Arenas 2014)

Material

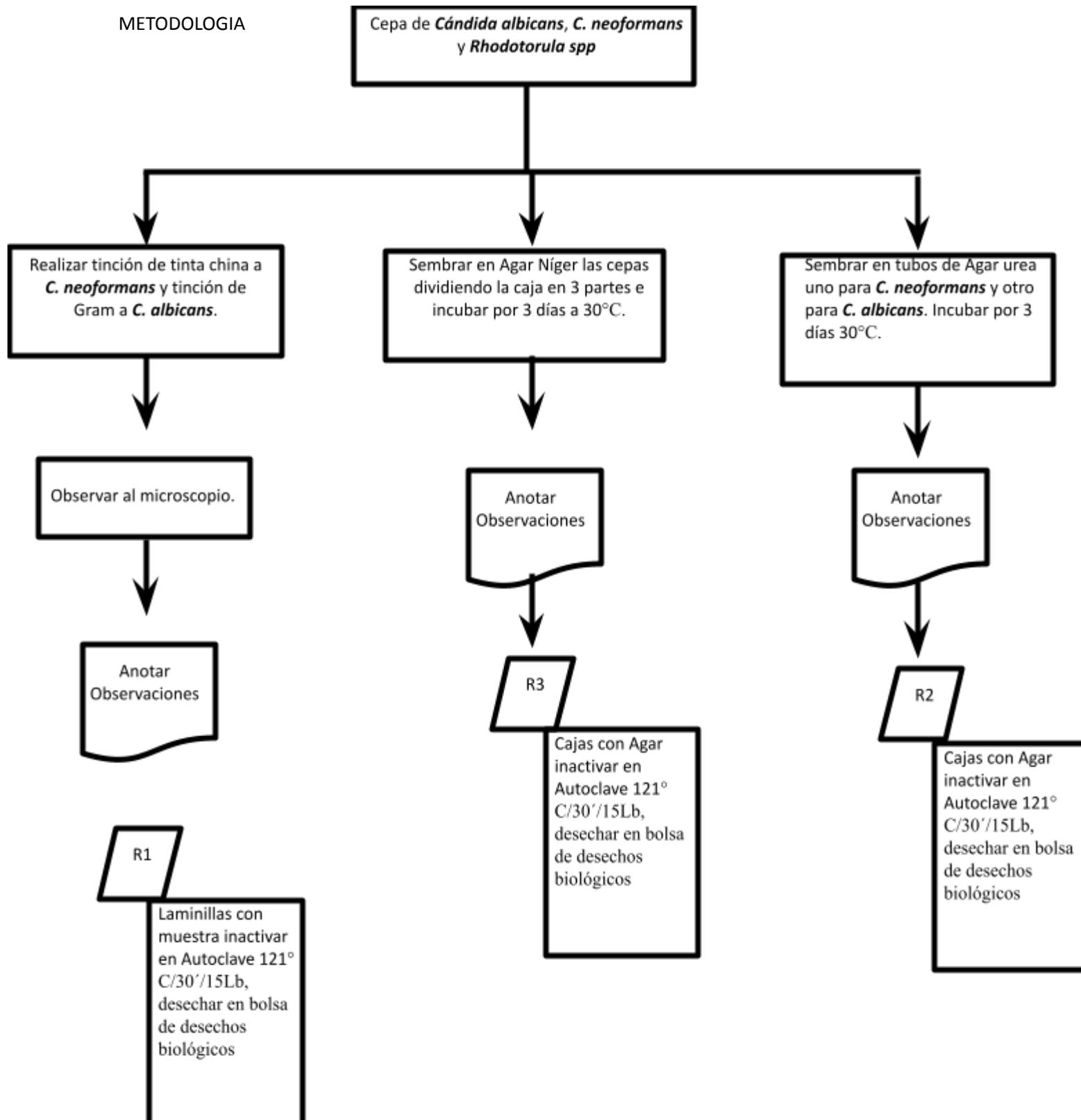
Por persona:

- 1.- Bata blanca
- 2.- Plimón indeleble
- 3.- Guantes de Latex
- 4.- Lentes de seguridad

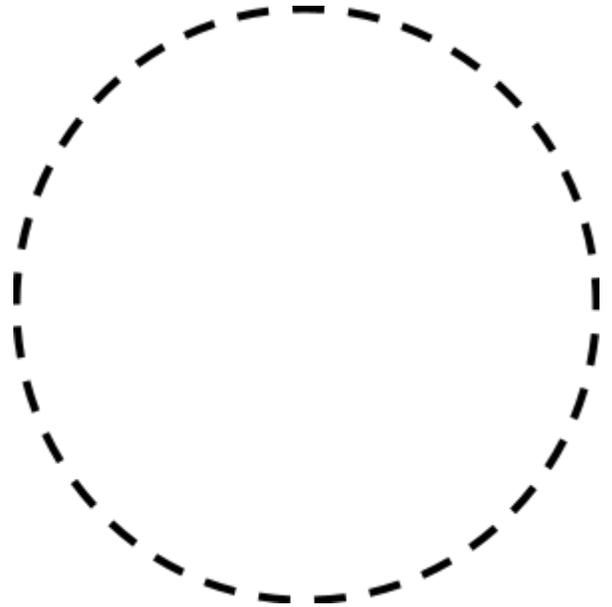
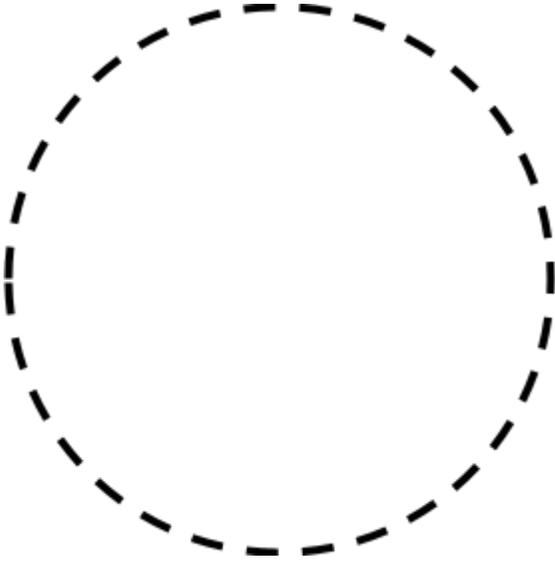
Por Equipo:

- 1.- Caja de Agar Níger
- 2.- 2 Tubos con Urea de Christensen
- 3.- Cultivos en tubo SDA de especies casuales de esta enfermedad (seleccionadas por el asesor)
- 4.- Reactivos para Tinción de Gram
- 5.- Tinta china color Azul o Negra
- 6.- Laminillas fijas en cerebro de ratón teñidas con PAS
- 7.- 1 Tubo de 10 mL de Agua destilada
- 8.- Cepa de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* y *Rhodotorula spp*

METODOLOGIA



Resultados:



Conclusiones:

BIBLIOGRAFÍA

- Bovers M, Hagen F, Boekhout T (2008) Diversity of the *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* species complex. *Rev Iberoam Micol*;25:S4-S12 [En línea] recuperado de <http://www.reviberoammicol.com/2008-25/S04S12.pdf?q=gattii>
- Casadevall A, Perfect J (1998) *Cryptococcus neoformans*. Washington D.C., U.S.A Edit. American Society Microbiology
- Castañón Olivares L, Martínez K, Bermúdez R et al (2009) Genotyping of Mexican *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* isolates by PCR-fingerprinting. *Med Mycol*;47:713-721 [En línea] recuperado de <https://doi.org/10.3109/13693780802559031>
- Castañón-Olivares L, Sánchez Paredes E, Arreguín-Espinosa R et al (2007) Aislamiento de *Cryptococcus albidus* en árboles de eucalipto. *Rev Mex Mic*;25:21-25 [En línea] recuperado de DOI: <https://doi.org/10.33885/sf.2007.3.998>

- Chayakulkeeree M, Perfect JR (2006) Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am*;20:507- 544 [En línea] recuperado de DOI: 10.1016/j.idc.2006.07.001
- Do E, Hu G, Caza M et al (2016) The ZIP family zinc transporters support the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Med Myco* 1;54(6):605-15 [En línea] recuperado de doi: 10.1093/mmy/myw013
- Doering L (2009) How Sweet it is! Cell wall biogenesis and polysaccharide capsule formation in *Cryptococcus neoformans*. *Annual Review of Microbiology*;63:223- 247 [En línea] recuperado de DOI: 10.1146/annurev.micro.62.081307.162753
- Ellis D, Pfeiffer T (1992). The ecology of *Cryptococcus neoformans*. *Eur J Epidemiol*;8:321-325 [En línea] recuperado de DOI:<https://doi.org/10.1007/BF00158562>
- Hagen F, Illnait-Zaragozi M, Meis J et al (2012) Extensive genetic diversity within the Dutch clinical *Cryptococcus neoformans* population. *J Clin Microbiol* 50 (6) 1918-1926 [En línea] recuperado de DOI: 10.1128/JCM.06750-11
- Kozubowski L, Chan Lee S, Heitman J (2009) Signalling pathways in the pathogenesis of *Cryptococcus* Cellular Microbiology;11:370-380 [En línea] recuperado de <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01273.x>

ASPERGILOSIS

Las especies del género *Aspergillus* se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza pudiéndose aislar de una gran variedad de substratos. Gracias a la facilidad de dispersión de sus conidios y a su pequeño tamaño, éstos pueden permanecer en suspensión en el ambiente durante un largo periodo de tiempo, por lo que el hombre se encuentra expuesto constantemente a su inhalación. En los últimos años se ha producido un notable incremento en las infecciones fúngicas nosocomiales. Diferentes especies del género *Aspergillus* son una causa frecuente de micosis invasivas, normalmente fatales, en pacientes inmunocomprometidos en los países desarrollados. Aunque *Aspergillus fumigatus* es el agente etiológico más común, otras especies del género como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus nidulans* (*Emericella nidulans*) se consideran también responsables de infecciones invasivas. De forma mucho más esporádica, se han citado también otras especies como *Aspergillus candidus*, *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus restrictus*, *Aspergillus sydowii* y *Aspergillus ustus* entre otras.

La identificación hasta nivel de especie de estos hongos es cada vez más importante, ya que algunas especies de *Aspergillus* pueden presentar una mayor virulencia y una respuesta distinta a la terapia antifúngica. A continuación se revisa de forma resumida la taxonomía del género *Aspergillus* y las características de las especies implicadas con mayor frecuencia en la aspergilosis nosocomial.

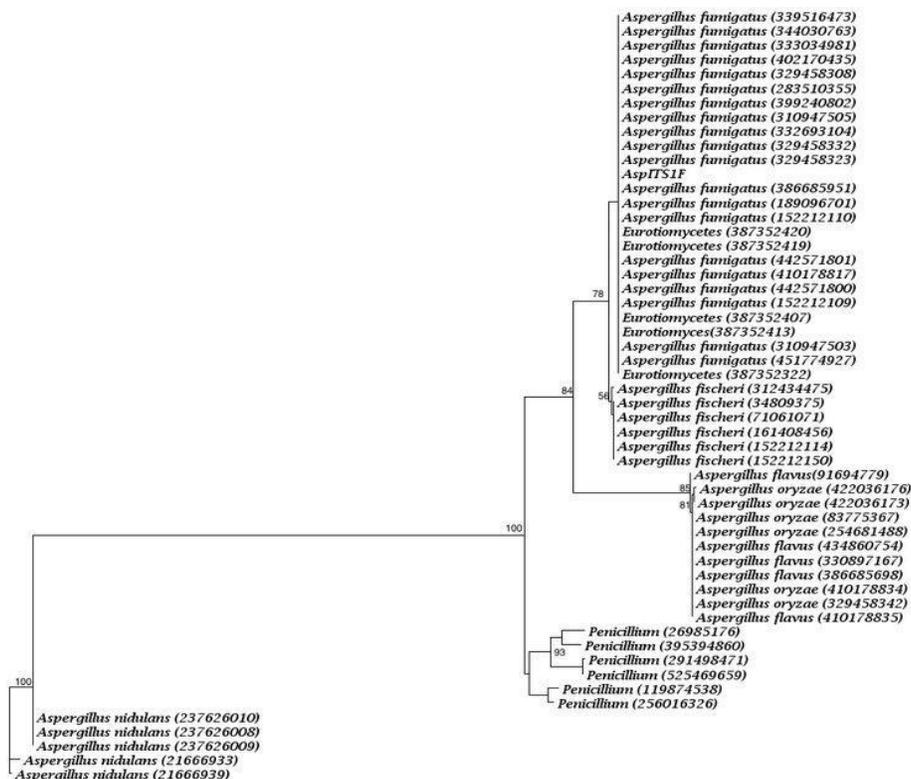


Imagen 8.1: Arbol filogenético obtenido del análisis de la secuencia Internal Transcribed Spacer (ITS) de *Aspergillus* sp. Fuente: (Tellez, A., Ernesto A, Favela-Torres & Anducho-Reyes et al. (2018). Revista Mexicana de Ingeniería Química. Revista Mexicana de Ingeniería Biomedica. 17.)

TAXONOMÍA DEL GÉNERO *Aspergillus*:

La taxonomía es una disciplina dinámica y esto conlleva la realización de cambios en la nomenclatura que no siempre son de fácil comprensión. Recientemente, se han producido importantes cambios en la taxonomía de *Aspergillus* spp y sus teleomorfos. Desde 1965, el texto por excelencia sobre el género ha sido "*The genus Aspergillus*" de Raper y Fennell. En esta monografía se aceptaban 132 especies subdivididas en 18 grupos. Samson realizó una recopilación de las especies y variedades descritas posteriormente, con una revisión crítica sobre la validez de los taxones publicados. La sistemática actual de *Aspergillus* se ha visto enormemente influida por los trabajos presentados en dos reuniones científicas dedicadas exclusivamente a los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*. En ellas se realizaron importantes contribuciones multidisciplinares a la taxonomía del género, y en especial se revisó su nomenclatura siguiendo las normas del código internacional de nomenclatura botánica (ICBN). La monografía de Raper y Fennell presentaba serios problemas de adecuación a dicha normativa, ya que no se había tenido en cuenta la prioridad de los nombres más antiguos y las especies nuevas descritas no estaban tipificadas. Los nombres utilizados fueron tipificados por Samson y Gams y Kozakiewicz. Además, la clasificación infragenérica en grupos no es aceptada por el ICBN, por lo que Gams et al. reclasificaron el género y lo dividieron en 6 subgéneros, cada uno de los cuales dividido a su vez en una o más secciones que se corresponden con los grupos descritos por Raper y Fennell. Por último, muchas especies del

género *Aspergillus* presentan un teleomorfo dentro de los ascomicetos, pero Raper y Fennell retuvieron el nombre *Aspergillus* tanto para el teleomorfo como para el anamorfo, en contraposición con el artículo 59 del ICBN. Gams y Samson y Kozakiewicz se encargaron de realizar los cambios necesarios para su adecuación. Aunque una de las normas de nomenclatura es que tengan prioridad los nombres de los sinónimos más antiguos, su estricta aplicación en el género *Aspergillus* implicaría sustituir algunos nombres que son ampliamente utilizados. Con el fin de proteger los nombres en uso, la Comisión Internacional de Penicillium y *Aspergillus*, que depende de la División de Micología de la "International Union of Microbiological Societies" (IUMS), elaboró una lista de 186 especies de *Aspergillus* y 72 teleomorfos con el anamorfo *Aspergillus*, que fue presentada en el "XV International Botanical Congress" celebrado en Tokio en 1993. Aunque formalmente no pudo ser aprobada, se recomienda encarecidamente a los taxónomos no adoptar nombres distintos a los de la lista. Características morfológicas del género *Aspergillus*, *Aspergillus* es un género mitospórico que se caracteriza por la producción de hifas especializadas, denominadas conidióforos, sobre los que se encuentran las células conidiógenas que originarán las esporas asexuales o conidios. El conidióforo característico de *Aspergillus*, aunque es una estructura unicelular posee tres partes bien diferenciadas: vesícula (extremo apical hinchado), estipe (sección cilíndrica situada debajo de la vesícula) y célula pie (sección final, a veces separada por un septo, que une el conidióforo con el micelio). Sobre la vesícula se disponen las células conidiógenas, denominadas habitualmente fiálides. En muchas especies, entre la vesícula y las fiálides se encuentran otras células denominadas métulas. Las cabezas conidiales que sólo presentan fiálides se denominan uniseriadas, y las que presentan fiálides y métulas, biseriadas. Algunos autores propusieron un cambio en la nomenclatura de las estructuras morfológicas de *Aspergillus*. Así, se recomienda sustituir los términos "vesícula", "estipe" y célula pie" por "ápice hinchado", "parte media" y "parte basal" del conidióforo respectivamente, ya que se trata de tres partes de una misma estructura. Los términos "fiálide" y métula" se recomienda que sean sustituidos por "célula conidiógena" y "célula que soporta la célula conidiógena" o simplemente "célula soporte", respectivamente. Aunque dichas propuestas se recogen en la última edición del Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi, no parecen haber tenido mucha aceptación, ya que la mayoría de investigadores continúan utilizando la terminología tradicional Fuente: Sampson (1996)

Además de la importancia que tienen en la naturaleza como recicladores de material orgánico, los hongos del género *Aspergillus* tienen capacidad de causar enfermedad por diferentes mecanismos y dentro de un mismo órgano, ocasionar diferentes variedades clínicas de lesión (polimorfismo lesional), a continuación, se describan los mecanismos de daño más importantes y los cuadros clínicos más frecuentes.

MECANISMOS DE DAÑO DE *Aspergillus*:

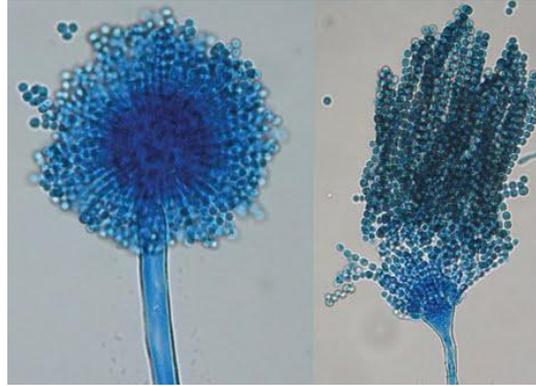


Imagen 8.2: *Aspergillus* Fuente: (de Hoog et al. (2000, 2015))

1. Hipersensibilidad. Esta puede ser congénita y en estos casos *Aspergillus* sólo actúa como lo harían otros antígenos ambientales, por ejemplo, polvo o pólenes ocasionando desde una rinitis alérgica, hasta un asma crónico severo, los pacientes tienen concentración elevada de IgE. En otros casos, las personas pueden hacerse hipersensibles a los hongos de este género, si trabajan en sitios con altos niveles de contaminación por el agente, como puede ocurrir en los silos donde se almacenan granos en malas condiciones de humedad y temperatura, en estos casos se incrementa la concentración de IgG.

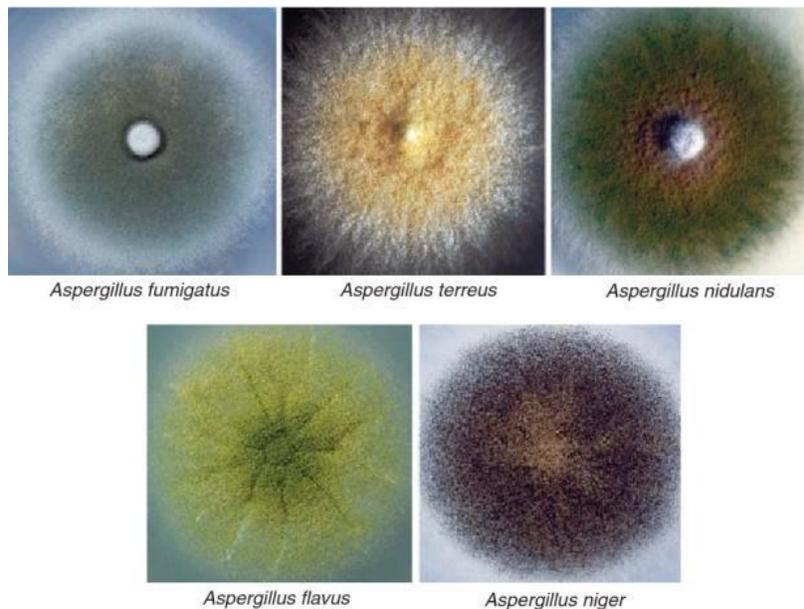


Imagen 8.3: Morfología colonial en medios de las diferentes especies de *Aspergillus*. Fuente: (Arenas 2014)

2. Intoxicación (micotoxicosis). En estos casos, sustancias como las aflatoxinas producidas durante el crecimiento de varias especies como: *A. flavus*, *A. ochraceus* o *A. fumigatus*, cuando se desarrollan sobre alimentos de tipo vegetal, se integran a éstos, y al consumir dichos productos pueden causar daños a diversos órganos, esto ocurre, aun cuando al momento de la ingesta de estos productos, el hongo ya no esté presente.

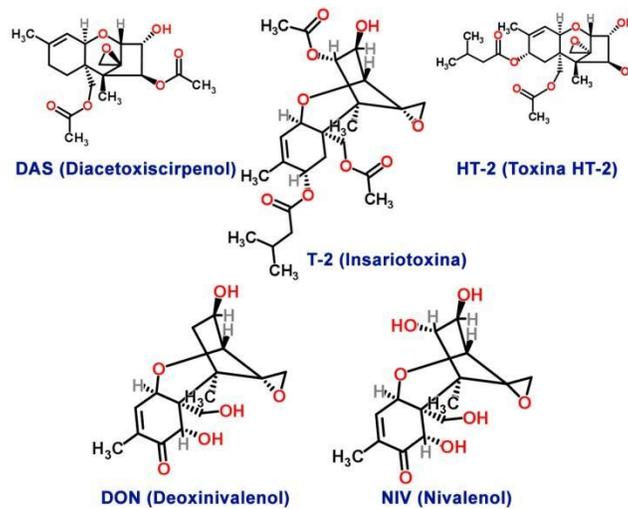


Imagen 8.4: Ejemplo de 5 micotoxinas Fuente: <http://blog.cromlab.es/analisis-de-micotoxinas-en-cereales/>

Se ha demostrado el potencial hepatotóxico y cancerígeno de muchos metabolitos como las aflatoxinas y ocratoxinas de diversas especies de *Aspergillus*; y otras como la gliotoxina en estudios de laboratorio ha mostrado tener un efecto inmunosupresor.

3. Invasión. *Aspergilosis*, el sufijo *osis* enfermedad o invasión. Este término es el empleado para referirnos a la invasión de cualquier tejido por una o varias especies de este género. Aunque como se mencionó previamente, estos hongos producen diversas enzimas y tienen varios mecanismos de evasión de la respuesta inmune, las *Aspergilosis* humanas generalmente requieren de factores predisponentes. En las siguientes páginas abordaremos brevemente las principales infecciones.

Localización	Factores predisponentes
Aspergilosis alérgica	Pacientes hipersensibles que habitualmente sintetizan gran cantidad de IgE. También la pueden presentar como enfermedad laboral personas que trabajan en sitios altamente contaminados con <i>Aspergillus</i> spp., en ellos se eleva la IgG específica contra estos hongos
Aspergiloma pulmonar	Cavidades pre-existentes como las causadas por la tuberculosis o funcionales v.g. bronquiectasia
Aspergilosis pulmonar invasiva	Leucemia, trasplantes de médula ósea u órganos sólidos, tratamiento para el cáncer, esteroides de alta potencia por periodos prolongados
Queratitis	Lesiones corneales con materiales contaminados y uso de antiinflamatorios
Cutánea	Quemaduras, abrasiones extensas de la piel
Senos paranasales	Vivir en zonas de clima tropical e infecciones bacterianas frecuentes
Otitis externas	Pacientes con prótesis auditivas, personas que practican natación con frecuencia o que habiten en regiones con gran humedad y temperatura elevada (clima tropical)
Otros órganos	Habitualmente son secundarias a otro foco de aspergilosis y generalmente son muy graves

Imagen 8.4: Localización de las Aspergilosis y factores predisponentes. Fuente: (T. Uribarren (2011); Micología Aspergillosis <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/aspergilosis.html>)

4. Colonización. Las masas fúngicas densas llamadas aspergilomas se desarrollan en las cavidades naturales del cuerpo humano como son los senos nasales, o el conducto auditivo externo de las personas sanas, pueden ser colonizadas por colonias de *Aspergillus* spp. También, en cavidades pulmonares patológicas formadas por enfermedades infecciosas como la tuberculosis, la histoplasmosis o coccidioidomicosis, los hongos de este género pueden desarrollarse de manera masiva y formar una masa tumoral compuesta de micelio fúngico que en ese caso recibirá el nombre de *Aspergiloma pulmonar*.

FORMAS CLÍNICAS:

ASPERGILOSIS PULMONAR.

En este grupo tenemos dos tipos de patología, la primera se presenta en personas con cavidades reales o virtuales y se denomina aspergiloma; la segunda, ocurre en pacientes con inmunosupresión severa y se denomina aspergilosis pulmonar invasiva.

ASPERGILOMA.

Con este término se refiere la formación de una masa fúngica en los pulmones de personas que tienen cavidades formadas previamente sin la participación de *Aspergillus*. Esto es, puede tratarse de pacientes que tiempo atrás sufrieron una tuberculosis de la que incluso pueden haber sanado, sin embargo, si por accidente conidias de *Aspergillus* se depositan en la cavidad, entonces el hongo formará una masa fúngica que ocupará todo el espacio existente y posteriormente puede

ocasionar inflamación y erosión de las paredes de la cavidad que se manifestaría clínicamente como hemoptisis. En las radiografías o tomografías se observará una masa redonda u ovoide en campos pulmonares que no presenta niveles hidro-aéreos.

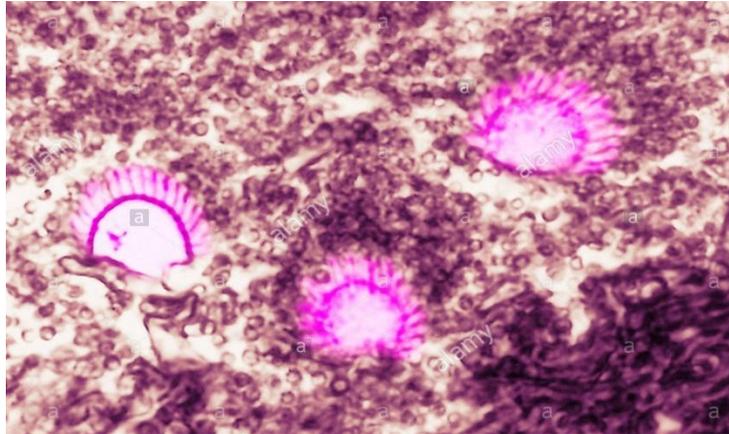


Imagen 8.5: Aspergilosis Pulmonar Fuente: (Dominio publico)

ASPERGILOSIS PULMONAR INVASIVA.

Se presenta en pacientes con inmunosupresión severa como son los leucémicos, cancerosos o personas con tratamiento esteroideo de larga duración, en estos enfermos los macrófagos alveolares son incapaces de eliminar las conidias que, aunque en escasa cantidad habitualmente llegan a las vías respiratorias inferiores, entonces, éstas se desarrollan formando filamentos dentro del parénquima pulmonar provocando múltiples focos invasivos generalmente pequeños pero diseminados. Los pacientes presentan sintomatología de una neumonía: disnea, tos, hipertermia y diaforesis. En las placas de rayos x, se observan infiltrados diseminados no característicos.

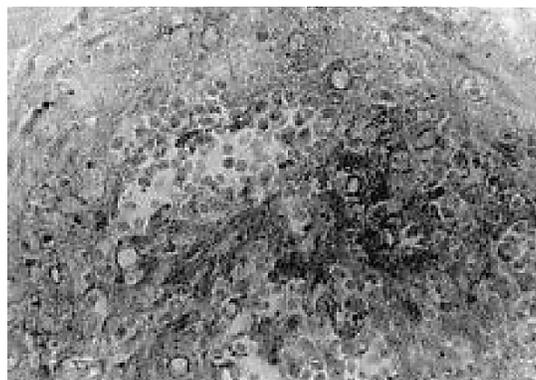


Imagen 8.6: Aspergilosis pulmonar invasora. Corte histológico que demuestra infiltración de la pared de un vaso sanguíneo pulmonar trombosado por *Aspergillus*. H&E (400x). Fuente: (Hernández E, Grande E, (1999) Habana, Aspergilosis pulmonar invasora en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida [En línea] recuperado de https://www.researchgate.net/figure/Figura-2-Aspergilosis-pulmonar-invasora-Corte-histologico-que-demuestra-infiltracion-de_fig2_242685963).

ASPERGILOSIS CUTÁNEA:

Generalmente se presenta en pacientes con quemaduras de 2º o 3er grado en quienes el área afectada denudada, con restos celulares y exudado rico en proteínas, carbohidratos y lípidos se convierte en un excelente medio de cultivo para conidias del ambiente que puedan caer y desarrollarse. En estos pacientes el pronóstico es bueno ya que la infección desaparece utilizando simplemente medidas higiénicas. En algunos pacientes las infecciones cutáneas se presentan por diseminación por vía sanguínea de infecciones en otros sitios, en ellos, la infección generalmente es grave y muchas veces mortal.



Imagen 8.7: Aspergilosis cutánea primaria de origen nosocomial por *Aspergillus fumigatus* en punto de inserción de catéter venoso en niño con leucemia linfocítica aguda. Fuente: (Revista Iberoamericana de Micología 2003 [En línea] recuperado de <http://aspergilosis.reviberoammicol.com/13.pdf>)

SINUSITIS:

Se presenta en pacientes con infecciones bacterianas frecuentes, se asocian al uso de antiinflamatorios o vasoconstrictores tópicos o sistémicos combinados con antibacterianos de amplio espectro. También pueden ocurrir en personas sin factor predisponente personal, pero que habiten en áreas con clima tropical. La sintomatología es la de un cuadro típico de sinusitis con hipertermia, cefalea, dolor de la cara, sensación de pesadez de la cabeza, conjuntivitis y rinorrea. El tratamiento en estos casos además del antimicótico puede requerir de una limpieza quirúrgica. En algunos pacientes hongos de este género pueden desarrollarse formando verdaderas masas tumorales (Aspergilomas) en los senos nasales o paranasales. En estos casos ocasionan lesiones destructivas y en las piezas quirúrgicas es posible observar los micelios muchas veces combinados con conidias.

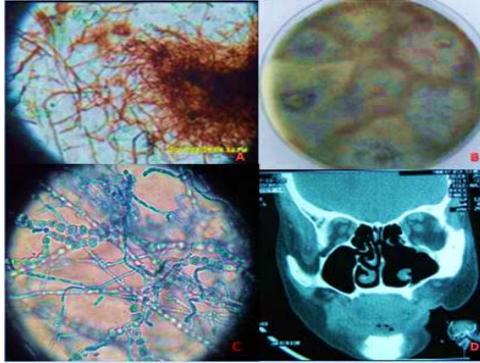


Imagen 8.8: Sinusitis por *Aspergillus* <https://vitae.ucv.ve/?module=articulo&rv=108&n=4821&m=2&e=4839>

OTITIS EXTERNAS

Generalmente hay el antecedente de uso de prótesis auditivas, las que ocluyen al conducto auditivo externo (CAE) forman un nicho de elevada temperatura y humedad propicio para el desarrollo de *Aspergillus spp.* Los pacientes refieren hipoacusia y prurito. La exploración clínica asistida con otoscopio generalmente muestra el CAE revestido por una colonia del agente causal. La eliminación de la infección puede dificultarse si no se retira la prótesis al menos temporalmente.



Imagen 8.9: Típica apariencia de una otitis moderadamente grave en el canal auditivo externo. Los puntos negros son colonias de *A. niger* esporulando Fuente: (J.D. Osguthorpe, 2006 Am Fam Physician).

OTROS ÓRGANOS

Los hongos de este género tienen capacidad de invadir cualquier órgano como: corazón, riñón, hígado o piel. Estos pacientes generalmente presentan una inmunosupresión severa y pueden morir a consecuencia de la micosis.

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO MICROBIOLÓGICO

Si hay exudados se debe hacer examen directo, frotis y cultivo. El examen directo aclarado con hidróxido de potasio o teñido con un colorante simple, en ocasiones permite visualizar las hifas hialinas y septadas o también las cabezas aspergiliares. En el frotis teñido con Gram, observamos los filamentos septados de aproximadamente 5 a 7 μM de diámetro, ramificados en ángulo de 45°. Las estructuras micóticas, generalmente se tiñen de manera irregular. Aunque los especímenes deben sembrarse en medio de agar dextrosa Sabouraud (ADS) simple y ADS con antibióticos, este género de hongos es sensible a la Cicloheximida, por lo que sólo se desarrolla sobre ADS simple. El estudio Macroscópico y Microscópico de las colonias generalmente permite identificar a los tres principales agentes de esta infección que son: *A. fumigatus*, *A. niger* y *A. flavus*.

HISTOPATOLOGÍA:

Los tejidos afectados por *Aspergillus*, presentan filamentos septados, tortuosos, de aproximadamente 5 μm de diámetro. Presentan ramificaciones en ángulos cercanos a los 45°.

El tejido puede presentar zonas de necrosis debido a la obstrucción vascular causada por los filamentos del hongo.

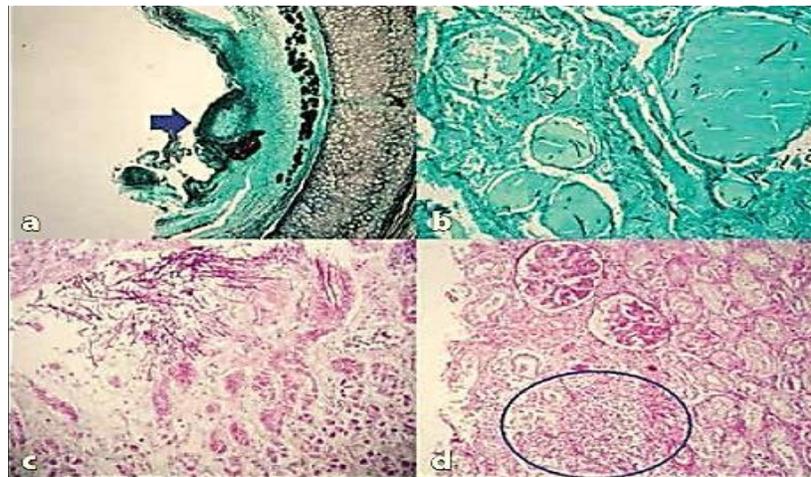


Imagen 8.10: Histopatología por *Aspergillus*. Hifas morfológicamente compatibles con *Aspergillus* spp. localizadas en: (a) Mucosa traqueal (flecha azul apuntando la micelio radiado). Tinción de metenamina de plata de Grocott. (b) Piscinas coloidales en tiroides. Tinción de metenamina de plata de Grocott. (c) Mucosa gástrica. Tinción de Acido peryodico de Schiff (PAS). (d) Intersticio de corteza renal (circulo azul indicando el grupo de hifas). Tinción de Acido peryodico de Schiff (PAS) Fuente: (SALAZAR M, Miguel Fernando y RECINOS CARRERA, Elio Germán. Aspergilosis diseminada: hallazgos postmortem en un caso de sepsis materna. ¿Es el embarazo un estado de inmunosupresión?. Rev. Fac. Med. (Méx.) [online]. 2013, vol.56, n.6 [citado 2020-03-30], pp.24-32. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0026-17422013000900004&lng=es&nrm=iso>. ISSN 2448-4865)

INMUNOLÓGICO:

En pacientes con inmunidad normal, o bien, pacientes alérgicos podemos buscar anticuerpos. Existen pruebas de precipitación en gel donde la presencia de una o más bandas de precipitación, se consideran diagnósticas. La técnica de ELISA es también un buen método inmunológico para detectar anticuerpos específicos. En los pacientes con inmunosupresión grave

como los trasplantados o los cancerosos, la posibilidad de detectar anticuerpos aún por las técnicas más sensibles es variable, en estos enfermos, es más factible detectar antígenos. En Europa y EUA, se dispone de técnicas como electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) que permiten detectar un anticuerpo de 58 kDa que une concanavalina. En pacientes con aspergilosis invasiva se detectan hasta ocho antígenos diferentes en la orina por medio de inmunoblotting.

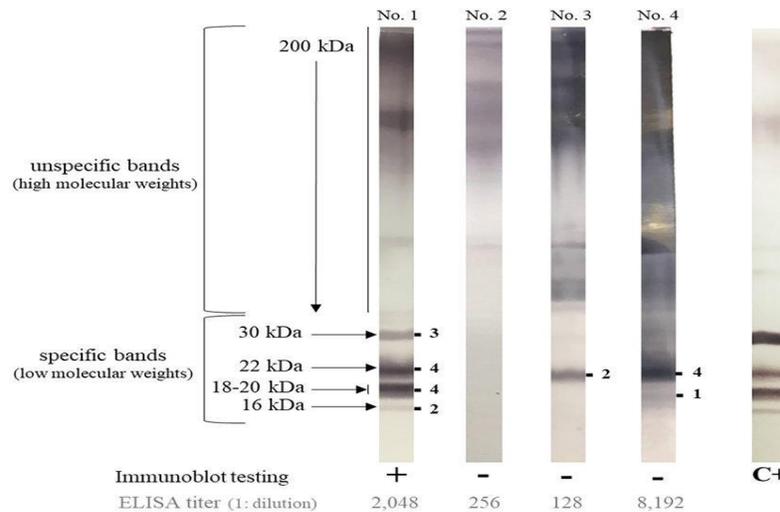
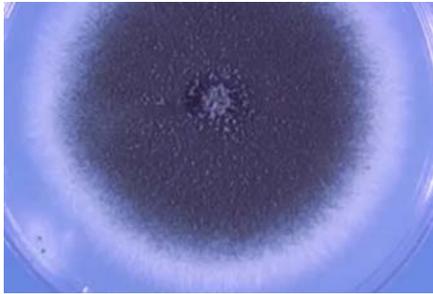
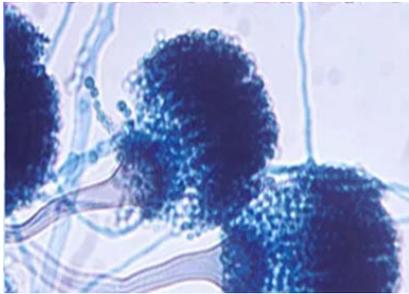
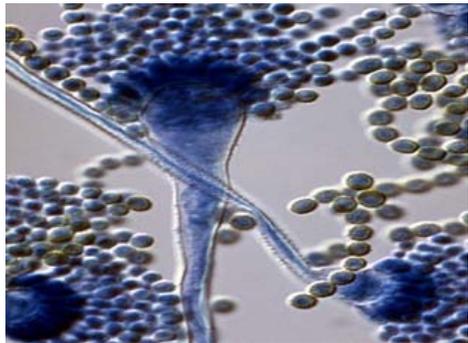


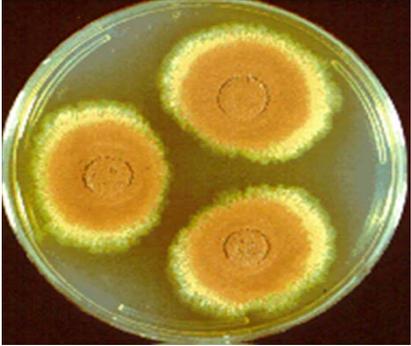
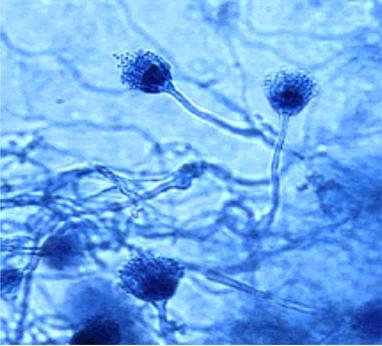
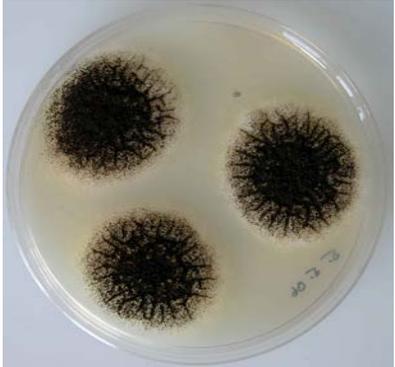
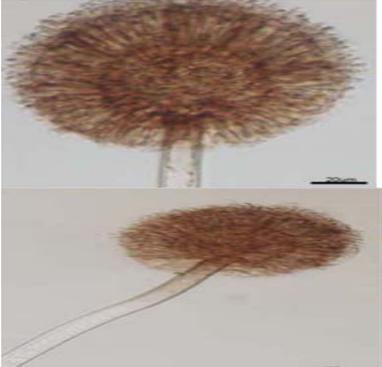
Imagen 8.11: Inmunoblotting de Aspergilosis invasiva. Fuente: (Desoubeaux, G, Le-Bert, C, Fravel, V, et al (2017). Evaluation of a genus-specific ELISA and a commercial *Aspergillus* Western blot IgG R immunoblot kit for the diagnosis of aspergillosis in common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Medical mycology*. 56. 10.1093/mmy/myx114.

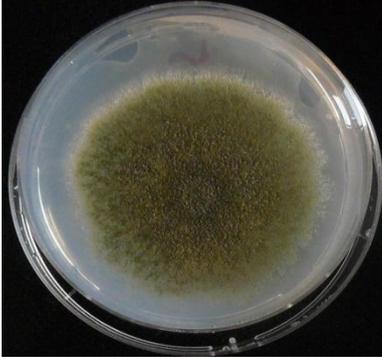
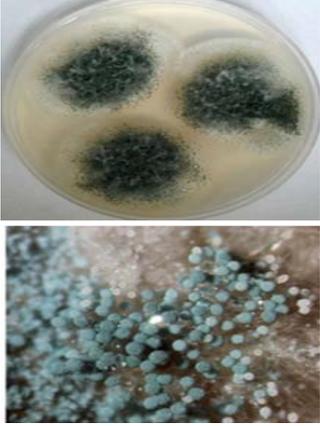
Otro antígeno que se detecta por ELISA y que en los últimos años ha despertado gran interés es la β -1-3 glucana. En un estudio demostró su utilidad en 37 de 41 casos con Aspergilosis comprobada y los valores estuvieron por debajo del valor de corte en 59 pacientes con fiebre por otras causas diferentes a la aspergilosis. Actualmente se utiliza la prueba de aglutinación de látex sensibilizado, que de acuerdo a diversos grupos de investigadores tiene una sensibilidad de 68%. Técnicas moleculares Debido a la dificultad que representan detectar antígenos o anticuerpos contra *Aspergillus spp*, desde 2002 se ha intentado hacer diagnóstico molecular. En los primeros ensayos se utilizaba la ampliación por PCR de subunidades ribosomales altamente conservadas en hongos filamentosos, incluido el género *Aspergillus*. Recientemente se ha logrado secuenciar un fragmento de DNA de *A. fumigatus* de un kb, con este primer se ha logrado detectar Aspergilosis de manera temprana. Una limitante a estas técnicas son los falsos positivos, que de acuerdo a diversas publicaciones puede ser hasta de 25% de los casos

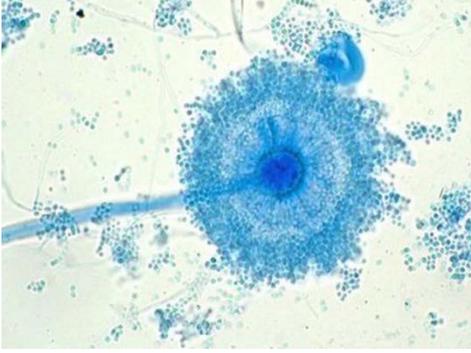
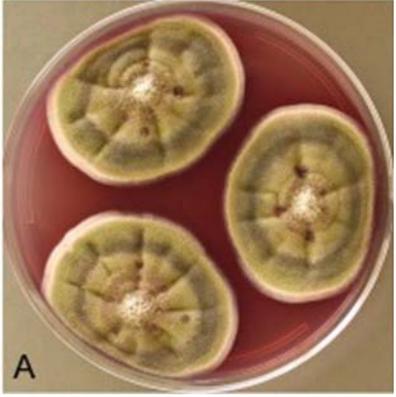
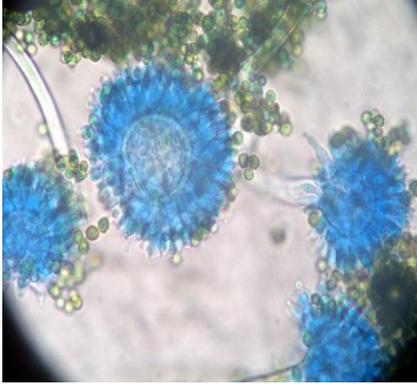
Tabla1: Especies de *Aspergillus*

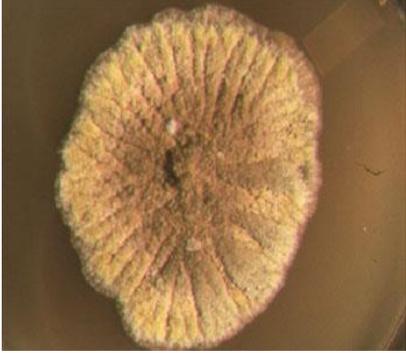
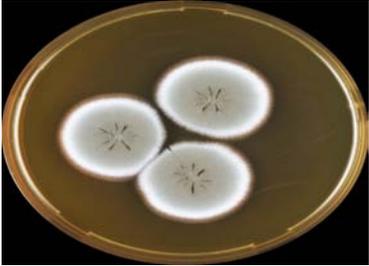
Especie	Descripción macroscópica	Descripción microscópica
<i>A. fumigatus</i>		

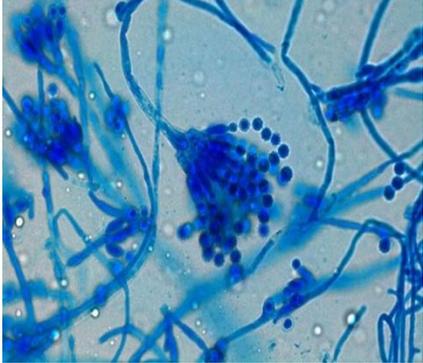
	 <p>Fuente: https://microbeonline.com/aspergillus-fumigatus-characteristics-pathogenesis-diagnosis/ Aspecto de la colonia: - Diámetro: 50 mm en una semana. - Topografía: Lisa y expansiva. - Textura: Desde pulverulenta a como el fieltro. - Color: Verde-azulado, a menudo con un margen blanco. - Reverso: Color crema. Fuente: http://fundacionio.org/gefor/micologia/Aspergillus%20fumigatus.html</p>	 <p>Fuente: https://microbeonline.com/aspergillus-fumigatus-characteristics-pathogenesis-diagnosis/ Aspecto microscópico: Características predominantes: Conidióforos vesiculares; conidias pequeñas y muy numerosas, masa de esporas en forma de columna. - Conidióforo: Corto, vesículas en forma de pera, no tienen métula; fiálides agrupadas o apiñadas con la punta hacia arriba cubriendo únicamente los 2/3 de la vesícula; en algunos aislamientos las fiálides tienen un color ligeramente marrón. - Características de las conidias: Redondas, 2,5-3,5 µm de diámetro; superficie ligeramente rugosa. - Variantes morfológicas: Colonia blanca: corresponden a aislamientos que no esporulan o lo hacen escasamente; a menudo el desarrollo de las células conidiógenas es aberrante. Fuente: http://fundacionio.org/gefor/micologia/Aspergillus%20fumigatus.html</p>
<i>A. flavus</i>	 <p>Fuente: http://thunderhouse4-yuri.blogspot.com/2012/02/aspergillus-flavus.html Aspecto de la colonia: - Diámetro: 60 mm en una semana. - Topografía: Lisa. - Textura: Desde lanosa a arenosa. - Color: Verde brillante; ocasionalmente amarillo-marrón. - Reverso: Color crema. Fuente: http://fundacionio.org/gefor/micologia/Aspergillus%20flavus.html</p>	 <p>Fuente: https://www.quironsalud.es/blogs/es/alergologia-infantil/cuales-alergias-hongos-comunes Aspecto microscópico: Características predominantes: Numerosos conidióforos vesiculares; conidias relativamente grandes. - Conidióforo: Rugoso; vesículas globosas con esporas distribuidas en forma de columna o radiada; en algunas cabezas las fiálides nacen directamente de la vesícula y en otras nacen en métulas. - Características de las conidias: De redondas a elipsoides, 3-6 µm de diámetro; lisas o finamente rugosas. Fuente: http://fundacionio.org/gefor/micologia/Aspergillus%20flavus.html</p>
<i>A. terreus</i>		

	 <p>Fuente: http://www.life-worldwide.org/esp/fungal-diseases/aspergillus-terreus</p> <p>Aspecto de la colonia:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Diámetro: 40 mm en una semana. - Topografía: Lisa. - Textura: De aterciopelada a arenosa. - Color: Marrón canela. - Reverso: De amarillo a marrón pálido. <p>Fuente: http://fundacionio.org/gefor/micologia/Aspergillus%20terreus.html</p>	 <p>Fuente: http://fundacionio.org/gefor/micologia/Aspergillus%20terreus.html</p> <p>Aspecto microscópico:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Características predominantes: Marrón pálido, cabezas con masa de esporas en forma de columna; conidióforos vesiculares con la cabeza en forma de abanico. - Conidióforo: Liso e incoloro; vesículas con forma de media esfera con métulas cilíndricas y largas de las que salen fiálides que cubre los 2/3 superiores de la superficie. - Características de las conidias: Redondas y lisas, 2 µm de diámetro. - Características de las clamidiosporas: De pared gruesa, ovals, incoloras; pueden producirse a lo largo de hifas vegetativas sumergidas. <p>Fuente: http://fundacionio.org/gefor/micologia/Aspergillus%20terreus.html</p>
<p><i>A. niger</i></p>	 <p>Fuente: https://www.pinterest.com.mx/pin/822751425647239446/</p> <p>Aspecto de la colonia:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Diámetro: 60 mm en una semana. - Topografía: Liso, a menudo con pliegues radiales. - Textura: Arenosa. - Color: Micelio desde el blanco al amarillo, cubriéndose paulatinamente de cabezas esporuladas de color negro o negro-púrpura. - Reverso: Color crema. <p>Fuente: http://fundacionio.org/gefor/micologia/Aspergillus%20niger.html</p>	 <p>Fuente: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Aspergillus_niger-awamori.jpg</p> <p>Aspecto microscópico:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Características predominantes: Cabezas negras, largas y esporuladas, conidias negras - Conidióforo: Incoloro, liso y de pared gruesa; vesículas largas y redondeadas con métula y fiálides que cubren toda la superficie. - Características de las conidias: De redondas a ovals, 2,5-10 µm de diámetro; superficie rugosa. <p>Fuente: http://fundacionio.org/gefor/micologia/Aspergillus%20niger.html</p>

<p><i>A. nidulans</i></p>	 <p>Fuente: https://alchetron.com/Aspergillus-nidulans Aspecto de la colonia:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Diámetro: 30 mm en una semana. - Topografía: Lisa. - Textura: Desde aterciopelada a pulverulenta. - Color: Micelio verde oscuro que termina desarrollando zonas amarillentas. - Reverso: De color rojo oscuro a púrpura. <p>Fuente: http://fundacionio.org/gefor/micologia/Aspergillus%20nidulans.html</p>	 <p>Fuente: https://alchetron.com/Aspergillus-nidulans Aspecto microscópico:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Características predominantes: Conidióforo pequeño y vesicular; ascocarpos grandes y redondeados con contenido de color rojo; abundantes células de Hülle incoloras. - Conidióforo: Liso, pigmentado de marrón, con células basales características; vesículas semiesféricas con métula y fiálides que cubren la mitad superior. - Características de las conidias: De redondas a ovales, 3,3-5 µm de diámetro; lisas. - Ascocarpos: Se localizan dentro de las zonas amarillentas que son las células de Hülle; ascosporas de color rojo o púrpura, de 5 x 4 µm de diámetro, con 2 crestas ecuatoriales. Fuente: http://fundacionio.org/gefor/micologia/Aspergillus%20nidulans.html
<p><i>A. clavatus</i></p>	 <p>Fuente: Aspergillus clavatus Desm. Características de la colonia. Las colonias (CzA) crecen rápidamente, de color verde azulado, que consiste en un fieltro de conidióforos visibles con morfología tipo cabeza de cerillo llamados coremios, con un halo blanco en la periferia.</p>	 <p>Fuente: http://www.socalemi.es/index.php/atlas/micologia/aspergillus Microscopía.</p> <p>Las cabezas conidiales en coremios que irradian, luego se dividen en varias columnas. Conidióforos de 2-4 mm de longitud; estípites de paredes lisas, hialinas. Vesículas clavadas, 40-60 µm de diámetro. Células conidiógenas uniseriadas. Conidios de pared lisa, verde pálido, elipsoidal, 7-8 x 2-3 µm.</p>

<p><i>A. candidus</i></p>	 <p>Fuente: http://fungi.myspecies.info/file-colorboxed/932 Aspecto de la colonia: - Diámetro: 20 mm en una semana. - Topografía: Desde lisa a convexa. - Textura: Desde arenosa a algodonosa. - Color: De blanco a crema pálido. - Reverso: Color crema pálido. Fuente: http://fundacionio.org/gefor/micologia/Aspergillus%20candidus.html</p>	 <p>Fuente: https://alchetron.com/Aspergillus-candidus Aspecto microscópico: - Características predominantes: Se mezclan los conidióforos largos y blancos que finalizan en forma de vesícula, con conidióforos cuya cabeza no tiene o tiene muy poca forma de vesícula. - Conidióforo: Las cabezas grandes tienen vesículas redondeadas con métula y filídes que cubren completamente su superficie u ocasionalmente sólo 1/3 de la misma; las cabezas pequeñas pueden no tener vesículas y recuerdan a los conidióforos de <i>Penicillium</i>. - Características de las conidias: De redondas a ovals, incoloras, 2,5-3,5 µm de diámetro, lisas. Fuente: http://fundacionio.org/gefor/micologia/Aspergillus%20candidus.html</p>
<p><i>A. versicolor</i></p>	 <p>Fuente: https://www.researchgate.net/figure/Aspergillus-versicolor-NRRL-238-culture-plates-are-9-cm-diam-colonies-grown-at-25-C_fig11_233424552 Aspecto de la colonia: - Diámetro: 20 mm en una semana. - Topografía: Lisa. - Textura: Arenosa, algodonosa o aterciopelada. - Color: Zonas de color verde, amarillo, marrón pálido y rosa. Variación considerable entre aislamientos. - Reverso: Color crema pálido o rojo. Fuente: http://fundacionio.org/gefor/micologia/Aspergillus%20versicolor.html</p>	 <p>Fuente: https://www.flickr.com/photos/josue_cruz/3111003625 Aspecto microscópico: - Características predominantes: Conidióforos vesiculares con cabezas radiadas. - Conidióforo: Liso, incoloro; vesículas redondas u ovals con métula y filídes que cubren toda la superficie; algunas cabezas de tipo <i>Penicillium</i>; a veces se visualizan células de Hülle. - Características de las conidias: Redondas, 2,5-3 µm de diámetro; superficie ligeramente rugosa. Fuente: http://fundacionio.org/gefor/micologia/Aspergillus%20versicolor.html</p>

<p><i>A. glaucus</i></p>	 <p>Fuente: http://fundacionio.org/gefor/micologia/Aspergillus%20glaucus.html Aspecto de la colonia: - Diámetro: 20 mm en una semana. - Topografía: Lisa. - Textura: Desde pulverulenta a densamente algodonosa. - Color: Micelio de color verde azulado pálido que se convierte en marrón-verdoso; a menudo se ven ascocarpos amarillos. - Reverso: Color crema. Fuente: http://fundacionio.org/gefor/micologia/Aspergillus%20glaucus.html</p>	 <p>Fuente: https://www.google.com.mx/url?sa=i&url=http%3A%2F%2Fwww.caltextmoldservices.com%2Fsection%2Fmold_library%2Faspergillus%2Faspergillus_glaucus%2F&psig=AOvVaw0nPvjwMH1kSp-fbZrR-A0J&ust=1583088107997000&source=images&cd=vfe&ved=0CAMQjB1qFwoTCODG1Py09-cCFQAAAAAAdAAAAABAG Aspecto microscópico: - Características predominantes: Conidióforos vesiculares; conidias pequeñas y numerosas; a menudo se visualizan ascocarpos amarillos. - Conidióforo: Anchos y de pared fina; las vesículas pueden tener forma de maza o ser redondeadas; no tienen métula; generalmente las filídes cubren completamente la superficie de la vesícula; muchos aislamientos tienen cabezas aberrantes de las que salen conidióforos secundarios. - Características de las conidias: De redondas a ovales, 4-8 μm de diámetro; de superficie ligeramente rugosa. - Ascocarpos: no pigmentados, redondeados, 80-250 μm de diámetro (en relación con la fase sexual). Fuente: http://fundacionio.org/gefor/micologia/Aspergillus%20glaucus.html</p>
<p><i>A. flavipes</i></p>	 <p>Fuente: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Aspergillus_flavipes_meaox.png Aspecto de la colonia: - Diámetro: 20 mm en una semana. - Topografía: Desde lisa a convexa. - Textura: Desde arenosa a algodonosa. - Color: De blanco a crema pálido. - Reverso: Color crema pálido.</p> <p>Aspecto de la colonia (En agar glucosa de peptona a 30°C):</p> <ul style="list-style-type: none"> - Diámetro: 40 mm en una semana. - Topografía: Convexa. - Textura: Desde algodonosa a como el fieltro. - Color: Desde blanco a color del ante. <p>- Reverso: Color crema o amarillo-marrón. Fuente: http://fundacionio.org/gefor/micologia/Aspergillus%20flavipes.html</p>	 <p>Fuente: https://www.aspergillus.org.uk/content/aspergillus-flavipes-18 Aspecto microscópico: - Características predominantes: Cabezas pequeñas; con el tiempo la masa de esporas unida a la cabeza tiene forma de columna. - Conidióforo: Largo, liso, pigmentado de amarillo; la métula y las filídes cubren la mayoría de la superficie de la vesícula. - Características de las conidias: De redondas, 2-3 μm de diámetro, lisas. Fuente: http://fundacionio.org/gefor/micologia/Aspergillus%20flavipes.html</p>

<p><i>A. sydowii</i></p>	 <p>Fuente: https://www.pinterest.com.mx/pin/419045940313468942/ Aspecto de la colonia: - Diámetro: 20 mm en una semana. - Topografía: Lisa. - Textura: De arenosa a aterciopelada. - Color: Verde-azulado. - Reverso: Color marrón pálido o marrón-rojizo. http://fundacionio.org/gefor/micologia/Aspergillus%20sydowii.html</p>	 <p>Fuente: https://alchetron.com/Aspergillus-sydowii Aspecto microscópico: - Características predominantes: Conidióforos vesiculares con cabezas radiadas. - Conidióforo: Liso e incoloro; vesículas redondeadas u ovals con métula y fiálides que cubren completamente la superficie; ocasionalmente se visualizan cabezas de tipo <i>Penicillium</i>; a veces se ven células de Hülle. - Características de las conidias: Redondas, 2,5-4 µm de diámetro; superficie muy rugosa. http://fundacionio.org/gefor/micologia/Aspergillus%20sydowii.html</p>
<p><i>A. ustus</i></p>	 <p>Fuente: https://www.researchgate.net/figure/Aspergillus-ustus-A-B-Colonies-at-25-C-after-7-d-A-CYA-B-MEA-C-E-G-H_fig10_5359389 Aspecto de la colonia: - Diámetro: 30 mm en una semana. - Topografía: Lisa. - Textura: Lanosa. - Color: Amarillo-marrón tornándose a gris-púrpura o gris. - Reverso: Amarillo, rojizo o púrpura. Fuente: http://fundacionio.org/gefor/micologia/Aspergillus%20ustus.html</p>	 <p>Fuente: https://www.researchgate.net/figure/Aspergillus-ustus-A-B-Colonies-at-25-C-after-7-d-A-CYA-B-MEA-C-E-G-H_fig10_5359389 Aspecto microscópico: - Características predominantes: Marrón pálido, conidióforos vesiculares; conidia oscura y de superficie rugosa; algunos aislamientos tienen células de Hülle grandes y ovaladas. - Conidióforo: Cortos, marrón pálido, salen de células basales muy diferenciadas; vesículas redondeadas con métula y fiálides que cubren los 2/3 de la superficie; células de Hülle, que pueden ser abundantes, ovals o en forma de salchicha normalmente están dobladas y retorcidas. - Características de las conidias: Marrón oscuro, redondas, 3-3,5 µm de diámetro; superficie rugosa. Fuente: http://fundacionio.org/gefor/micologia/Aspergillus%20ustus.html</p>

Material:

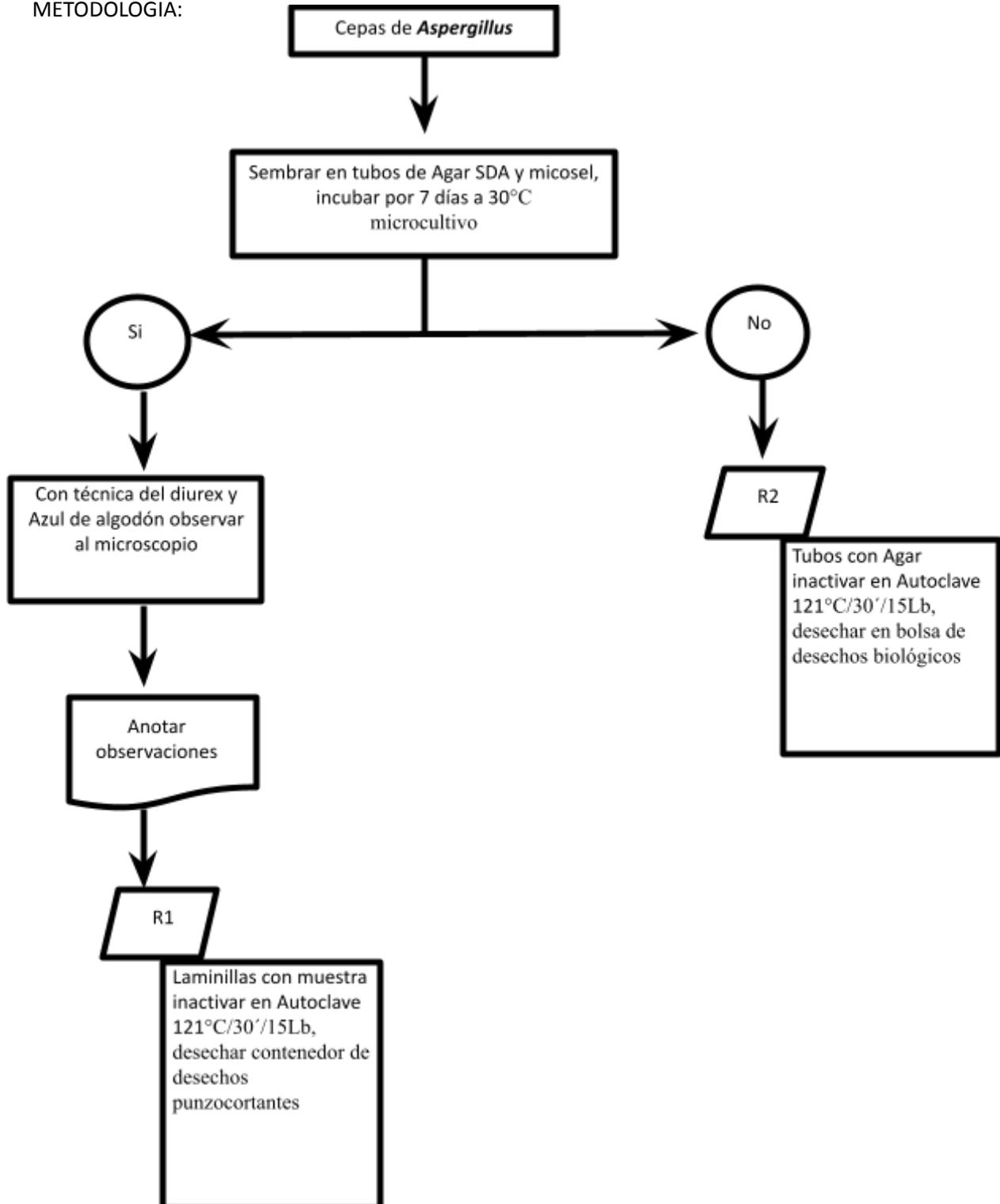
Por persona:

- 1.- Bata blanca
- 2.- Plumon indeleble
- 3.- Guantes de Latex
- 4.- Lentes de seguridad
- 5.- Cubrebocas

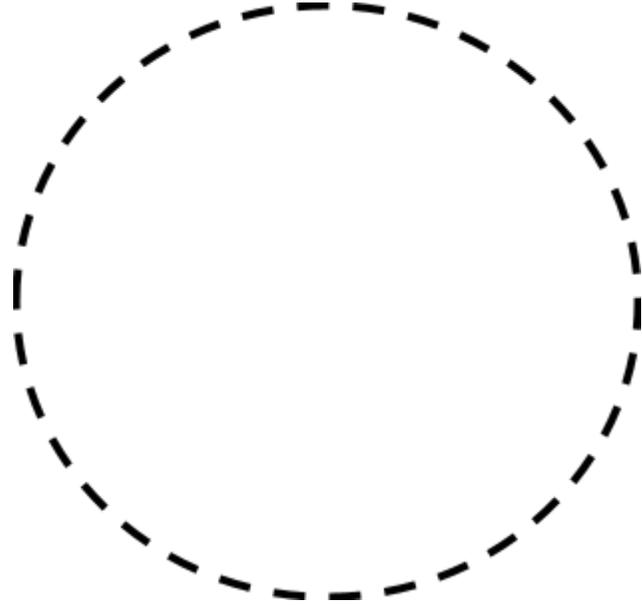
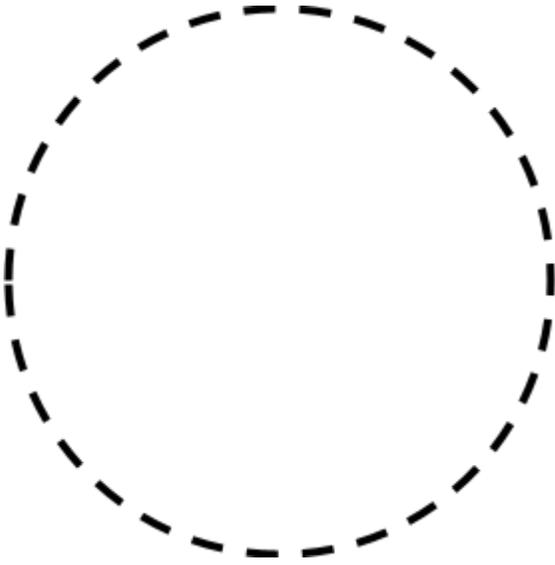
Por Equipo:

- 1.- Sistema de Microcultivo
- 2.- 1 Tubo con 10 mL de agua destilada estéril
- 3.- 1 Tubo con formol al 10%
- 4.- Cubreobjetos y portaobjetos
- 5.- Pinzas
- 6.- Bisturi con hojas
- 7.- Colorante para Tincion de Azul de algodón
- 8.- Cultivos en SDA de especies de *Aspergillus* seleccionadas por el asesor

METODOLOGIA:



Resultados:



Conclusiones:

BIBLIOGRAFÍA

- Brakhage A, Jahn B, Schmidt A, (1999) *Aspergillus fumigatus*. Contributions to microbiology. Switzerland Karger.
- Del Palacio A, Alhambra A, Cuétara MS, Pontón J (2007), Estado actual del diagnóstico precoz de las infecciones invasoras causadas por *Aspergillus* y otros hongos filamentosos emergentes. Rev Iberoam Micol. Volume 24, Issue 3, Pages 187-197, [En línea] recuperado de [https://doi.org/10.1016/S1130-1406\(07\)70042-6](https://doi.org/10.1016/S1130-1406(07)70042-6)
- Guarro J, Xavier M, Severo L (2010). Differences and similarities amongst pathogenic *Aspergillus* species. En: Pasqualotto AC, editor. *Aspergillosis: From diagnosis to prevention*. London, UK: Springer.
- Herrera T, Ulloa M (1998), *El Reino de los Hongos*, Fondo de Cultura Económica-UNAM, México.
- Jonshon E, Borman A, (2010), The importance of conventional methods: microscopic and culture. En: Pasqualotto AC, editor. *Aspergillosis: From diagnosis to prevention*. London, UK: Springer.

- Latge JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis, (1999), *Clin Microbiol Rev*;12:310- 50, [En línea] recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10194462>
- López R, Méndez L, Hernández F et al (2004) *Micología Médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio*, México, Editorial Limusa.
- Méndez L. *Aspergilosis* (2008), En: *Actualidades en Micología Médica*. México, Ed. Facultad de Medicina, UNAM.
- Montejo M (2002), *Infección invasora por Aspergillus y otros hongos filamentosos en enfermos con trasplante de órgano sólido*. *Rev Iberoam Micol.*;19:9-12, [En línea] recuperado de <http://www.reviberoammicol.com/2002-19/009012.pdf>
- Perling D, Hope W, (2010) *Echinocandins*. En: Pasqualotto AC, editor. *Aspergillosis: From diagnosis to prevention*. London, UK: Springer
- Richardson MD, (2005), *Aspergillosis*. En *Medical Mycology*. Topley & Wilson's. *Microbiology and microbiol infections*. Edited by: Merz WG, Hay RJ. Ed. Hodder Arnold. United Kingdom..

HISTOPATOLOGÍA DE LAS MICOSIS

El estudio histopatológico en las micosis profundas, es importante para establecer el diagnóstico de las mismas, su clasificación y manejo adecuado. En general, los hallazgos macroscópicos que se observan en estos cuadros, es similar, un infiltrado granulomatoso, de ahí que la identificación del agente causal sea indispensable para que este examen resulte de gran valor.

MICOSIS SUBCUTÁNEAS

Micetoma La epidermis presenta alteraciones variables, ya que dependen de la lesión de la biopsia, por lo que se puede observar desde atrofia, pasando por acantosis y llegando hasta la hiperplasia pseudoepiteliomatosa. Asimismo, puede apreciarse ulceración. En la dermis, se encuentra un infiltrado que puede ocupar desde la dermis superficial, media y profunda. Este infiltrado está constituido por linfocitos, histiocitos, plasmocitos y focos de polimorfonucleares en cuyo centro se localizan los agentes causales del micetoma, denominados “granos” (cúmulo de filamentos).



Imagen 9.1: Micosis subcutáneas Micetoma Fuente: (Arenas 2014)

Existen además zonas de edema y otras de fibrosis. Asimismo, se pueden apreciar algunas células epitelioides aisladas y gigantes multinucleadas de tipo Langhans y/o de cuerpo extraño.

En los micetomas, la presencia del grano es lo que determina el diagnóstico específico, por lo que se deben señalar varias características del mismo tales como: forma, tamaño, color presencia o ausencia de cemento y el tipo de reacción inflamatoria. En México, el agente causal más frecuente de micetoma, es *Nocardia brasiliensis* y corresponde histopatológicamente a un grano pequeño, que mide desde 40 a 200 μ m, es polimorfo (anular, redondo, bilobulado, poli lobulado, vermiforme, etc.) y está constituido por un cuerpo filamentos que tiene poca afinidad por la hematoxilina, por lo que se dice que se tiñe pálidamente con la tinción de rutina; se encuentra rodeado, por unas estructuras intensamente eosinófilas denominadas clavos.

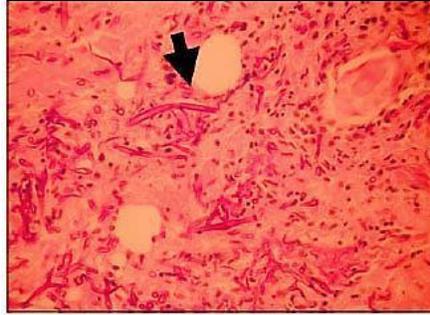


Imagen 9.2: Corte histopatológico subcutáneo, Hifas no septadas en color fucsia, rodeadas por tejido conectivo y restos de tejido adiposo necrótico del celular subcutáneo. Tinción de PAS TAGER F, Marlis; ZAROR C, Luis y MARTINEZ D, Pilar. Mucormicosis cutánea en un paciente inmunocomprometido. Rev. chil. infectol. [online]. 2012, vol.29, n.1 [citado 2020-03-30], pp.101-107. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182012000100017&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0716-1018. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182012000100017>.https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182012000100017

El número de granos, es variable y el tipo de reacción inflamatoria es importante. *Actinomadura madurae*, es el agente causal que sigue en orden de frecuencia; es un grano grande, mide de 1 a 3 mm, inclusive, en algunas ocasiones puede observarse hasta macroscópicamente, su forma puede ser circular, ovalo cartográfica; su cuerpo se tiñe intensamente con la hematoxilina y se encuentra rodeado por una banda eosinofílica en la periferia (fleco o pseudoclavas). El número de los granos también puede variar y la reacción inflamatoria que produce es menos intensa que la de *Nocardia*. Al igual que todos los granos que producen micetoma, se encuentra en el centro de, los cúmulos de polimorfonucleares. Otro agente etiológico de micetoma, es *Streptomyces somaliensis*, el cual se aprecia como un grano mediano (~ 2 mm), circular u oval que se tiñe pálidamente con la hematoxilina. Es un grano duro, ya que contiene cemento, característica que le confiere un aspecto estriado con presencia de fisuras o grietas. La reacción inflamatoria muestra abundantes células gigantes multinucleadas de tipo cuerpo extraño como respuesta a la presencia de cemento en el cuerpo del grano. *Actinomadura pelletieri*, forma un grano pequeño (200-500 micras) intensamente basófilo, de consistencia dura, ya que al igual que el *S. somaliensis* contiene cemento, lo que da como resultado observarlo fragmentado, dando la imagen conocida como de "plato roto".



Imagen 9.3: Corte histológico de *Actinomadura madurae* Fuente: (TAGER F, ZAROR C, MARTINEZ D, Mucormicosis cutánea en un paciente inmunocomprometido. Rev. chil. infectol. [online]. 2012, vol.29, n.1 [citado 2020-03-30], pp.101-107. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182012000100017&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0716-1018. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182012000100017>.https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182012000100017)

La reacción inflamatoria es similar a la de *Nocardia*, pero con la presencia de numerosas células gigantes multinucleadas de tipo cuerpo extraño. Otros agentes causales menos frecuentes son los llamados Hongos verdaderos, cuyos granos corresponden principalmente a: *Madurella mycetomatis*, *Madurella grisea*, *Pyrenochaeta romeroi*, *Fusarium*, entre otros. Todos estos granos son grandes (de 0.5 a 5 mm) y pueden tener color negro como los tres primeros o blanco como el último. Histopatológicamente, el cuerpo de estos granos está constituido por filamentos y vesículas que se disponen en forma desordenada y se entremezclan. El color de estos granos en el estudio histológico varía del rosa pálido al café marrón. Asimismo, el número y forma de estos granos es variable.

Esporotricosis

Es una micosis subcutánea, producida por *Sporothrix spp.* Afecta la piel, trayecto de vasos linfáticos y ocasionalmente órganos y sistemas. Histopatológicamente es la más inespecífica de las micosis profundas ya que los hallazgos microscópicos que se observan no son diagnósticos de la entidad, son características que sugieren o hacen pensar en esa enfermedad.

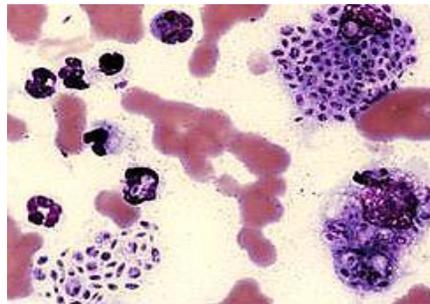


Imagen 9.4: Corte histológico de esporotricosis Fuente: (:Feline sporotrichosis 4.jpg

Creado el: 17 de noviembre de 2006 <https://es.wikipedia.org/wiki/Esporotricosis>)

Sporothrix spp son hongos dimorfos que se presentan como mohos en los medios de cultivo y en forma de levaduras en los tejidos, mismas que no siempre están presentes y a veces son difíciles de identificar. La epidermis, frecuentemente muestra una hiperplasia pseudoepiteliomatosa. En toda la dermis se observa un infiltrado importante constituido por linfocitos, histiocitos, plasmocitos, células epitelioides que pueden formar células gigantes multinucleadas y numerosos polimorfonucleares que tienden a formar microabscesos. Todas estas células pueden estar entremezcladas o disponerse en tres zonas a una central, llamada también supurativa, que está formada por polimorfonucleares, otra intermedia, llamada tuberculoide donde se aprecian células epitelioides y por último la zona sifiloide a base de plasmocitos y linfocitos. Esta imagen histológica es la más característica o sugestiva de la esporotricosis.

Por otro lado, la presencia de cuerpos asteroides dentro de los microabscesos de polimorfonucleares, también es sugerente del diagnóstico y aunque se pueden observar con la tinción de rutina, se recomienda la tinción especial con PAS para facilitar su identificación.

Cromblastomycosis

Es una micosis subcutánea que afecta piel y tejido celular subcutáneo. Es producida por hongos dematiáceos pertenecientes a 3 géneros a *Fonsecaea*, *Phialophora* y *Cladosporium*.



Imagen 9.5: Corte histológico de Cromblastomycosis (Casas 2000)

Estos hongos presentan habitualmente, una forma parasitaria que se conoce con el nombre de “células fumagoides” y cuya presencia en los cortes histológicos nos hace el diagnóstico de cromblastomycosis. Histopatológicamente, la epidermis presenta una hiperqueratosis importante de tipo paraqueratósico. Los procesos interpapilares van de una acantosis irregular hasta una hiperplasia pseudoepiteliomatosa, dentro de la cual pueden observarse microabscesos de polimorfonucleares con la presencia de células fumagoides. La dermis, desde la superficial hasta la profunda, muestra un infiltrado denso constituido por focos de células epitelioides gigantes multinucleadas de tipo Langhans, linfocitos y cúmulos de polimorfonucleares. En la mayoría de los casos se aprecian granulomas bien formados de tipo tuberculoide, con zonas centrales supurativas (de polimorfonucleares donde se advierten las células fumagoides. Estas células son redondas u ovals, tabicadas o no, que miden de 4 a 8 μm de diámetro, de color café amarillento, lo cual facilita su identificación con la tinción de rutina. Las células fumagoides pueden observarse tanto en el centro de los microabscesos de los polimorfonucleares, como dentro de las células gigantes multinucleadas. Asimismo, pueden apreciarse aisladas, en cadena, en grupos, racimos o incluso filamentosamente, por lo que el número de ellas es muy variable.

MICOSIS SISTÉMICAS

En este grupo tenemos a cuatro micosis: *Coccidioidomycosis*, *Histoplasmosis*, *Blastomycosis* y *Paracoccidioidomycosis*. Sus agentes se adquieren por vía respiratoria formando un foco pulmonar primario y posteriormente se pueden diseminar a otros órganos y tejidos. Tienen una distribución geográfica restringida a ciertas áreas que les proporcionan los nutrientes y las condiciones ambientales adecuadas para su desarrollo. Son importantes porque pueden causar la muerte o dejar secuelas que ocasionan invalidez de diversos grados. La histopatología también es de gran utilidad para el diagnóstico de estas infecciones, donde además de la presencia de las estructuras parasitarias, se observan cambios histológicos correspondientes a lesiones de

evolución crónica entre los que tenemos fibrosis, granulomas y células gigantes multinucleadas de tipo Langhans o de cuerpo extraño.

Aunque tinciones especiales para hongos como ácido periódico de Schiff o Gomori-Grocott hacen más evidente la presencia de los hongos, todas ellas pueden diagnosticarse en base a una tinción de hematoxilina-eosina. Coccidioidomicosis La reacción inflamatoria es una combinación de reacción inflamatoria granulomatosa en focos antiguos y una reacción inflamatoria purulenta aguda, esta última se observa en las proximidades de las esférulas rotas que han liberado sus endosporas junto con gran cantidad de antígenos que son quimitácticos para polimorfonucleares. Estas células son sustituidas por células plasmáticas, células epitelioides y células multinucleadas tipo Langhans.

HISTOPLASMOSIS

En esta infección, las levaduras que son la forma parasitaria del hongo, se observan la mayoría de las veces dentro de células del sistema retículo endotelial, éstas, son pequeñas (2 a 4µM en su diámetro mayor) y ocasionalmente se observan algunas estructuras filamentosas.

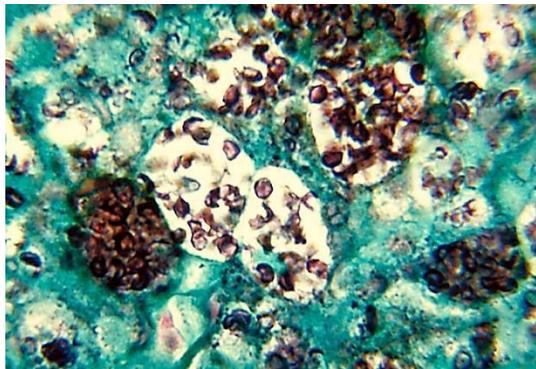


Imagen 9.6: Corte histológico de Histoplasmosis Fuente: Dominio público File:Histoplasmosis capsulatum.jpg Subido el: 1 de mayo de 2006

BLASTOMICOSIS

Es una infección endémica de los Estados Unidos de Norteamérica, sin embargo, en México recientemente se diagnosticó un caso.

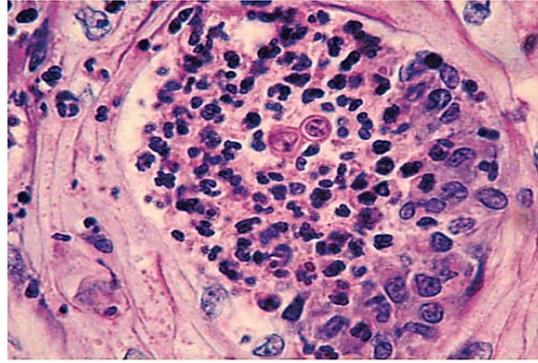


Imagen 9.7: Corte histológico de Blastomicosis Fuente: (Bonifaz 2015)

Las estructuras parasitarias de *Blastomyces dermatitidis* son levaduras unigemantes de cuello de gemación amplio que ayuda a diferenciarlos de las levaduras del género *Paracoccidioides* que es el agente etiológico de la paracoccidioidomicosis ya que estas, generalmente son multigemantes y el cuello de gemación es angosto. Esta micosis es frecuente en las zonas tropicales de México como Veracruz.

MICOSIS POR HONGOS CON BAJO PODER DE PATOGENICIDAD

Hasta hace dos o tres décadas, las principales infecciones de este grupo eran la candidosis, criptococosis y mucormicosis, sin embargo, en la actualidad existen cada día más factores de oportunismo para las micosis y esto ha originado un incremento el número de agentes y en las variedades y gravedad de las infecciones, así, por mencionar sólo algunas mencionaremos que ahora se diagnostican cada vez más casos de aspergilosis tanto pulmonar como otras localizaciones o infecciones causadas por *Pneumocystis jiroveci* (hongo que hasta 1984 era considerado protozooario).

Aún en estas infecciones sistémicas, el estudio histológico puede ser de gran utilidad en el diagnóstico, por lo tanto, siempre que se tengan lesiones en tejidos accesibles para la toma de muestra, en piezas extirpadas quirúrgicamente o en tejidos de cadáveres, se debe solicitar estudio histológico, en muchas ocasiones es el único método disponible para determinar la causa de enfermedad y o de muerte de los pacientes.

CANDIDOSIS

Puede invadir cualquier órgano o tejido, la mayoría de casos son causados por *C. albicans*, sin embargo, en fechas recientes otras especies como *C. parapsilosis* han incrementado su frecuencia. Habitualmente en los tejidos afectados se observan levaduras y filamentos, pero también es posible observar infecciones en donde sólo se presentan levaduras.

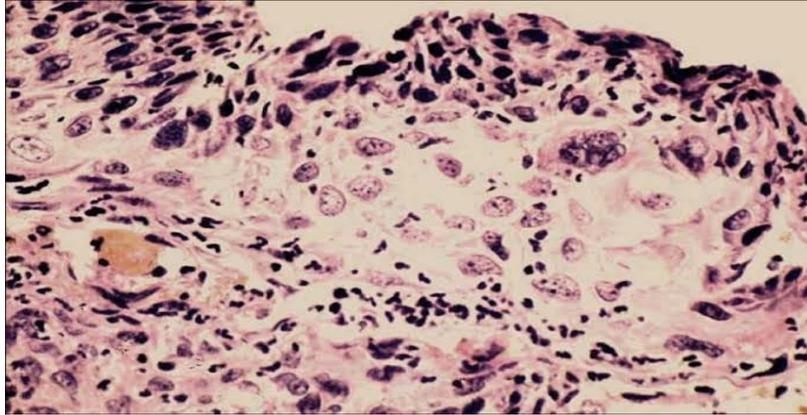


Imagen 9.8: Corte histológico del cervix mostrando la cervicitis herpética aguda. Note las células multinucleadas gigantes en la capa epitelial, la disociación de las capas epiteliales y la necrosis coagulativa de las células epiteliales superficiales. El epitelio se encuentra infiltrado por polimorfonucleares y muestra hiperemia de los vasos sanguíneos Fuente: Castanon A, Leung VMW, Landy R, Lim AWW, Sasieni P (2013). Characteristics and screening history of women diagnosed with cervical cancer aged 20-29 years. Br J Cancer 109;35-41)

MUCORMICOSIS

La forma más grave que es la rinocerebral, se presenta principalmente en personas con diabetes mellitas descompensada, en ellos, puede causar la muerte en aproximadamente 15 a 30 días ya que invade ojo y cerebro con gran rapidez.

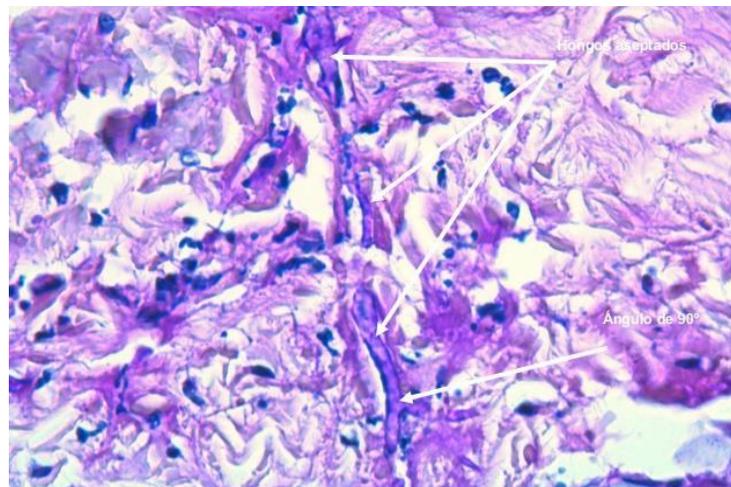


Imagen 9.9: Corte histológico de Mucormicosis, Hifas no septadas y gruesas. Tinción PAS (Bonifaz 2015)

Aunque el diagnóstico se establece la mayoría de las veces por examen directo del material necrótico, es estudio histopatológico permite observar los filamentos gruesos cenocíticos característicos de esta infección. En personas con desnutrición grado III afecta principalmente tubo digestivo mientras que la leucemia en cualquiera de sus formas predispone a la mucormicosis pulmonar, estas dos últimas variedades clínicas es muy difícil sospecharlas clínicamente y en muchas ocasiones es el examen postmortem el que proporciona el diagnóstico.

ASPERGILOSIS

Existen cerca de 200 especies de *Aspergillus*, de ellas 3 especies (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus flavus*) son los que causan la mayoría de infecciones. Esta patología es frecuente en personas con leucemias o trasplantes de órganos, en ellas puede ser la causa de la muerte en las formas diseminadas.

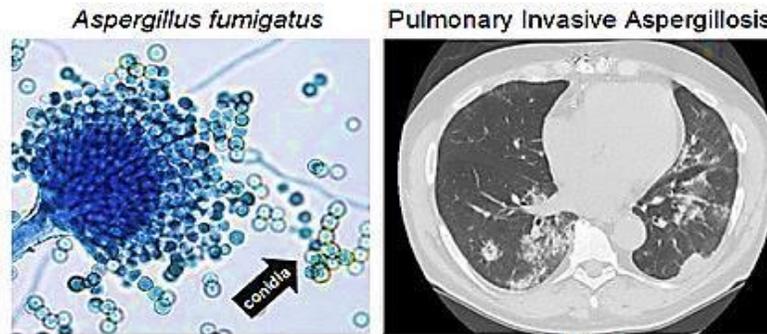


Imagen 9.10: Avergilliosis Pulmonar Fuente: (Mario Lupi 2006)

CRIPTOCOCOSIS

Género de levaduras oportunistas que habitan normalmente en material orgánico en descomposición y en deyecciones de aves.

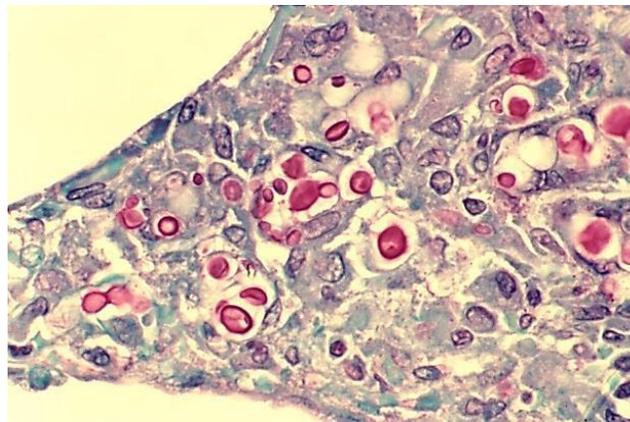


Imagen 9.11: Corte histológico de Criptococosis Fuente: (Khan Z, Al-Anezi A, Chandy R, (2003), Disseminated cryptococcosis in an AIDS patient caused by a canavanine-resistant strain of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*. J Med Microbiol.;52(Pt 3):271-275. doi: 10.1099/jmm.0.05097-0)

Penetran por vía respiratoria ocasionando infección pulmonar inaparente y de ahí se puede diseminar a otros órganos como el cerebro, la piel, el riñón o el hueso. Las especies que afectan con mayor frecuencia son *Cryptococcus neoformans* y *C. gatii*, raramente se refieren infecciones por *C. laurentii* o *C. terreus* La histología muestra levaduras de 5 a 7 μM rodeados de una cápsula de grosor variable, una característica de estas lesiones es la ausencia de células inflamatorias.

BIBLIOGRAFÍA :

- Chandler FW, Kaplan W, Ajello L. (1980) Histopathology of mycotic diseases. Publishers Inc. Ed. Year Book Medical.
- Kempf, Hantschke, Kutzner (2008) Dermopathology New York USA Ed springer
- Milikowski & Berman (2001) Atlas de Histopatología Madrid España Ed Marban
- Scsnadig VJ, Woods GL (2009). Histopathology of fungal infections. En Anaisse EJ, McGinnis MR, Pfaller MA. Clinical Mycology. New York Ed. Churchill Livingstone Elsevier.
- Stacey E (2007) Hisyoligy for Pathologists Philadelphia USA Ed Lipincott Williams & Wilkins
- WHEATER STEVENS (2003) HISTOPATOLOGIA BASICA Madrid España ELSEVIER ESPAÑA

EVALUACIÓN DE ANTIMICÓTICOS:**Introducción:**

El tratamiento de las enfermedades fúngicas en el siglo XXI, sigue siendo un reto para el médico general, dermatólogo, internista, incluso para el infectólogo. Por ello continúa el desarrollo de nuevos antifúngicos cada vez más potentes. En la elaboración de estos fármacos se tiene en cuenta la relación de su estructura-función que permita la muerte del hongo sin ocasionar daños graves al hospedero. Definición de antifúngico: Sustancia capaz de producir una alteración en la estructura de una célula fúngica, que consiga inhibir su desarrollo, alterando su capacidad de supervivencia, directa o indirectamente. Lo que facilita el funcionamiento de los sistemas de defensa del hospedero. La síntesis de antimicóticos se inició en el siglo XX. Aumentó en las últimas 2 décadas en relación a: uso y abuso de antibióticos de amplio espectro, quimioterapia, inmunosupresores, dispositivos intravasculares, y la epidemia del SIDA.

El tratamiento de las micosis es más complicado que el de las infecciones bacterianas por las siguientes consideraciones:

1. Las micosis superficiales se encuentran en piel y faneras con escasa o nula vascularización.
2. Las micosis profundas producen respuestas granulomatosas que impiden una buena penetración del fármaco.
3. Los antimicóticos son poco solubles y los hongos son de crecimiento lento, con pared celular con quitina, poliósidos, fosfolípidos y esteroides, ausentes generalmente en bacterias.

4. Las micosis generalizadas producen un cuadro clínico poco característico, haciendo muy difícil el diagnóstico.

5. Existe incremento en el uso de antibióticos de amplio espectro, corticoides, citostáticos o inmunosupresores, pacientes inmunocomprometidos. Los fármacos son clasificados como antimicóticos locales o tópicos y antimicóticos sistémicos. El mecanismo de acción depende del lugar en el que actúen: Pared celular, Membrana celular o Núcleo y está relacionado con la estructura química del antifúngico.

Tabla 1: Clasificación por su estructura

Familia	Farmacos
Polienos	Nistatina, natamicina, Anfotericina B
Azoles	fluconazol, itraconazol, voriconazol y posaconazol
Imidazol	miconazol, clotrimazol
Triazoles	fluconazol, itraconazol, ketoconazol
Triazoles de segunda generación	voriconazol, ravuconazol, posaconazol
Alilaminas	Terbinafina, naftifina
Lipopéptidos	Papulacandinas. Triterpenos glicosilados. Equinocandinas: caspofungina, anidulofungina, micafungina.
PIRIMIDINAS FLUORADAS	Flucitosina
Otros	Yoduro de potasio, ciclopirox, tolnaftato, griseofulvina

Tabla 2: Clasificación por sitio de acción

Pared celular: es una cubierta, provee morfología, facilita intercambio de iones, filtración de proteínas y participa en metabolismo y catabolismo de nutrientes complejos.	
LIPOPÉPTIDOS	Inhiben la síntesis de los glucanos al inactivar la enzima 1,3- beta-glucano sintetasa. La falta de glucanos en la pared celular la vuelve débil e incapaz de soportar el estrés osmótico por lo que muere.
En membrana celular: Ergosterol	
POLIENOS	Se une al ergosterol, forma poros, altera la permeabilidad de la membrana, pérdida de proteínas, glúcidos y cationes mono y divalentes, causa de muerte celular

AZOLES	Inhiben el citocromo P-450-3 A a través de la inactivación de la enzima C-14-alfa dimetilasa, con lo que interrumpe la síntesis de ergosterol.
ALILAMINAS	inhiben la síntesis del ergosterol , inhiben a la enzima escualeno epoxidasa, así disminuye la concentración de ergosterol , aumenta escualeno, aumenta la permeabilidad se interrumpe la organización celular
En núcleo:	
ANTIMETABOLITOS	Pirimidinas fluoradas, fluocitosina Los fármacos más efectivos son los que afectan la membrana celular del hongo como los macrólidos poliénicos y los azoles Otro antifúngicos importantes son los que afectan al ARN (5-fluorocitosina) o los que interactúan con los microtúbulos e impiden la división celular (griseofulvina)

ANFOTERICINA B. Lactona macrocíclica (anillo voluminoso de 12 o más), tiene estructura poliénica (enlaces dobles). Es producida por *Streptomyces nodosus*. Forma complejos condensados con los ergosteroles de la membrana gracias a la conformación de cinta y lo atrapa por lo que hay menos fármaco libre que disminuye la toxicidad. Tiene amplio espectro sobre micosis profundas por patógenos como *Histoplasma*, *Coccidioides*, *Paracoccidioides*, *Balastomices*, *Sporotrix* y oportunistas como: *Candida*, *Aspergillus*, *Criptococcus*, *Mucor*. Efectos adversos: daño renal, reacciones alérgicas (fiebre, escalofrios, alteración de TA), daño a médula ósea, náuseas, vómitos, cefalea.

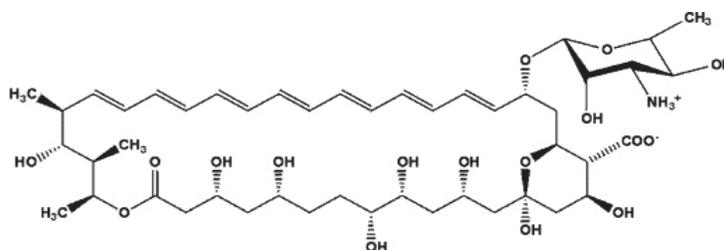


Imagen 10.1: Estructura química de la Anfotericina B Fuente: (Gil, E, Cunha, L, Gonçalves, A, et al (2020). Importancia de los Compuestos Inorgánicos en el Tratamiento de la Leishmaniasis.[En línea] recuperado de https://www.researchgate.net/publication/268430703_Importancia_de_los_Compuestos_Inorganicos_en_el_Tratamiento_de_la_Leishmaniasis/citation/download)

NISTATINA: Macrólido tetraénico producido por *Streptomyces noursei*. No se absorbe por vía gastrointestinal, piel o vaginal. Espectro: Candidosis. Efectos adversos: náusea, vómitos, diarrea,

Imagen 10.2: Estructura química de la nistatina Fuente: (Dominio público, File:Nystatin.png, Creado el: 20 de febrero de 2007)

IMIDAZOLES: Ketoconazol, Econazol, Butoconazol, Isoconazol, Sulconazol, Bifonasol, Miconazol, Clotrimazol. Espectro: Micosis superficiales: tiñas, candidosis, pitiriasis versicolor. Micosis sistémicas: cocidiodomicosis, criptococosis, blastomicosis, histoplasmosis y paracoccidiodomicosis

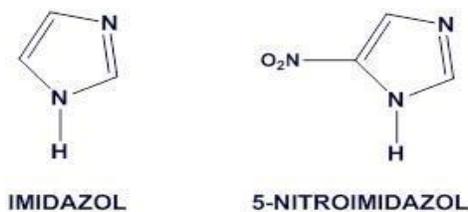


Imagen 10.3: Estructura química de los imidazoles Fuente: (Lopez Tricas J, (2013) GIARDIA LAMBLIA (GIARDIASIS, LAMBLIASIS) Zaragoza España [En línea] recuperado de <https://sites.google.com/a/info-farmacia.com/info-farmacia/microbiologia/giardia-lambliia-giardiasis-lambliasis>)

TRIAZOLES: Fluconazol, Terconazol, Itraconazol, Voriconazol. Espectro: dermatofitos, levaduras, mohos no dermatofitos. Itraconazol y fluconazol mayor afinidad por la enzima P450 de hongos que la de mamíferos.

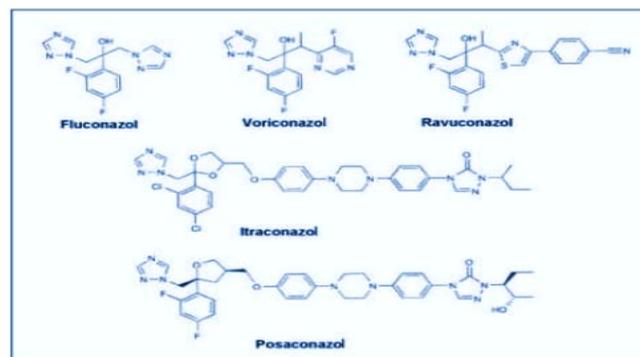


Imagen 10.4: Estructura química de los triazoles de segunda generación Fuente: (Escobar C, Zuluaga A (2004) Nuevos antimicóticos y su uso en dermatología Medicina Cutánea Ibero-Latino-Americana [En línea] recuperado de <https://www.medigraphic.com/pdfs/cutanea/mc-2004/mc046b.pdf>)

KETOCONAZOL. Imidazol, 5 estructuras del anillo con 2 átomos de nitrógeno. Lipofílico, buena absorción oral.

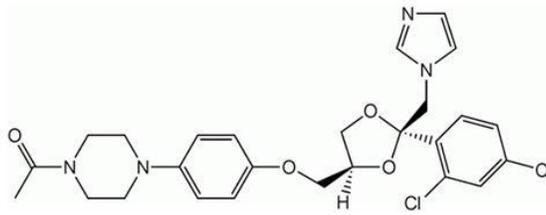


Imagen 10.5: Estructura química del Ketokonazol Fuente: (Gregori Valdés B (2005) Estructura y actividad de los antifúngicos Rev Cubana Farm; 39(2) [En línea] recuperado de <http://scielo.sld.cu/pdf/far/v39n2/far12205.pdf>)

FLUCONAZOL. Triazol: 2 anillos con 3 átomos de nitrógeno, anillo bencénico con 2 fluor.



Imagen 10.6: Imagen química del Fluconazol Fuente: (Goodman & Gilman (2012) Las bases farmacológicas de la terapéutica, Mexico McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V.)

VORICONAZOL. Triazol de segunda generación, derivado sintético del fluconazol. De amplio espectro: aspergilosis. Indicado en infecciones resistentes a fluconazol.

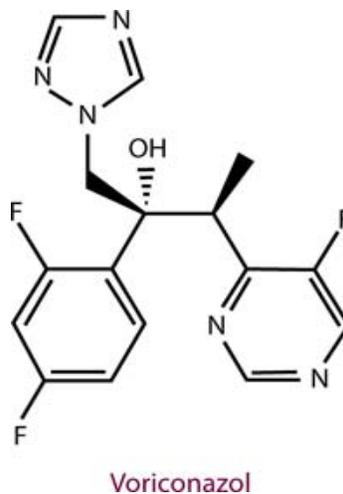


Imagen 10.7: Imagen química del Voriconazol Fuente: (Goodman & Gilman (2012) Las bases farmacológicas de la terapéutica, Mexico McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V.)

ITRACONAZOL. Triazol, 5 estructuras de anillo con 3 átomos de nitrógeno. Bien absorbido con alimentos. Lipofílico. Alta afinidad por la queratina. PFH alteradas 0.3 – 5%, sin daño hepático. Antiácidos disminuyen su absorción. Contraindicado con administración conjunta con terfenadina, astemizol, simvastatna, lovastatina, midazolam.



Imagen 10.8: Imagen química del ItraconazolFuente: (Goodman & Gilman (2012) Las bases farmacológicas de la terapéutica,Mexico McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V.)

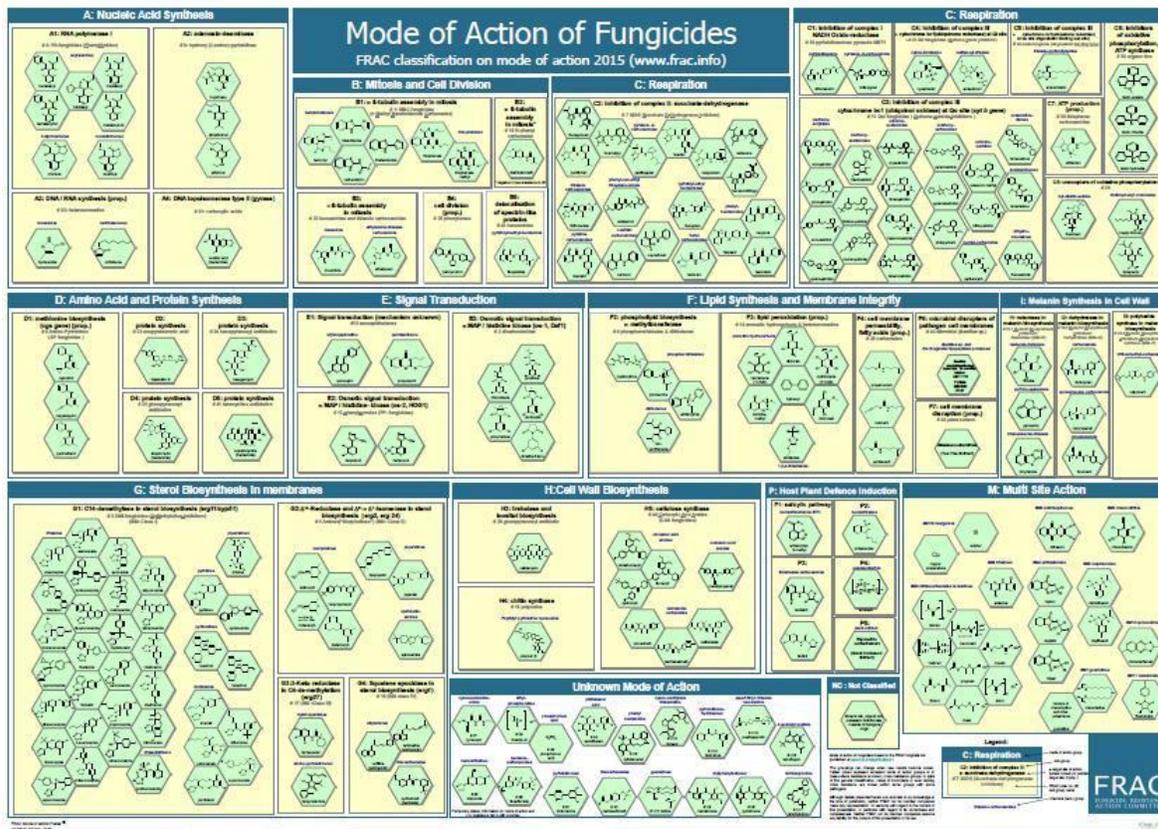


Imagen 10.9: Modo de Accion de los Fungicidas Fuente: (Davidse, L.C.(1995) Phenylamide fungicides – biochemical action and resistance. In: Lyr, H. Modern Selective Fungicides.Gustav Fischer Verlag, New York.)

Material:

Por persona

1.- Bata blanca

2.- Plumon indeleble

3.- Guantes de Latex

4.-Lentes de seguridad

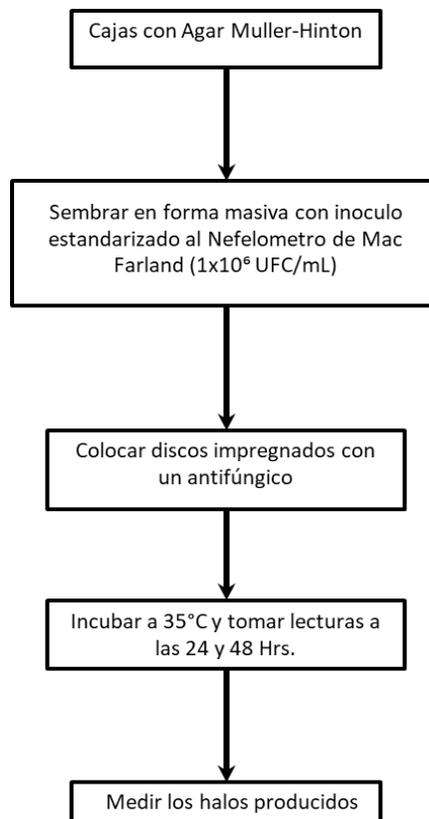
Por equipo:

1.- Laminillas Preparadas

Pruebas de sensibilidad Cualitativas

Hongos Levaduriformes

Metodo de difusión en Agar



Bibliografía:

- Davidse, L.C.(1995) Phenylamide fungicides – biochemical action and resistance. In: Lyr, H. Modern Selective Fungicides.Gustav Fischer Verlag, New York.
- Escobar C, Zuluaga A (2004) Nuevos antimicóticos y su uso en dermatología Medicina Cutánea Ibero-Latino-Americana [En línea] recuperado de <https://www.medigraphic.com/pdfs/cutanea/mc-2004/mc046b.pdf>

- Gil, E, Cunha, L, Gonçalves, A, et al (2020). Importancia de los Compuestos Inorgánicos en el Tratamiento de la Leishmaniasis.[En línea] recuperado de https://www.researchgate.net/publication/268430703_Importancia_de_los_Compuestos_Inorganicos_en_el_Tratamiento_de_la_Leishmaniasis/citation/download
- Goodman & Gilman (2012) Las bases farmacológicas de la terapéutica, Mexico McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V.
- Gregorí Valdés B (2005) Estructura y actividad de los antifúngicos Rev Cubana Farm; 39(2) [En línea] recuperado de <http://scielo.sld.cu/pdf/far/v39n2/far12205.pdf>
- Lopez Tricas J, (2013) GIARDIA LAMBLIA (GIARDIASIS, LAMBLIASIS) Zaragoza España [En línea] recuperado de <https://sites.google.com/a/info-farmacia.com/info-farmacia/microbiologia/giardia-lambliia-giardiasis-lambliasis>

Discusión:

La asignatura de Micología y Micología diagnóstica para la carrera de QFB nos dan las bases de como se debe trabajar los hongos pero así como cambian las tecnologías en el Laboratorio clínico y Microbiológico el diagnóstico Micológico no se detiene, no ha cambiado en esencia ya que sigue un tanto resagado a comparación de las antes mencionadas, la toma de muestra y el procesamiento no es el mismo como se obtienen en un Hospital, también el cambio significativo del Asa bacteriológica a el Asa de Pala no es el mismo que el de los laboratorios impartidos en la FES.

En el Centro Médico SXXI del IMSS en el laboratorio de Dr. Luis Javier Méndez Tovar se desarrolló parte de este manual ya que en los laboratorios de las clínicas de grado básico no se le toma importancia a las infecciones micóticas hasta que ya se encuentra muy avanzada dicha infección, en personas con un Sistema inmunológico competente pero también hay muchos con daño renal o transplantados que al no ser detectados desde las clínicas básicas llegan ya con deterioro en su salud en una clínica de tercer nivel.

Es por eso que en este trabajo se realizó para dar un pequeño esbozo de algunas modificaciones básicas que se usan en dichos laboratorios.

Conclusiones:

La realización de este manual me ayudó a refrescar un poco las formas en las que se trabajan las muestras a comparación de como se trabajan en la FES

Se enlistaron medios de cultivo de uso general en el laboratorio de Micología del Centro Médico siglo XXI

Se determinaron algunas Practicas con ligeros cambios de acuerdo a como se trabaja en el laboratorio del Dr. Mendez Tovar.

ANEXO 1:

METODOS DE SIEMBRA DE HONGOS.

Tipos de Asa:

El asa bacteriológica es un instrumento de trabajo utilizado por los microbiólogos para la siembra de cultivos microbianos (bacterias u hongos). Es quizás el instrumento más usado por estos profesionales.

Su uso parece sencillo, pero en realidad requiere de mucho entrenamiento. Antes de comenzar a sembrar, el asa debe ser esterilizada en el mechero de Bunsen, tomándose luego el inóculo microbiano que puede provenir de un cultivo líquido o de un cultivo sólido.



Imagen A1.1: Tipos de asas bacteriológicas. Fuente: No machine-readable author provided. ぼやお assumed (based on copyright claims). [CC BY-SA 3.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/>)]

Existen varios tipos de asas bacteriológicas y cada una tiene un uso específico. Los tipos de asas son las siguientes: asa en forma de anillo calibrada, asa en forma de anillo no calibrada, asa recta o en aguja, asa espatulada, asa en forma de “L” y asa con punta aguda.

Por otra parte, las asas pueden ser de uso permanente o desechable. Las de uso permanente se esterilizan en el mechero, siendo reutilizables y muy duraderas. En tanto que, las desechables vienen estériles de fábrica, se utilizan una sola vez y se descartan.

Asa en forma de anillo, no calibrada

Es el asa más usada en el laboratorio de microbiología. Sirve para tomar un inóculo de una suspensión microbiana (medio líquido) o una porción de colonia (medio sólido), para ser sembrado en otro medio de cultivo, bien sea una prueba bioquímica o un medio más enriquecido o selectivo, según sea el caso. También es útil para realizar extendidos microbianos sobre un portaobjeto.

Con este tipo de asa se puede realizar el estriamiento del inóculo inicial. Además está diseñada para que se deslice suavemente sobre el agar, sin dañarlo. Por supuesto, esto requiere de un personal entrenado que maneje la técnica de sembrado, aplicando la fuerza y los movimientos correctos para hacer un buen estriamiento.

Con esta asa se pueden ejecutar varias técnicas de sembrado. Ejemplo, los medios sólidos en placas de Petri por lo general se siembran por agotamiento

Asa en forma de anillo, calibrada

Esta asa como su nombre lo indica está calibrada para tomar una cantidad específica de suspensión microbiana. Se usa cuando es necesario que el inóculo cumpla con lo estandarizado en la técnica.

Cabe destacar que, las asas calibradas tienen un margen de error, el cual varía de acuerdo al ángulo con que se tome la muestra y al tamaño de la boca del recipiente.

Si el asa de 0,001 ml se introduce en posición vertical en un recipiente de boca pequeña (≤ 7 mm), la cantidad tomada será 50% menor a la deseada.

Esto ocurre porque a menor diámetro de la boca del recipiente, mayor es la tensión superficial y por tanto, las fuerzas de adhesión entre (vidrio – líquido) aumentan. Esto genera que la carga de líquido tomada por el asa sea menor.

Mientras que, si se toma con un ángulo de 45° en un recipiente de boca ancha (≥ 22 mm) se puede recoger 150% más de la cantidad requerida. En este caso, la tensión superficial es menor y las fuerzas de cohesión vidrio/plástico disminuye, mientras aumenta la fuerza de cohesión líquido-líquido.

Asa recta o en aguja

Es también llamada asa en hilo. Se usa para inocular ciertas pruebas bioquímicas, especialmente aquellas que requieren ser sembradas por la técnica de punción. Ejemplo, medios semisólidos que se preparan en forma de taco, tales como: medio SIM, MIO y O/F.

Además en el caso de MIO y SIM que evalúan motilidad, es indispensable que la punción se realice con asa en aguja, ya que la interpretación de una motilidad positiva se presenta cuando las bacterias crecen hacia los lados del inóculo inicial.

Una prueba inoculada con un asa con anillo puede falsear los resultados (falso positivo). Por ello, en este tipo de sembrado se debe cuidar que la punción sea única, y que al retirar esta salga en la misma dirección en la que entró.

Otra prueba que debe sembrarse con aguja a pesar de que se prepara en forma de cuña es el Kligler. En esta prueba no es recomendable que el oxígeno penetre en la profundidad del agar, ya que se requiere un medio pobre en oxígeno para que ocurran ciertas reacciones químicas. Esta asa también es usada para tocar una colonia específica con el fin de subcultivar.

Asa espatulada

La mayoría de los microorganismos dan colonias suaves y fáciles de desprender. Sin embargo, existen algunos agentes microbianos cuyas colonias son duras y secas, ejemplo las micobacterias en general y algunos hongos. En estos casos es útil utilizar el asa espatulada.

Asa en forma de “L”

Su uso más frecuente es para hacer repiques de cultivos de hongos, especialmente mohos.

Asa con punta aguda

Es útil para tomar colonias muy pequeñas presentes en cultivos polimicrobianos, con el fin de poder subcultivarlas.

Colonia de microorganismo – Cultivo puro.

Un cultivo puro es aquel que contiene un solo tipo de microorganismo, su manejo es vital cuando se pretende caracterizar algún tipo de microorganismo y se obtiene mediante el uso de técnicas de aislamiento. El siguiente diagrama le permite diferenciar que tipo de colonias podrá observar en sus resultados. En términos muy generales las bacterias son de apariencia cremosa al igual que los hongos levaduras mientras los hongos miceliales tienen una apariencia algodonosa, aterciopelada o granulosa

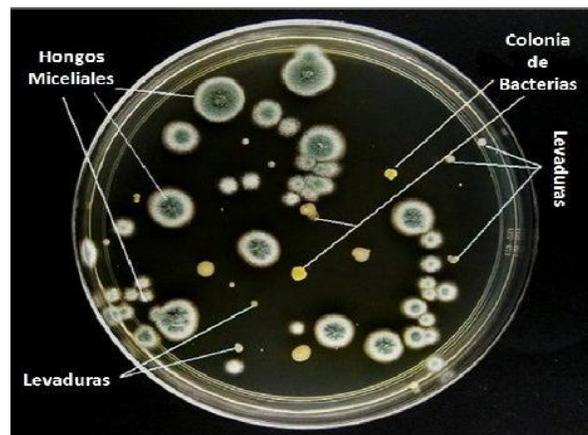


Imagen A1.2: Algunas formas macroscópicas (colonias) de hongos levaduras, hongos miceliales y bacterias. Fuente: (Madigan, M ; Martinko, J & Parker, J. (2004). Brock: Biología de los Microorganismos. New Jersey USA Prentice Hall

SIEMBRA DE HONGOS LEVADURIFORMES (LEVADURAS).

Debido a que este microorganismo en forma y apariencia de las colonias es similar a las bacterias, debe sembrarlo por la técnica de Estrías por Agotamiento y por Punción y Zigzag en tubo inclinado en los medios para hongos suministrados.

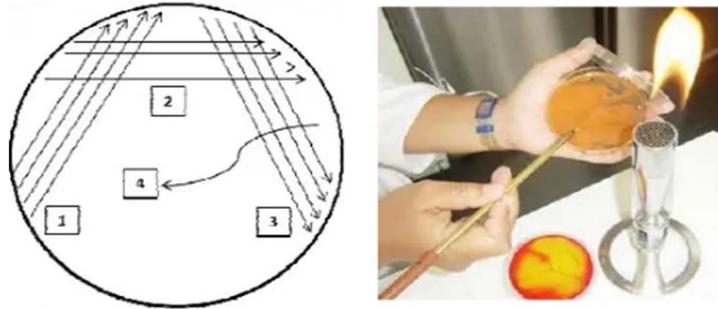


Imagen A1.3: Esquema de siembra de estrias por agotamiento, proceso de siembra Fuente: (Rodríguez, F (2010). Prácticas de Microbiología. Licenciatura de Farmacia. UniversidadMiguel Hernández.)

SIEMBRA DE HONGOS MICELIALES

SIEMBRA POR PUNCIÓN CENTRAL.

Este es un procedimiento para aislar fácilmente hongos miceliales. Seleccione un tipo de hongo con las características de tipo micelial, evite escoger una colonia que este sobrelapada con otra para asílograr un cultivo puro.

Usando un **asa recta gruesa**, previamente calentada en la llama del mechero y enfriada posteriormente en el borde de la caja o en el tubo del cultivo de hongo suministrado, tome una muestra del hongo cortando con el asa un trozo (3 x 3mm) con todo y agar. Coloque el trozo del hongo en el centro de un medio de cultivo en caja de Petri con agar para hongos Cierre la caja, caliente nuevamente el asa en la llama del mechero para eliminar residuos de hongo y aliste la caja para incubación (25° C por 8 días). Una vez incubada evalúe la técnica y pureza de la siembra.3.2. SIEMBRA POR PUNCIÓN CENTRAL EN TUBO INCLINADO Este es un procedimiento apropiado para mantener cepas de microorganismos al ocupar poco espacio.



Imagen A1.4: Esquema de siembra por punción central en tubo inclinado.Fuente: (Rodríguez, F (2010). Prácticas de Microbiología. Licenciatura de Farmacia. UniversidadMiguel Hernández.)

Seleccione un tipo de hongo con las características de tipo micelial, evite escoger una colonia que este sobre la pada con otra para así lograr un cultivo puro.

Usando un **asa recta gruesa**, previamente calentada en la llama del mechero y enfriada posteriormente en el borde de la caja o en el tubo del cultivo de hongo suministrado, tome una muestra del hongo cortando con el asa un trozo (3 x 3mm) con todo y agar.

Coloque el trozo del hongo en el centro de la parte plana del tubo inclinado.

Tape el tubo, caliente nuevamente el asa en la llama del mechero para eliminar residuos de bacterias y alístelo para incubación (25° C por 8 días). Una vez incubada evalúe la técnica y pureza de la siembra.

TÉCNICA DE MICROCULTIVO

1. Se corta un pequeño bloque de agar dextrosa papa o agar harina de maíz previamente vertido en una caja de Petri hasta una profundidad de 4 mm. Esto puede hacerse usando una hoja de bisturí estéril o una espátula con un borde cortante o un tubo de prueba recto estéril.
2. Sobre una segunda caja de Petri estéril se coloca un papel de filtro y dos palitos cortados de un tamaño tal como para encajar en la caja y sobre los mismos se coloca un portaobjetos estéril.
3. Con ayuda de un gancho o un porta estéril se coloca el bloque de agar en la superficie del portaobjeto.
4. Con el gancho estéril se remueven porciones pequeñas de la colonia de hongos que se desea estudiar y se inoculan los cuatro cuadrantes del bloque de agar.
5. Luego de la inoculación, se coloca un cubreobjetos estéril sobre la superficie del agar.
6. Los discos de papel de filtro en el fondo de la caja se mantienen húmedos con agua estéril durante el período de incubación.
7. La colonia crecerá por debajo de la superficie del cubreobjetos. Se examina el montaje periódicamente a simple vista para determinar si la colonia ha madurado. Cuando es evidente un crecimiento suficiente, se retira cuidadosamente el cubreobjeto con pinzas estériles y se coloca en un portaobjetos con lactofenol.

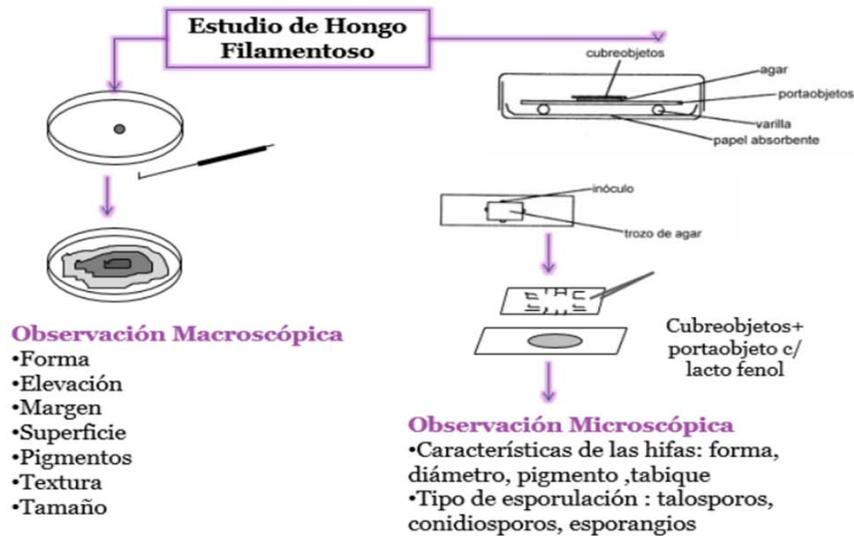


Imagen A1.5: Siembra de Microcultivo

<http://www.fc.n.unp.edu.ar/sitio/microambiental/wp-content/uploads/2016/08/TP-8-Micología.pdf>

BIBLIOGRAFIA

- Forbes B, Sahm D, Weissfeld A. (2009). Diagnóstico Microbiológico de Bailey & Scott.ed. Editorial Panamericana S.A. Argentina.
- Herrera D, López P, Duque J, Pérez L, Golding R, Hernández C. Asas metálicas calibradas para microbiólogos: Una alternativa de fabricación nacional. Soc. Ven. Microbiol.2010; 30 (1): 37-42. Disponible en: ve.scielo.org
- Koneman E, Allen S, Janda W, Schreckenberger P, Winn W. (2004). Diagnóstico Microbiológico. Editorial Panamericana S.A. Argentina.
- Madigan, M ; Martinko, J & Parker, J. (2004). Brock: Biología de los Microorganismos ed. Prentice Hall.
- Pitt JI, & Hocking AD. (1997). Fungi and Food Spoilage. 2º ed. Blackie Academic & Professional, London.
- Prácticas de Microbiología. Licenciatura de Farmacia. Universidad Miguel Hernández. Páginas 18 – 19
- Rojas A, Pardo-Novoa J, Río R, Gómez-Hurtado M, Limón D, Luna F, et al. Determinación del efecto analgésico del extracto hexánico de flores de *Eupatorium arsenei* en un modelo de dolor agudo en rata. mex. cienc. farm. 2015; 46 (1): 64-69. Disponible en: scielo.org

ANEXO 2:**TINCIONES:****TINCIONES COMUNES****AZUL DE ALGODÓN DE LACTOFENOL (LF-AA)**

Para observación de estructuras microscópicas en los disgregados de los cultivos fúngicos

Solución de LF-AA Cristales de fenol.

20 g Ácido láctico

20 mL Glicerina

40 mL Agua destilada (AD)

20 mL Azul de algodón (solución acuosa al 1%) 2 mL

- Agregar el ácido láctico y la glicerina al agua destilada y mezclar.
- Agregar los cristales de fenol y mezclar. Calentar suavemente en baño María (BM) con frecuente agitación hasta disolución completa de los cristales de fenol.
- Agregar 2 mL de una solución acuosa al 1% de azul de algodón (azul de Poirrier) y mezclar bien.

SOLUCIÓN DE KOH AL 30 % EN GLICEROL

Para observación de preparados en fresco del material clínico.

Solución de KOH 30% KOH 30 g

Glicerol 20 mL

Agua destilada 80 mL

La adición de glicerol al 20% impide el rápido desecamiento del fluido en el portaobjetos y permite la observación microscópica del preparado por períodos superiores a 48 Hr

SOLUCIÓN DE AZUL DE METILENO AL 1%

Solución de azul de metileno al 1%

Azul de Metileno 1 g

AD c.s.p. 100 mL

TINCIÓN PLATA METANAMINA DE GROCOTT (GMS):

La metenamina Método de plata Grocott Gomori se utiliza para demostrar hongos. Las paredes celulares de los hongos son ricas en polisacáridos que, cuando se oxida por el ácido crómico, se convierten en aldehídos. Estos grupos reducen directamente los iones de plata de la solución de metenamina de plata a plata metálica. Tiosulfato de sodio se utiliza para fijar la plata metálica y también retirar la plata no reducido.

METODOLOGIA:

Tome secciones al agua

Oxidar en ácido crómico 5% durante 1 hora

Lavar en agua corriente. Bleach en el 1% de metabisulfito de sodio durante 5 minutos

Enjuague en varios cambios de agua destilada

Place en solución incubando pre-calentado (25 ml solución hecha a partir de (3% de hexamina y 10% de nitrato de plata) + H₂O 25 ml + 5 ml bórax Grocott) a 60°C en la oscuridad durante 20 minutos o hasta que los hongos están ennegrecidas y el fondo es claro

Enjuague en varios cambios de agua destilada
 Tione en cloruro de oro 0,2% durante 4 minutos
 Enjuague en agua
 Fijar en el 5% de tiosulfato de sodio durante 5 minutos
 Lave en agua. De contraste en solución de trabajo de color verde claro durante 20 segundos
 Lave en ácido acético al 1%
 Deshidratar, aclarar y montar
RESULTADOS:

Hongos hifas y levaduras Cuerpos - Negro

Antecedentes - verde pálido

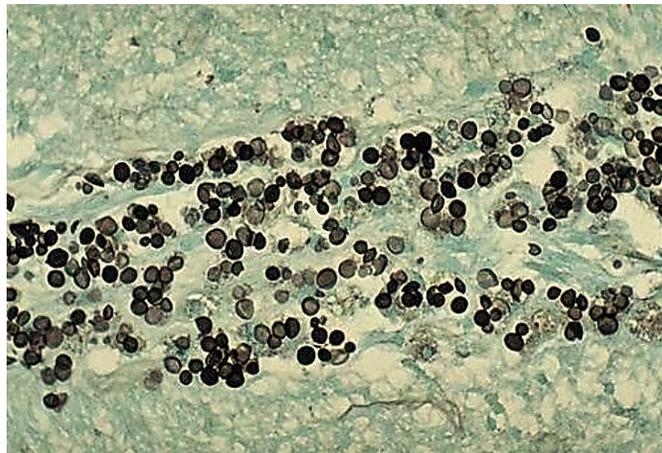


Imagen A2.1: Tinción de GMS de *Cryptococcus neoformans* Fuente: (Histología, Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular . Ross, Pawlina; Edición; MédicaPanamericana).

TINCION DE ACIDO PERYODICO DE SCHIFF (PAS)

Este método de tinción se emplea para detectar polisacáridos en los tejidos, tanto glucógeno como mucopolisacáridos. También es una buena tinción para membranas basales y cartílago. Cualquier fijador es apropiado para esta técnica.

El mecanismo de coloración de la tinción de PAS no sólo por afinidad eléctrica, como los colorantes habituales, sino que es una tinción histoquímica, es decir, se realiza una modificación química del tejido previa a la coloración. Es el ácido peryódico quien lleva a cabo esta reacción.

PROCEDIMIENTO

Partimos de muestras que que han sido fijadas e incluidas en parafina. Estas muestras se han cortado en secciones de unas 8 µm y adheridas a portaobjetos recubiertos con gelatina.

2x10 min en xileno para desparafinar

2x10 min en etanol 100°

10 min en etanol 96°

10 min en etanol 80°

10 min en etanol 50°

5 min en H₂O destilada

Ácido peryódico al 0.5 % durante 5 min

Se oxidan las uniones carbono-carbono de los azúcares para formar grupos aldehídos.

Varios lavados en H₂O destilada

Reactivo de Schiff durante 30 min en oscuridad (el tiempo depende de la temperatura)

Los grupos aldehídos reaccionan con el reactivo de Schiff (ácido sulfuroso con fucsina) resultando en un color rojo fucsia. Las secciones quedan de un color rosado intenso.

Se puede dar un paso con una solución de metabisulfito potásico (o sódico) durante 2 minutos para eliminar los residuos de reactivo de Schiff de la muestra.

5 min en agua corriente

Varios lavados en H₂O destilada

5 min en hematoxilina de Mayer

15 min en agua corriente

20 s en H₂O destilada

5 min en etanol 80°

5 min en etanol 96°

2x10 min en etanol 100°

2x10 min en xileno

Montado con medio de montaje

RESULTADOS

Glúcidos: rosa intenso a fucsia

Núcleos: azul oscuro (en realidad se tiñe sólo la cromatina)

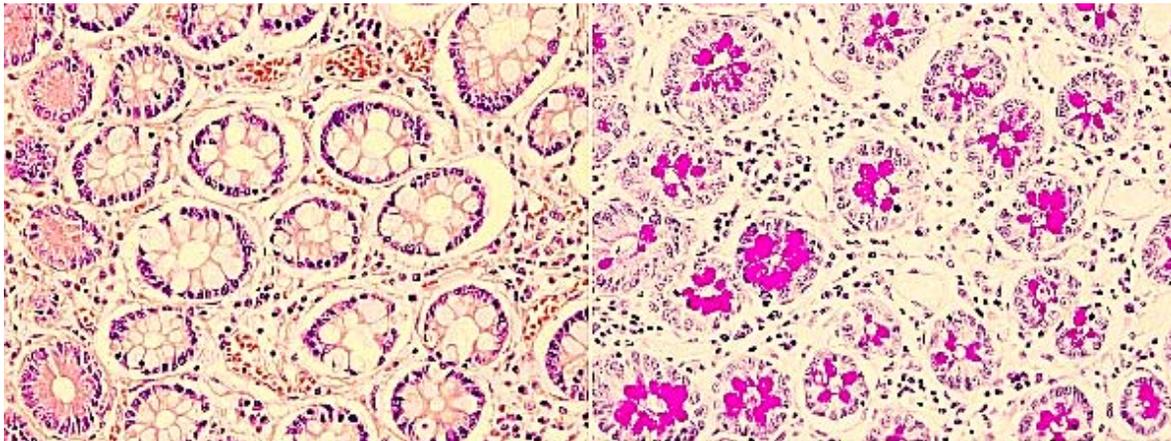


Imagen A2.2: Secciones de parafina de 8 μ m de grosor teñidas con hematoxilina y eosina (A) y con PAS y hematoxilina (B). Las secciones pertenecen a campos similares del digestivo. La tinción de fucsia corresponde al reactivo de Schiff, el cual marca mucopolisacáridos de las células caliciformes. Fuente: Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Facultad de Biología. Universidad de Vigo. España)

TINCIÓN DE GIEMSA:

FUNDAMENTOS:

Las técnicas en que se basan las tinciones hematológicas hacen uso de colorantes. Éstos interactúan con los componentes celulares dispuestos a modo de frotis sanguíneo sobre un portaobjetos. Los colorantes son sustancias capaces de fijarse selectivamente según su afinidad química.

Un colorante tipo Romanowsky está basado en el uso de una mezcla formada por un colorante ácido (eosina) y uno o varios colorantes básicos (azul de metileno, azur A, azur B y azur C). Las tinciones que se realizan con este tipo de colorante se denominan tinciones panópticas o tinciones tipo Romanowsky.

La tinción de Giemsa está catalogada como tinción tipo Romanowsky. Del mismo modo que su colorante, que da nombre a la tinción, está catalogado también como colorante tipo Romanowsky. El colorante de Giemsa es una solución en metanol de un colorante ácido (eosina) y dos colorantes básicos (azur y azul de metileno). Estos colorantes teñirán las estructuras celulares dependiendo de su carácter ácido o básico.

Procedimiento:

Llenar de agua la cubeta para que los colorantes no se peguen al fondo.

Colocar las varillas paralelas sobre los bordes de la cubeta.

Colocar las extensiones sanguíneas sobre las varillas paralelas.

Cubrir las extensiones con metanol y esperar 4-5 minutos.

Decantar para eliminar el metanol.

Cubrir las extensiones con solución extemporánea de Giemsa recién diluída a 1/10 (1 gota de Giemsa por 9 gotas de agua destilada) y dejar actuar durante 25 minutos.

Lavar las extensiones con agua destilada para eliminar los restos de colorante.

Secar las extensiones al aire, colocas en vertical.

Observar los frotis sanguíneos teñidos al microscopio óptico.

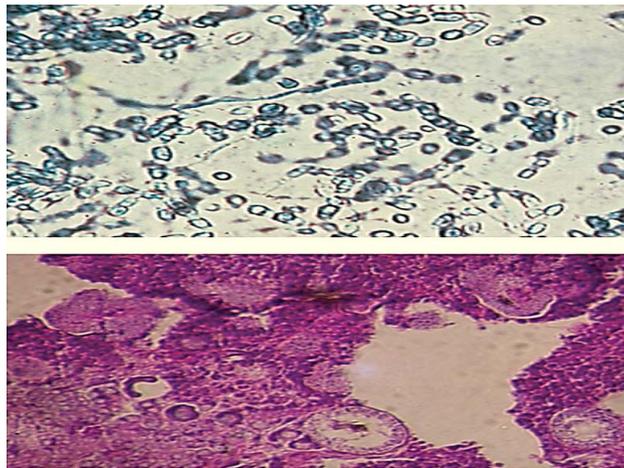


Imagen A2.3: Dermatofitosis con Giemsa. Fuente: (Jawetz 2014)

TINCIÓN DE ZIEHL-NEELSEN (BAAR)

La técnica de tinción de Ziehl-Neelsen se basa en el trabajo de cinco personas; Koch, Ehrlich, Ziehl, Rindfleisch y Neelsen, pero se conoce popularmente como la tinción de “Ziehl-Neelsen” (Giri D.2016). La tinción de Ziehl-Neelsen es usada para evidenciar la presencia de bacterias alcohol-ácido resistente, que por lo general se lo realiza en muestras de expectoración, pero también se lo hace en muestras de diferentes tejidos. La tinción es muy importante en el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar y de otras enfermedades producidas por bacterias ácido resistentes como la lepra (Ramos Jiménez, 2012).

REACTIVOS:

Los reactivos necesarios usados en la tinción Ziehl-Neelsen se basan en el manual del “AFIP”, utilizado en el laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital de Especialidades Eugenio Espejo. (2015)

Carbol fucsina de Ziehl-Neelsen

Solución de alcohol ácido al 1%

Solución matriz de azul de metileno

Solución azul de metileno (solución diaria de trabajo) (Instituto de Patología de las Fuerza Armadas de los Estados Unidos de América, 1995).

TÉCNICA:

El procedimiento para realizar la tinción Ziehl-Neelsen se basa en el manual del “AFIP”, utilizado en el laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital de Especialidades Eugenio Espejo. (2015)

Realizar la desparafinización y luego hidratar hasta llegar al agua destilada.

Teñir las placas con la solución fresca de carbol fucsina, durante unos 30 minutos.

Después lavar bien con agua corriente

Provocar la decoloración con la solución de alcohol ácido al 1% hasta que las secciones de tejido presenten un color rosado pálido.

Lavar bien con agua corriente durante unos 8 minutos.

Realizar la contrastación sumergiendo una placa a laves en la solución diaria de azul de metileno.

Estas secciones deben ser de color azul pálido, ya que el exceso de contraste puede ocultar los bacilos.

Lavar con agua corriente y después con agua destilada.

Realizar una deshidratación rápido con alcohol etílico del 95% y alcohol etílico absoluto, realizar 2 cambios cada uno y aclarar con xileno de igual forma por 2 minutos cada uno.

Finalmente se realiza el montaje con un medio resinoso y laminilla cubreobjetos (Instituto de Patología de las Fuerza Armadas de los Estados Unidos de América, 1995).

RESULTADOS:

Los resultados de la Tinción Ziehl-Neelsen son basados en la descripción del “AFIP”, utilizada en el del laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital de Especialidades Eugenio Espejo. (2015)

Bacilos alcohol-ácido resistentes.....	rojo brillante
Eritrocitos.....	amarillo-anaranjado
Otros elementos tisulares.....	azul

(Instituto de Patología de las Fuerza Armadas de los Estados Unidos de América, 1995, pág. 225).

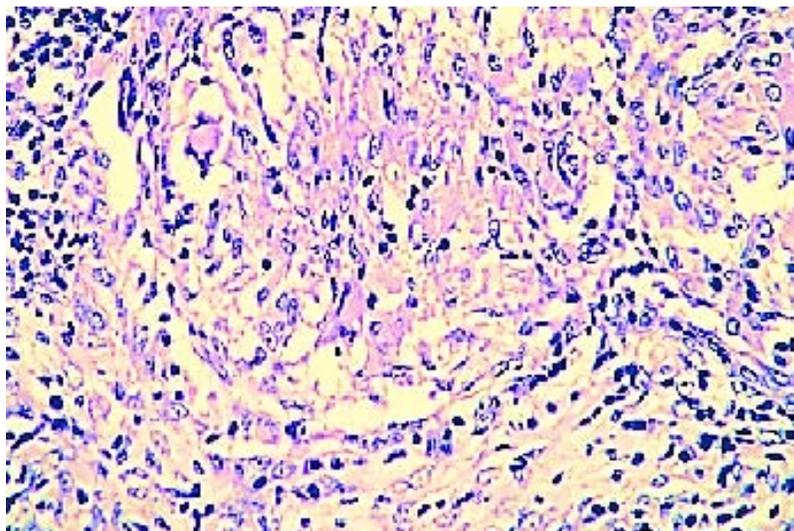


Imagen A2.5: Tinción de Ziehl-Neelsen modificado, 40X. Negativa para BAAR. Se inició manejo antifúngico con anfotericina B más flucitosina con un diagnóstico definitivo de criptococosis diseminada con insuficiencia pulmonar y adrenal. Fuente: (Salcedo, Juan & Vera, Christian & Jaramillo, Luis. (2015). Cryptococcosis: a cause of adrenal insufficiency. A case report and literature review. Universitas Médica. 56.)

TINCIÓN DE BLANCO DE CALCOFLUOR:

La técnica quimiofluorescente es útil para la detección de microsporidias como *Acanthamoeba* spp., *Pneumocystis jiroveci* (antes *Pneumocystis carinii*) y *Dirofilaria* spp. Los agentes quimiofluorescentes como calcofluor, Fungi-Fluor ó Uvitex 2B, conocidos como agentes luminiscentes ópticos, son agentes de tamizado rápidos y económico. Estos agentes son sensibles pero no específicos ya que hacen fluorescer objetos y organismos que no son parasitarios. Esta prueba debe ser una herramienta de tamizaje rápida y no utilizarse para la identificación de especies.

ESPECÍMEN:

Prepare un frotis delgado utilizando aproximadamente 10 µl de heces frescas o conservadas en un portaobjetos de vidrio. Los especímenes pueden incluir heces, orina, cultivos u otros tipos de muestras. Se fijan por calor en una platina a 60°C hasta que la muestra este completamente seca (de 5 a 10 minutos).

REACTIVOS

Se requieren las siguientes soluciones para los dos pasos del procedimiento:

Metanol absoluto

Reactivo blanco calcofluor al 0.01%: Prepare una solución salina amortiguada con Tris 0.1M al con 0.01% pH de 7.2

PROCEDIMIENTO

Prepare un frotis delgado de heces, cultivo u otros materiales muestreados.

Fije el frotis con metanol por 30 segundos.

Tiña con el reactivo blanco calcofluor al 0.01% por 1 minuto.

Enjuague con agua destilada y deje que el frotis seque.

Monte con un cubreobjetos de grosor #1.

Examine con un microscopio equipado con epifluorescencia con un filtro azul violeta con una longitud de onda de 400 nm o menos.

Para buscar microsporidias, examine el frotis con un objetivo de aceite de inmersión de 50× ó 100×. Las esporas de microsporidias fluorescerán con un color blanco azulado brillante sobre un fondo negro.

CONTROL DE CALIDAD

Se debe incluir en cada corrida una laminilla testigo de microsporidia conservada en formol al 10%.

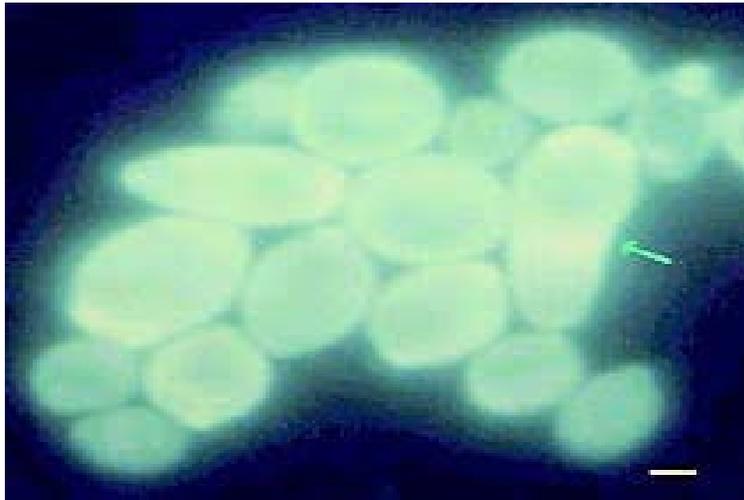


Imagen A2.4: tinción de Blanco de Calcofluor Fuente: (Pemán J, Martín-Mazuelos E, Rubio Calvo (2007) Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica Revista Iberoamericana de Micología ISBN: 978-84-611-8776-8)

Bibliografía:

- Fundamento de la tinción con Azul de Coomassie y con Plata (Consultado en: academia.edu/12280062/Fundamento_de_la_tinci%C3%B3n_con_Azul_de_Coomassie_y_con_plata)
- Fundamentos de psicobiología libro de prácticas I (Consultado en: books.google.com.mx/books?id=yigxYitcboC&pg=PA54&dq=tincion+de+luxol+fast+blue&hl=es-419&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=tincion%20de%20luxol%20fast%20blue&f=false)
- López J, Hernández D, Colín C, et al. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología Investigación en Discapacidad, 2014, Medigraphic. (Consultado en: medigraphic.com/pdfs/invis/ir-2014/ir141b.pdf)
- López-Medrano R, Ovejero M, Calera J et al (1995) An immunodominant 90-kilodalton *Aspergillus fumigatus* antigen is the subunit of a catalase. *Infect Immun*; 63: 4774-4780 [En línea] recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC173684/>

- Neuville S, Lortholary O, Dromer F (2000) Do kinetics of the humoral response to *Cryptococcus neoformans* proteins during murine cryptococosis reflect outcome?. *Infect Immun*; 68: 3724-3726.[En línea] recuperado de doi: 10.1128/iai.68.6.3724-3726.2000
- Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E et al (2004) β -D Glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff, development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Clin Infect Dis*; 39:199-205 [En línea] recuperado de DOI: 10.1086/421944
- Pazos C, Moragues M, Quindós G, et al (2006) Diagnostic potential of the (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan and the anti *Candida albicans* germ tube antibodies for the diagnosis and therapeutic monitoring of invasive candidiasis in neutropenic adult patients. *Rev Iberoam Micol*; 23: 209-215.1 [En línea] recuperado de DOI: 10.1016/s1130-1406(06)70046-8
- Pontón J, Moragues MD, Quindós G. (2004) Diagnóstico de la candidiasis invasora detectando anticuerpos anti-micelio. Bilbao, Revista Iberoamericana de Micología,. ISBN: 84-609-2611-7.
- Ross, Pawlina; *Histología, Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular* (2013) Mexico ed. Médica Panamericana.

ANEXO 4:**MEDIOS DE CULTIVO****AGARES PARA SIEMBRA MICOLOGICA**

La mayoría de los hongos son nutricionalmente poco exigentes y desarrollan en medios sencillos que contengan medios sencillos que contengan hidratos de carbono como fuente de carbono (glucosa, maltosa, sacarosa, almidón, celulosa), sales de nitrógeno inorgánico o peptonas, como fuente de nitrógeno y pequeñas cantidades de oligoelementos (Fe, Mg, P, K, Zn, Cu, Mn y Mo). Hay tres tipos generales de medios de cultivo para hongos.

1. Medios Naturales: Trozos o infusiones de frutas, vegetales, granos de cereales o tejidos animales. Varían mucho en su composición y no son reproducibles. Tampoco son de amplio uso.
2. Medios Semisintéticos: Extractos de plantas, peptonas, agar y otros compuestos son de amplio uso.
3. Medios Sintéticos: Composición química definida. Tal vez el más conocido y utilizado de estos medios es el Agar Sabouraud cuya descripción se realiza a continuación.

AGAR GLUCOSADO SABOURAUD

Este medio puede ser utilizado para el aislamiento, identificación y conservación de hongos saprófitos y patógenos. Es un medio nutritivo cuya alta concentración de glucosa y el pH ácido actúan inhibiendo el desarrollo bacteriano. El agregado de antibióticos aumenta la selectividad del medio y permite eliminar bacterias y hongos saprófitos indeseables a partir de muestras contaminadas. Los antibióticos que frecuentemente son utilizados son estreptomycin (100 ug/Lt), cloranfenicol (500 mg/Lt) y cicloheximida (0.5 mg/Lt) los cuales son agregados al medio de cultivo ya estéril y fundido a 45-50°C. Algunos cultivos no esporulan ni producen pigmento en agar de Sabouraud. Para favorecer esto, han resultado útiles los medios especiales, como el agar con papa y dextrosa, el agar con papa y zanahoria, el agar con harina de maíz, agar arroz, o agar de Sabouraud con el agregado de tiamina e inositol.

AGAR CON PAPA Y DEXTROSA

Hervir las papas en agua durante 15 minutos, filtrar a través de un algodón, y reponer el volumen con agua. Agregar los ingredientes secos y disolver el agar por medio del calor. No es necesario ajustar el pH. Distribuir en forma conveniente y autoclavar. Se emplea este agar para estimular la producción de esporos.

AGAR CON PAPAS Y ZANAHORIAS

Lavar las papas y las zanahorias, aplastarlas y colocarlas en agua destilada durante una hora. Hervir durante 5', filtrar por papel de filtro, reconstituir el volumen a 1l y agregar 15 g de agar y 5 ml de Tween 80. Autoclavar y distribuir. Este medio es excelente para demostrar las características de color de las colonias de hongos. Estudios morfológicos de los hongos filamentosos El reconocimiento de mohos o hongos filamentosos se basa en el estudio macroscópico y microscópico de las colonias.

AUXONOGRAMA DEL CARBONO EN PLACA (ASIMILACIÓN DE CARBOHIDRATOS)

Medio base: se usa como soporte de los discos de azúcares y para observar el crecimiento de las levaduras para su posterior identificación.

Pesar:

Extracto de levadura 0,67 g

Agar noble 20 g

Agua destilada 1000 mL

Disolver los ingredientes en agua destilada.

Poner en ebullición por un minuto.

Autoclavar a 121°C por 15 minutos.

Conservar en refrigeración a 4°C.

Discos de azúcares para el auxonograma del carbono

Discos de papel filtro estéril de 5 mm de diámetro.

Carbohidratos (glucosa, lactosa, sacarosa, maltosa, galactosa y rafinosa); 20 g de cada uno.

Agua destilada 100 mL por carbohidratos.

Procedimiento

Disolver cada tipo de azúcar en 100 mL de agua.

Esterilizar por filtración.

Sumergir en las distintas soluciones de azúcares durante 24 horas.

Colocar los discos de papel en una placa Petri y colocar en estufa a 37°C por 24 horas.

Guardar los discos en un frasco estéril de boca ancha.

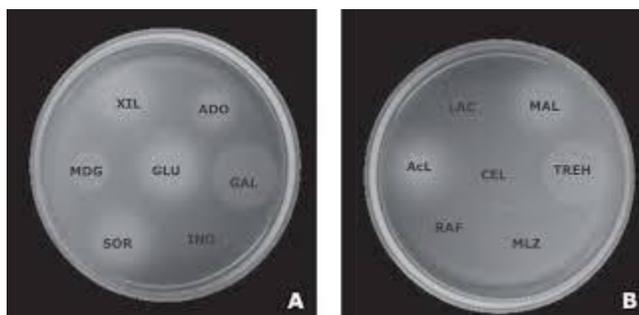


Imagen A3.1: Auxonograma A: GLU-glucosa (+), XIL- xilosa (+), ADO-adonitol (+), GAL-galactosa (+), INO-inositol (-), SOR-sorbitol (+), MDG-metil alfa-D-glucopiranosido (+). B: CEL-celobiosa (-), LAC-lactosa (-), MAL-maltosa (+), TREH-trehalosa(+), MLZ-melecitosa (-), RAF-rafinosa(-) y AcL-ácido láctico (+); +: respuesta positiva; -: respuesta negativa. Fuente: (Lobaina Rodríguez T, Zhurbenko R, Rodríguez Martínez C, et al (2010) Identificación de especies de Candida de importancia clínica con un método auxonograma modificado REV CUBANA MED TROP;62(1):48-57[En línea] recuperado de <http://scielo.sld.cu/pdf/mtr/v62n1/mtr08110.pdf>)

AGAR ACEITE DE OLIVA

Pesar:

Agar Sabouraud dextrosa 6,5 g

Tween 80 2 mL

Aceite de oliva 2 mL

Vitamina A 10 gotas

Cloramfenicol 0,5 g

Agua destilada 100 mL

Disolver el agar Sabouraud dextrosa en agua destilada.

Agregar los demás ingredientes.

Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Almacenar a 4°C.

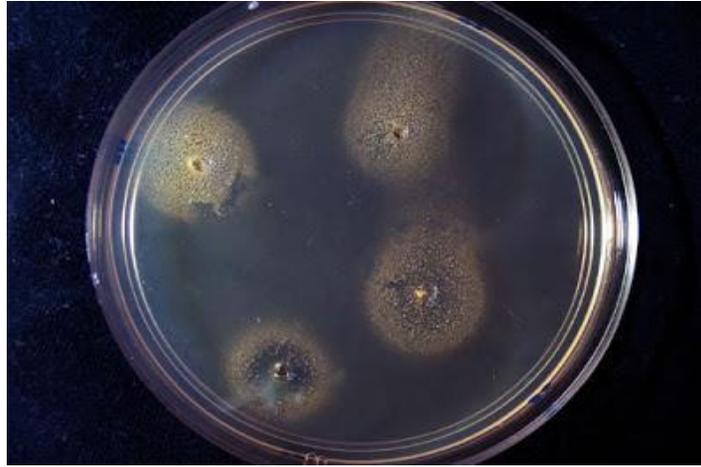


Imagen A3.2: Agar aceite de oliva Fuente: (Guelfand L, Grisolia P, Bozzano C, Kaufman S. (2003) Comparison of methods for the identification of the most common yeasts in the clinical microbiology laboratory. *Rev Argent Microbiol.*;35:49-53 [En línea] recuperado de <https://doi.org/10.1590/S0036-46652006000600002>

AGAR DE DIXON MODIFICADO

Pesar:

Extracto de Malta 36 g

Peptona 6 g

Agar 12 g

Buey de bilis disecada 20 g

Tween 40 10 mL

Monooleato de glicerol 2 mL

Acido oleico 2 mL

Agua destilada 1000 mL

Disolver los ingredientes por 15 minutos en un poco de agua.

Agregar el volumen restante y ebulir.

Autoclavar a 121°C por 15 minutos.

Repartir en tubos de vidrio estériles en posición de plano inclinado.



Imagen A3.3: Crecimiento de *Malassezia* spp en medio Dixon modificado Fuente: (Bejar V, Rojas C, Guevara G, et al (2014) Identificación de especies de *Malassezia* aisladas de piel sana en pobladores de Lima, Perú An. Fac. med. vol.75 no.2 [En línea] recuperado de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832014000200014)

CALDO SABOURAUD

Triptona	15,0 g
Peptona de soja	5,0 g
L-Cystina	0,7 g
Cloruro Sódico	4,0 g
Sulfito sódico	0,2 g
Glucosa	5,5 g
Lecitina de huevo	1,0 g
Octoxynol 9	1,0 g
(Fórmula en g/l)	pH: 7,0 ± 0,2

PREPARACIÓN

Disolver 31,4 g en 1 litro de agua bidestilada que contenga 5 ml de Polisorbato-Tween 80 atemperado, calentando en agitación hasta ebullición al menos 30 minutos hasta obtener una dispersión homogénea. Autoclavar 15 minutos a 121 °C. No sobrecalentar.



Imagen A3.4 : Izq Caldo sin Inocular Der. Caldo inoculado Fuente: (Arenas 2014)

AGAR ARROZ

Pesar:

Arroz 200 g

Agar 15 g

Agua destilada 1000 mL

Hervir el arroz durante 30 minutos.

Filtrar con gasa.

Completar al volumen final.

Agregar el agar.

Autoclavar a 121°C por 15 minutos.

Repartir en placa Petri estéril.

Conservar en refrigeración a 4°C.



Imagen A3.5: Agar Harina de Arroz en tubo y en placa Fuente: (Arenas 2014)

AGAR HARINA DE MAÍZ

Se utiliza para la producción de pseudohifas de levaduras del género *Candida* y producción de clamidoconidios de *C. albicans*.

Composición:

Harina de maíz 62,5 g

Agua destilada 1500 mL

Tween 80 15 g

Agar 19 mL

Procedimiento:

Disolver la harina de maíz en el agua destilada.

Dejar reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos.

Filtrar a través de papel filtro y reconstituir el anterior volumen.

Añadir el agar.

Añadir el tween 80,

Esterilizar a 120°C durante 20 minutos.



Imagen A3.6: Siembra de *C. albicans* en Agar Corn meal y producción de clamidoconidias Fuente: (Arenas 2014)

AGAR PAPA DEXTROSA

Permite la observación de las levaduras a diferentes temperaturas.

Pesar:

Papa 200 g

Dextrosa 10 g

Agar 20 g

Agua destilada 1000 mL

Pelar y cortar la papa en trozos pequeños.

Disolver la dextrosa en agua y agregar los demás ingredientes. Hervir 30 minutos y filtrar con gasa.

Completar el volumen.

Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Repartir.

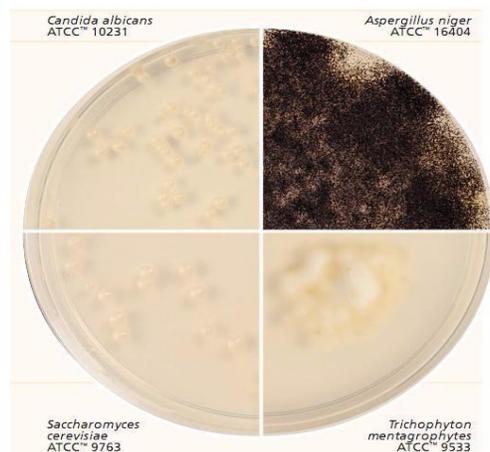


Imagen A3.6: Agar Papa Dextrosa Fuente: (Forbes B, Sahn D, Weissfeld A. (2009). Diagnóstico Microbiológico de Bailey & Scott. 12 ed. Editorial Panamericana S.A. Argentina.)

AGAR MICOSEL O MICOBIÓTICO

Permite distinguir la susceptibilidad a la cicloheximida o actidione.

Seguir las indicaciones proporcionadas por el fabricante.

Autoclavar a 121°C por 15 minutos.

Dispensar en tubo de vidrio estéril y colocar en forma de plano inclinado.

Almacenar a 4°C.



Imagen A3.7: 1) Crecimiento en Agar Papa Dextrosa, 2) Crecimiento en Agar Dextrosa Sabouraud, 3) Crecimiento en Agar Micozel
Fuente: (Forbes B, Sahm D, Weissfeld A. (2009). Diagnóstico Microbiológico de Bailey & Scott. 12 ed. Editorial Panamericana S.A. Argentina.)

AGAR CZAPEK – DOX

Se emplea para la identificación de *Aspergillus spp* y *Penicillium Spp*.

Pesar:

Sacarosa 30 g

Nitrato de sodio 2 g

Fosfato dipotásico 1 g

Sulfato de magnesio 0.5 g

Cloruro de potasio 0.5 g

Sulfato ferroso 10 mg

Agar 15 g

Agua destilada 1000 mL

Disolver por calor todos los ingredientes.

Colocar en ebullición por diez minutos.

Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Envasar.



Imagen A3.8: Agar Czapek Dox Fuente: (duchefa-biochemie)

AGAR SEMILLA DE GIRASOL (AGAR DE STAIB O AGAR NIGER SEED)

El medio de cultivo contiene ácido cafeico contenido en el extracto de la semilla de girasol (*Guizzotia abbinica*) que permite detectar la enzima fenol oxidasa desarrollada por *Cryptococcus neoformans*. La reacción enzimática produce melanina, la cual es absorbida por la pared celular del hongo produciendo un color marrón.

Pesar:

Glucosa 1,0 g

Creatina 0,78 g

Agar 18,0 g

Cloramfenicol 0,05 g

Extracto de semilla de girasol 350 mL

Calentar hasta disolver. Distribuir 50 – 100 mL por frasco.

Autoclavar a 121°C por 15 minutos.

La preparación del extracto consiste en Pulverizar las semillas de girasol.

Pesar 70 g del pulverizado y suspenderlo en 350 mL de agua destilada. Hervir. Filtrar con gasa.

Autoclavar 15 minutos a 121°C. Mantener en refrigeración con cierre hermético.

En el momento de usar, fundir el medio y plaquear. Emplear un control positivo de *Cryptococcus neoformans*, el cual desarrollará una pigmentación marrón y un control negativo de *Candida spp.* que desarrollará de color blanco.



Imagen A3.9: Cultivo mixto de *Cryptococcus neoformans* y *Candida albicans* en medio Semilla de Girasol Fuente: (Forbes B, Sahn D, Weissfeld A. (2009). Diagnóstico Microbiológico de Bailey & Scott. 12 ed. Editorial Panamericana S.A. Argentina.)

AGAR SABOURAUD DEXTROSA

Se le emplea para el aislamiento primario, identificación y mantenimiento de la mayoría de los hongos patógenos. Para mejorar la inhibición bacteriana se puede adicionar cloramfenicol 0,5 g/L.

Pesar:

Peptona 10 g

Glucosa 20 g

Agar 20 g

Agua destilada 1000 mL

Disolver los ingredientes en el agua destilada.

Controlar el pH a 5,6.

Esterilizar a 121 °C por 15 minutos.

Verter en tubos o placas.

MEDIO BASE PARA AZÚCARES

Se emplea para proporcionar los requerimientos nutricionales para el desarrollo de levaduras.

MEDIO BASE

Pesar:

Peptona 5 g

Extracto de carne 1 g

Cloruro de sodio 5 g

Agar 15 g

Agua destilada 990 mL

Púrpura de bromocresol 10 mL

Disolver y autoclavar.

El pH final es de 5,6.

INDICADOR

Pesar:

Púrpura de bromocresol 0,1 g

Hidróxido de sodio 0,01 N 18,5 mL

Diluir a 250 mL con agua destilada obteniendo una concentración al 0,04%.

AZÚCARES

Pesar 10 g de cada uno de los siguientes azúcares: glucosa, lactosa, sacarosa, galactosa, maltosa y rafinosa.

Disolver en agua destilada estéril y esterilizar por filtración (diámetro del filtro 0,2 µm)

Concentración final de cada azúcar: 10%. Mezclar cada azúcar con el medio base que se encuentra a 45– 50°C. Repartir en tubos de vidrio con tapa rosca. Controlar a 37°C por 24 horas.

AGAR INFUSIÓN CEREBRO CORAZÓN

Este medio de cultivo favorece la conversión de algunos hongos dimórficos.

Fundamento

Es un medio de cultivo nutritivo para aislar microorganismos moderadamente exigentes, pudiéndose aumentar su enriquecimiento con la adición de sangre y otros suplementos nutritivos. Es un medio de cultivo no selectivo, por tanto permite el crecimiento de la mayoría de las bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como también de algunos hongos. Sin embargo, se puede convertir en selectivo con la adición de antibióticos.

El medio contiene infusión de cerebro y corazón de ternera, hidrolizado péptico de tejidos animales e hidrolizado pancreático de caseína; todos estos compuestos actúan como fuentes de vitaminas, aminoácidos, nitrógeno y carbono.

La glucosa es un carbohidrato que proporciona energía a los microorganismos una vez que estos lo han fermentado. En tanto que, el cloruro sódico y el fosfato disódico mantienen el equilibrio osmótico y proporcionan un pH cercano a la neutralidad. Finalmente, el agar da la consistencia sólida al medio.

Preparación

Pesar 52 gramos del medio deshidratado y disolver en un litro de agua destilada. Llevar la mezcla a una fuente de calor hasta hervir, agitando frecuentemente durante el proceso de disolución.

Se pueden preparar cuñas o placas de agar BHI sin aditivos.

Cuñas

Para la preparación de cuñas servir la preparación hasta rellenar la mitad de cada tubo, tapar y esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos, al salir acostar sobre una base hasta que solidifiquen. Posteriormente guardar en nevera hasta su uso.

Placas

La mezcla disuelta se autoclava a 121°C por 15 minutos, al salir se deja enfriar hasta 50°C y se sirven 20 mL del medio en placas de Petri estériles. Se dejan solidificar, se invierten y se guardan en nevera hasta su uso. Dejar que las placas tomen temperatura ambiente antes de sembrar.

El pH del medio debe quedar en $7,4 \pm 0,2$.

El medio sin preparar es de color beige y preparado es de color ámbar claro.

AGAR UREA

Permite evidenciar la producción de ureasa por *Cryptococcus neoformans*, algunas especies de *Candida sp.* *Rodotorula spp.* y *Trichosporon spp.*

Pesar:

Dextrosa 1 g

Peptona 1 g

Cloruro de sodio 5 g

Monofosfato de potasio 2 g

Urea 20 g

Agar 15 g

Rojo fenol 12 mg

Agua destilada 1000 mL

Disolver la urea en 100 mL de agua destilada y esterilizar por filtración.

Disolver los ingredientes restantes en 900 mL de agua destilada.

Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Enfriar hasta unos 45– 50°C.

Agregar la solución de urea en un área estéril.

AGAR UREA DE CHRISTENSEN MODIFICADO POR PHILPOT (PARA DIFERENCIACIÓN DE DERMATOFITOS)

Peptona 1 g

Cloruro de sodio 5 g

Glucosa 5 g

Fosfato ácido de potasio 2 g

Urea 20 g

Rojo de fenol al 0,2% 5 mL

Agar 20 g

Agua destilada c.s.p. 1000 mL

Preparar la solución de Rojo de fenol disolviendo 0,2 g del indicador en 100 mL de etanol 50%.

Disolver todos los componentes, excepto el agar, en 100 mL de agua destilada y esterilizar por filtración.

Ajustar el pH a 6,8.

Disolver 20 gramos de agar en 900 mL de agua destilada y esterilizar a 121°C 15 minutos.

Enfriar el agar 55- 60 °C y agregarle la primera solución.

Mezclar y distribuir estérilmente a razón de tres ml por tubo 13 x 100 mm con tapa a rosca

Técnica: Transferir una pequeña cantidad de micelio de un cultivo de 10 días sobre agar Lactrimel o Sabouraud de la cepa incógnita en el medio de agar urea de Christensen modificado por Philpot.

Incubar a 25-28 °C y leer diariamente hasta el séptimo día, pasado este tiempo pueden observarse falsos positivos. Simultáneamente se deben incubar tres tubos controles: positivo (inoculado con *T. mentagrophytes*), negativo (inoculado con *T. rubrum*) y un tercer tubo sin inocular.

Lectura:

Se interpreta como positiva la aparición de color rojo magenta en el medio de cultivo donde se inoculó la cepa incógnita. Si el color original no se modifica o se torna amarillo la prueba es negativa. Es necesario asegurar la pureza de la cepa en estudio ya que las bacterias pueden producir ureasa Interpretación: La producción de ureasa en 7 días es especialmente útil para diferenciar *T. mentagrophytes* y *T. rubrum* y puede utilizarse además para estudiar aislamientos atípicos de dermatofitos. Con respecto a las cepas mencionadas anteriormente el test tiene una especificidad del 90%, lo que es coincidente con el test de perforación del pelo, de tal modo que usándolos juntos se obtienen buenos resultados.



Imagen A3.10: Urea Fuente: (Arenas 2014)

CRECIMIENTO EN DTM (MEDIO PARA AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN PRESUNTIVA DE DERMATOFITOS)

Sobre este medio se pueden sembrar directamente los materiales provenientes de las lesiones o bien inocular estérilmente, con un pequeño fragmento de la cepa en estudio. Incubar no más de 14 días a 22 - 30 °C. Es conveniente realizar una observación al séptimo día. Este medio utilizado para primo aislamiento permite una mayor recuperación de dermatofitos, sobre todo de muestras provenientes de zonas muy contaminadas como uñas y pie.

Medio para ensayo de dermatofitos (DTM) (Taplin D; 1969)

Phytone (BBL) 10 g

Glucosa 10 g

Agar agar (BBL o Difco) 20 g

Rojo de fenol (solución) 40 mL HCl 0,8 M 6 mL

Cicloheximida (Actidione) 0,5 g

Sulfato de gentamicina 100 ug/ mL

Clortetraciclina 100 ug/mL AD c.s.p. 1.000 mL

Disolver la fitona, la glucosa y el agar en el AD calentando en BM.

Adicionar 40 mL de solución de rojo de fenol agitando bien.

Ajustar el pH del medio agregando 6 mL de HCl 0,8 M, mezclando continuamente.

Disolver 0,5 g de cicloheximida en 2 mL de acetona y agregar a la preparación anterior, mezclar bien.

Disolver el sulfato de gentamicina en 2 mL de AD estéril y agregar a la preparación anterior agitándolo bien.

Llevar a la Autoclave a 118°C durante 10 minutos. Enfriar a 50-55 °C y agregar estérilmente la clortetraciclina disuelta en 25 mL de AD estéril, mezclar y fraccionar estérilmente a razón de 7 mL en tubos de ensayo e inclinar para que se forme el bisel.

El pH final del medio es 5,5 + 0,1 y su color amarillo.

Observaciones: se puede sustituir la gentamicina y la tetraciclina por cloranfenicol, el que se usa a una concentración de 250 mg por litro de medio de cultivo. La ventaja del uso de éste antibiótico es que se puede agregar al medio antes de esterilizarlo. Solución de rojo de fenol

Disolver 0,5 g de Difco Bacto Phenol Red en 15 mL de NaOH 0,1 N y adicionarle 100 mL de AD mezclando bien.

Solución de cloranfenicol Disolver 250 mg de cloranfenicol en 10 mL de alcohol etílico, mezclar bien y agregar al medio de cultivo. Interpretación: Los dermatofitos viran el color del medio del amarillo al rojo debido a la producción de álcalis, mientras que los contaminantes no producen este viraje.

Además, el medio contiene cicloheximida (actidione), que inhibe el crecimiento de muchos mohos no dermatofitos; no obstante, algunos son resistentes a la cicloheximida y además pueden virar el indicador (Ej: *Acremonium*, *Scopulariopsis*, *Verticillium*, etc).

No es un test confirmatorio sino presuntivo, ya que algunos dermatofitos tardan más de 14 días en desarrollar (*T. verrucosum*)

CRECIMIENTO SOBRE GRANOS DE ARROZ (Conant y Col. 1971)

MEDIO DE ARROZ

Arroz blanco 8 g

AD 25 mL

Colocar los granos de arroz y el AD en un Erlenmeyer de 125 mL, o en un tubo 150x20 mm.

Llevar a la autoclave a 120°C durante 15 minutos.

Técnica:

- Inocular un fragmento de la cepa de dermatofito en estudio, en el tubo con el medio de arroz.
- Incubar a 25°C y examinar el crecimiento luego de 10 a 15 días.

Lectura:

El resultado se lee como positivo si hay crecimiento abundante y como negativo si no hay desarrollo o es escaso. Interpretación: Este medio se utiliza para diferenciar aislamientos no esporulados del complejo de especies *M. canis* (da una colonia exuberante) y *M. audouinii* (crece muy poco o no lo hace). También estimula la producción de esporos en muchos *Trichophyton spp.*

PRUEBAS DE REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES

Estas pruebas quedan reservadas para laboratorios de referencia; no obstante, sus resultados son variables y no siempre reproducibles debido a que es muy difícil estandarizar el inóculo. Se utilizan los medios Bacto Trichophyton Agar Difco 1 al 7

PRUEBAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS PRODUCCIÓN DE TUBO GERMINATIVO

Esta prueba es considerada hasta el presente como una la más confiable para identificar presuntivamente a *C. albicans*, tiene una exactitud del 95%-100% cuando se compara con la identificación convencional y permite realizar una identificación rápida.

Técnica:

Hacer una suspensión ligera (100.000 a 1.000.000 de células/mL) de un cultivo de 24 hrs de la cepa en estudio, en 0,5 mL de suero bovino. La suspensión puede hacerse tocando la superficie de una colonia con la punta de una pipeta Pasteur estéril y luego emulsionando suavemente las células adheridas a la pipeta, en el suero. Incubar a 37°C y observar microscópicamente cada media hora, hasta las tres horas. Es necesario inocular simultáneamente un testigo positivo (*C. albicans*) y uno negativo (*C. guilliermondii* u otra).

Interpretación: El tubo germinativo se ve como una proyección filamentosa delgada, que no presenta constricción en el punto de origen.

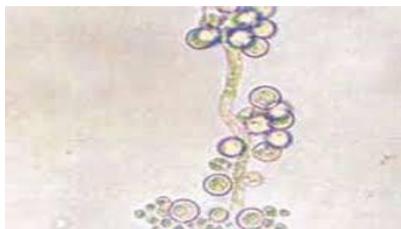


Imagen A3.11: Crecimiento de *Candida albicans* en tubo germinativo Fuente: (Forbes B, Sahn D, Weissfeld A. (2009). Diagnóstico Microbiológico de Bailey & Scott. 12 ed. Editorial Panamericana S.A. Argentina.)

PRODUCCIÓN DE CLAMIDOCONIDIOS (CLAMIDOSPOROS)

La formación de clamidoconidios en "cultivo naciente" es característica de *C. albicans*. Son esporas de resistencia, redondas, refringentes, de pared engrosada y ricas en lípidos.



Imagen A3.12: A. Representación gráfica del Complejo *Candida albicans* en agar harina de maíz. B. Clamidosporas del Complejo *Candida albicans* vista al microscopio, formadas en agar harina de maíz. Fuente: (A. GrahamColm [CC BY-SA 3.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/>)]/ B. By: CDC/Dr. William Kaplan, Courtesy: Public Health Image Library.

MEDIO DE BILIS DE FEO

Bilis (Bacto Oxgall) 20 g

Agar 1 g

Cloranfenicol 250 mg

AD c.s.p. 1000 mL

- Disolver los 250 mg de cloranfenicol en 10 mL de alcohol etílico 96°
- Mezclar los componentes y fundir en BM.
- Ajustar el pH a 6-7.
- Fraccionar a razón de 3 mL por tubo de 13 x 100 mm. • Esterilizar a 121 °C 15 minutos. Agar harina de maíz Harina de maíz amarillo 12,5 g Agar 3,8 g AD c.s.p. 300 mL
- Disolver la harina en 300 mL de agua destilada calentando en BM de 60°C durante 1 hora.
- Filtrar a través de papel y llevar a volumen con agua destilada.
- Agregar el agar y llevar a la Autoclave a 121 °C 5 minutos.
- Sin dejar enfriar refiltrar a través de algodón y fraccionar.
- Esterilizar 15 minutos a 121 °C.

Procedimiento:

- Inocular con un cultivo en crecimiento activo un tubo de medio semisólido de Bilis de Feo o por punción en un medio de harina de maíz.
- Incubar a 25 -28 °C durante 48 has. y observar; si es negativo dejar hasta 5 días. Pasado este lapso de tiempo el ensayo no es apto para identificar presuntivamente a *C. albicans* ya que en cultivos viejos otras levaduras pueden formar clamidosporas (por ejemplo *T. cutaneum*).

Interpretación:

Esta prueba es positiva en el 68% de las cepas de *C. albicans* y solo tiene un error del 3% respecto a la incorrecta identificación de otra levaduras no *C. albicans*.

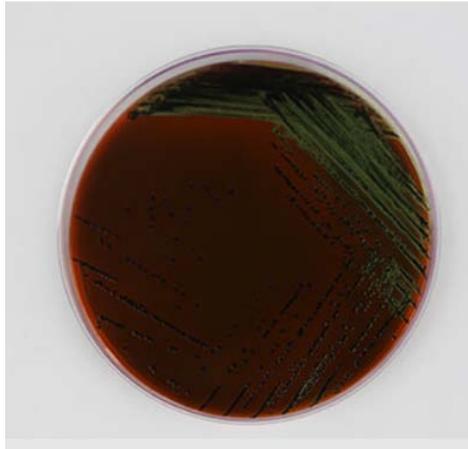


Imagen A3.12: Crecimiento en medio Bilis Fuente: (Científica Senna)

CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS

Fermentación de Glucosa, Galactosa, Sacarosa, Maltosa y Lactosa (Zimograma)

Las pruebas fermentativas se basan en la propiedad que tienen ciertas levaduras de utilizar azúcares en anaerobiosis. Esta propiedad varía desde una fermentación vigorosa a ausencia de fermentación según los géneros de las levaduras que se tratan.

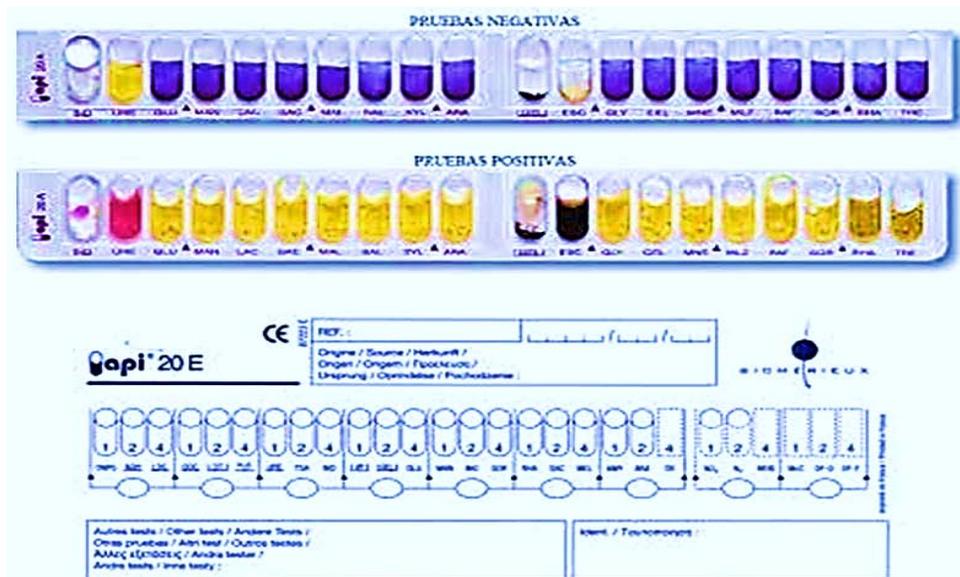


Imagen A3.13: Zimograma Fuente: (API 20 E) Biomerieux)

Asimilación de compuestos carbonados y nitrogenados por el método auxonográfico.

La asimilación de compuestos carbonados permite determinar qué azúcares puede utilizar por vía oxidativa la levadura para crecer. Se realiza re suspendiendo la levadura en un medio sólido libre de azúcares fundido a 45°C que se deja solidificar y luego sobre su superficie se colocan discos de papel embebidos con los azúcares.

Se interpreta como positiva cuando se observa un halo de desarrollo alrededor del disco. La glucosa se utiliza como control positivo ya que es asimilada por todas las levaduras. La asimilación de compuestos nitrogenados se basa en la capacidad de asimilar compuestos nitrogenados. La técnica es similar a la de azúcares, pero se utiliza un medio sólido que no contiene fuentes de nitrógeno y los discos están embebidos con fuentes nitrogenadas.

Se interpreta como positiva cuando se observa un halo de desarrollo alrededor del disco. La peptona se utiliza como control positivo y siempre debe ser incluida en la prueba. Utilizando estas pruebas y complementándolas con la morfología macro y microscópica de las células de levaduras se pueden identificar todas las especies. La asimilación de fuentes de carbono y nitrógeno también puede hacerse en medio líquido.

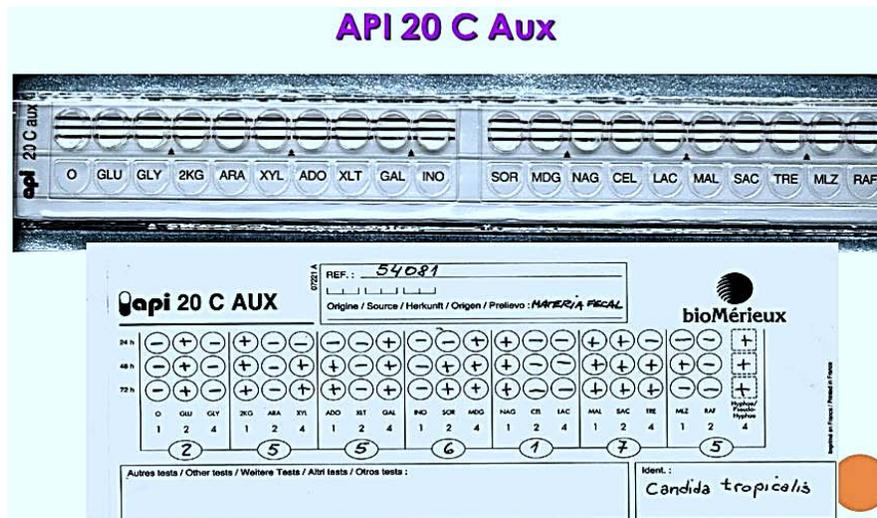


Imagen A3.14: Auxonograma Fuente: (API 20 C Biomerieux)

MEDIOS DE CULTIVO

AGAR SABOURAUD GLUCOSADO (SDA)

Glucosa 40 g

Peptona (Difco) 10 g

Agar (Difco) 15 g

AD c.s.p. 1000 mL

- Fundir el agar en el agua en BM.
- Agregar la glucosa y la peptona y homogeneizar.

- Fraccionar a razón de 7 mL por tubo y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Dejar enfriar en bisel o pico de flauta.

Agar Sabouraud - cloranfenicol

Al agar Sabouraud glucosado se le agregan 250 mg de cloranfenicol (deltamicetina) disuelto en 10 mL de alcohol etílico 95°. Esterilizar a 121 °C, 15 minutos.

AGAR SABOURAUD - CLORANFENICOL - CICLOHEXIMIDA

Al agar Sabouraud glucosado se le agregan 250 mg de cloranfenicol (deltamicetina) disuelto en 10 mL de alcohol etílico 95° y 400 mg de cicloheximida (Actidione) disuelta en 10 mL de acetona.

Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

AGAR SABOURAUD ADICIONADO CON BILIS DE BUEY (para *Malassezia spp.*)

Glucosa 20 g

Peptona (Difco) 10 g

Agar (Difco) 15 g

Bilis de buey (Bacto Oxgall) 20 g

AD c.s.p. 1000 mL

- Fundir el agar en el agua en BM.
- Agregar la glucosa, la peptona y la bilis de buey. Homogeneizar.
- Fraccionar a razón de 7 mL por tubo y esterilizar a 121°C durante 20 minutos.
- Dejar enfriar en bisel. Además de este medio se puede utilizar Agar Sabouraud Glucosado adicionado con 3 o 4 gotas aceite de oliva estéril en su superficie.

LACTRIMEL (Medio de Borelli)

Miel de abeja 10 g

Harina de trigo 20 g

Agar (Bacto-Difco) 12 g

Leche entera 200 mL

AD c.s.p 1.000 mL

Cloranfenicol 250 mg

- Disolver poco a poco la harina en la leche y luego agregarle la miel y el agua, mezclar bien.
- Fundir en BM el agar y agregar los componentes antes mezclados.
- Agregar el cloranfenicol disuelto en 5 mL de alcohol etílico.
- Fraccionar en tubos de ensayo a razón de 7 mL por tubo o Erlenmeyer para luego hacer placas.
- Esterilizar a 118 °C durante 20 minutos y estriar los tubos para cultivo primario. Si se desea hacer placas distribuir estérilmente a razón de 20 mL por placa de Petri, antes que el medio de cultivo solidifique.

MEDIO DE DIXON PARA RECUPERACIÓN DE *Malassezia sp.*

Extracto de malta 3,6 g

Peptona 0,6 g

Bacto Oxgall 2 g

Tween 40 1 g

Glicerol 0,5 g

Agar 1,5 g

Agua c.s.p. 100 mL

Fundir el agar en el agua en B.M.

Agregar la glucosa , la peptona, el Bacto Oxgall , el Tween y el glicerol. Homogeneizar.

Fracccionar a razón de 7 mL por tubo y esterilizar a 121°C durante 20 minutos.

Dejar enfriar en bisel

NOTA: en este medio hay una mejor recuperación de las especies de *Malassezia*, sobre todo de *Malassezia globosa* que necesita requerimientos especiales para su desarrollo.

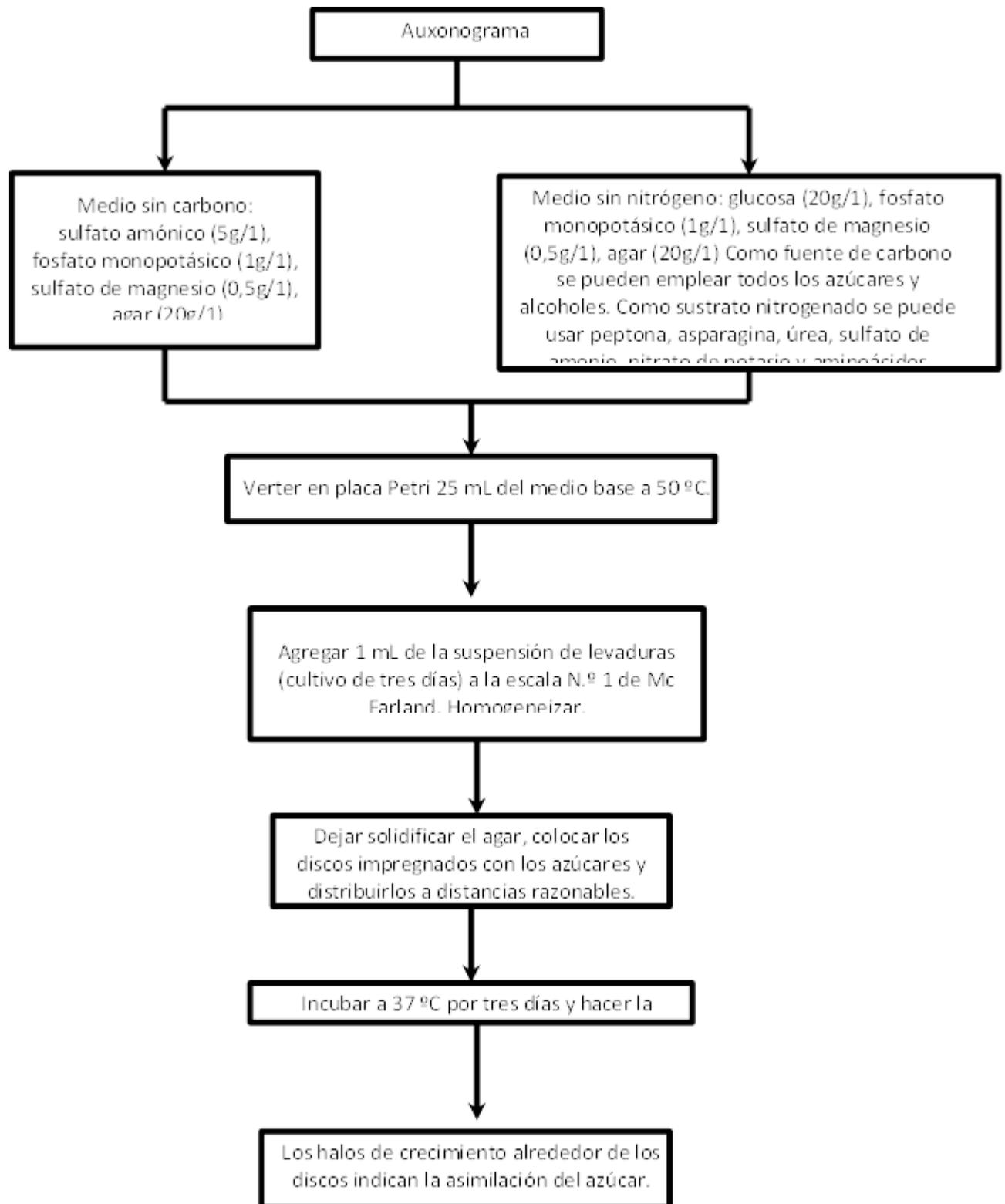
Auxonograma del carbono en placa:

Se fundamenta en el empleo de diversos nutrientes hidrocarbonados o nitrogenados sobre un medio sintético base, para observar el crecimiento selectivo de una levadura alrededor de los nutrientes necesarios para su desarrollo. Los medios de cultivo se comercializan deshidratados como medio base de levaduras, siendo los más usados:

Procedimiento:



Imagen A3.15: Auxonograma Fuente: (Arenas 2014)



Bibliografía:

- Arango M, Castañeda E. Micosis humanas. Procedimientos diagnósticos. Exámenes directos.
- Ballesté R, Salvatella R. Manual de toma de muestra para estudio bacteriológico, parasitológico y micológico. Selección, recolección, conservación y transporte. Montevideo:
 - Bogotá: Corporación para Investigaciones Biológicas e Instituto Nacional de Salud; 1995.
- Casquero J, Zurita S. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de micosis oportunistas y profundas. Lima: Instituto Nacional de Salud; 1997. Serie de Normas Técnicas N.º 23.
- Crespo V, Ojeda A, Vera A, Crespo A, Sánchez F. Aislamiento e identificación de *Malassezia* spp. en pitiriasis versicolor, dermatitis seborreica y piel sana. *Rev Iberoam Micol* 199; 16: 16-21.
- Departamento de Laboratorio Clínico. Hospital de Clínicas. Facultad de Medicina; 2004.
- Fridkin S, Jarvis W (1996) Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev*; 9(4): 499-511.
- Giusiano GE. (2006) *Malassezia*. Estado del conocimiento y perspectivas en su estudio. *Rev Argent Microbiol*; 38(1): 41-48.
- Guillot J, Guého E, Lesourd M, Midgley G, Chévrier G, Dupont B. Identification of *Malassezia* species. A practical approach. *J. Mycol Med* 1996; 6: 103-10.
- Hazen K. (1995) New and emerging yeast pathogens. *Clin Microbiol Rev*; 8(4): 462-78 [En línea] recuperado de DOI: 10.1128/CMR.8.4.462
- Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. (2000) Atlas clinical of fungi. 2nd ed. Reus: Universitat Rovira I Virgili;
- Instituto Nacional de Salud. Bioseguridad en laboratorios de ensayo, biomédicos y clínicos. 3ra ed. Lima: Instituto Nacional de Salud; 2005. Serie de Normas Técnicas N.º 18.
- Instituto Nacional de Salud. Manual de procedimientos bacteriológicos en infecciones intrahospitalarias. Lima: Instituto Nacional de Salud; 2001. Serie de Normas Técnicas N.º28.
- Instituto Nacional de Salud. Manual de procedimientos de laboratorio para la obtención y envío de muestras. Lima: Instituto Nacional de Salud; 1995. Serie de Normas Técnicas N.º 15.
- Koneman E, Roberts G. (1992) Micología. Práctica de laboratorio.: Editorial Médica Panamericana Buenos Aires
- Laszlo A, Weyer K, Barrera L, Balandrano S, Ridderhof J, Smithwick R, et al. Baciloscofia directa de BAAR. Un programa de capacitación para laboratorios. Atlanta: OMS/ UICTER/CDC/OPS/INDRE/APHL; 2000.
- López Martínez R, Méndez L, Hernández F et al. (1995) Micología médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio. México DF: Editorial Trillas

- Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas (2010) 376 Medicina & Laboratorio, Volumen 16, Números 7-8,
- Medicina & Laboratorio: Programa de Educación Médica Continua Certificada Universidad de Antioquia, Edimeco
- Negroni R, Guelfand L. (1999) Manual de procedimientos para laboratorios de micología médica. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana–Suplemento 1. Buenos Aires: Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires
- Pemán J, Martín-Mazuelos E, Rubio-Calvo MC (2001) Guía práctica. Identificación y diagnóstico en micología médica. Revista Iberoamericana de Micología [En línea] recuperado de ISBN: 978-84-611-8776-8
- San Juan R, Berenguer J, Aguado JM. Hongos filamentosos emergentes: Scedosporium [documento en internet]. España; 2004. Disponible en: www.seimc.org/control/revi_Mico/pdf/Honemerg.pdf
- Sullivan D, Coleman D (1998) Minireview Candida dubliniensis: Characteristics and Identification. J Clin Microbiol; 36(2): 329-34.
- Torres–Rodríguez, J. (1996) Nuevos hongos patógenos oportunistas emergentes. Rev. Iberoam. Micol.. 13: S30-S38.[En línea] recuperado de <http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/Manual%20Hongos.pdf>

MANEJO DEL MICROSCOPIO

1. Colocar el objetivo de menor aumento en posición de empleo y bajar la platina completamente. Si el microscopio se recogió correctamente en el uso anterior, ya debería estar en esas condiciones.
2. Colocar la preparación sobre la platina sujetándola con las pinzas metálicas.
3. Comenzar la observación con el objetivo de 4x (ya está en posición) o colocar el de 10 aumentos (10x) si la preparación es de bacterias.
4. Para realizar el enfoque:
 - a) Acercar al máximo la lente del objetivo a la preparación, empleando el tornillo macrométrico. Esto debe hacerse mirando directamente y no a través del ocular, ya que se corre el riesgo de incrustar el objetivo en la preparación pudiéndose dañar alguno de ellos o ambos.
 - b) Mirando, ahora sí, a través de los oculares, ir separando lentamente el objetivo de la preparación con el macrométrico y, cuando se observe algo nítida la muestra, girar el micrométrico hasta obtener un enfoque fino.
5. Pasar al siguiente objetivo. La imagen debería estar ya casi enfocada y suele ser suficiente con mover un poco el micrométrico para lograr el enfoque fino. Si al cambiar de objetivo se perdió por completo la imagen, es preferible volver a enfocar con el objetivo anterior y repetir la operación desde el paso 3. El objetivo de 40x enfoca a muy poca distancia de la preparación y por ello es fácil que ocurran dos tipos de percances: incrustarlo en la preparación si se descuidan las precauciones anteriores y mancharlo con aceite de inmersión si se observa una preparación que ya se enfocó con el objetivo de inmersión.
6. Empleo del objetivo de inmersión:
 - a) Una vez enfocada la preparación con el objetivo de 40x girar el revolver para seleccionar el objetivo de inmersión.
 - b) Subir totalmente el condensador para ver claramente el círculo de luz que nos indica la zona que se va a visualizar y donde habrá que echar el aceite.
 - c) Girar el revólver hacia el objetivo de inmersión dejándolo a medio camino entre éste y el de x40.
 - d) Colocar una gota mínima de aceite de inmersión sobre la preparación (la zona iluminada).
 - e) Terminar de girar suavemente el revólver hasta la posición del objetivo de inmersión.
 - f) Mirando directamente al objetivo, subir la platina lentamente hasta que la lente toca la gota de aceite. En ese momento se nota como si la gota ascendiera y se adosara a la lente.
 - g) Enfocar cuidadosamente con el micrométrico. La distancia de trabajo entre el objetivo de inmersión y la preparación es mínima, aun menor que con el de 40x por lo que el riesgo de accidente es muy grande.
 - h) Una vez se haya puesto aceite de inmersión sobre la preparación, ya no se puede volver a usar el objetivo 40x sobre esa zona, pues se mancharía de aceite. Por tanto, si desea enfocar otro campo, hay que bajar la platina y repetir la operación desde el paso 3.
 - i) Una vez finalizada la observación de la preparación se baja la platina y se coloca el objetivo de menor aumento girando el revólver. En este momento ya se puede retirar la preparación de la platina. Nunca se debe retirar con el objetivo de inmersión en posición de observación.
 - j) Limpiar el objetivo de inmersión con cuidado empleando un papel especial para óptica.
 - k) Comprobar también que el objetivo 40x está perfectamente limpio.

MANTENIMIENTO Y PRECAUCIONES

1. Al finalizar el trabajo, hay que dejar puesto el objetivo de menor aumento en posición de observación, asegurarse de que la parte mecánica de la platina no sobresale del borde de la misma y dejarlo cubierto con su funda.
2. Cuando no se está utilizando el microscopio, hay que mantenerlo cubierto con su funda para evitar que se ensucien y dañen las lentes. Si no se va a usar de forma prolongada, se debe guardar en su caja dentro de un armario para protegerlo del polvo.
3. Nunca hay que tocar las lentes con las manos. Si se ensucian, limpiarlas muy suavemente con un papel de filtro o, mejor, con un papel de óptica.
4. No dejar el portaobjetos puesto sobre la platina si no se está utilizando el microscopio.
5. Después de utilizar el objetivo de inmersión, hay que limpiar el aceite que queda en el objetivo con pañuelos especiales para óptica o con papel de filtro (menos recomendable). En cualquier caso se pasará el papel por la lente en un solo sentido y con suavidad. Si el aceite ha llegado a secarse y pegarse en el objetivo, hay que limpiarlo con una mezcla de alcohol-acetona (7:3) o xilol. No hay que abusar de este tipo de limpieza, porque si se aplican estos disolventes en exceso se pueden dañar las lentes y su sujeción.
6. No forzar nunca los tornillos giratorios del microscopio (macrométrico, micrométrico, platina, revólver y condensador).
7. El cambio de objetivo se hace girando el revólver y dirigiendo siempre la mirada a la preparación para prevenir el roce de la lente con la muestra. No cambiar nunca de objetivo agarrándolo por el tubo del mismo ni hacerlo mientras se está observando a través del ocular.
8. Mantener seca y limpia la platina del microscopio. Si se derrama sobre ella algún líquido, secarlo con un paño. Si se mancha de aceite, limpiarla con un paño humedecido en xilol.
9. Es conveniente limpiar y revisar siempre los microscopios al finalizar la sesión práctica y, al acabar el curso, encargar a un técnico un ajuste y revisión general de los mismos.



Sistema óptico

OCULAR: Lente situada cerca del ojo del observador. Amplía la imagen del objetivo.

OBJETIVO: Lente situada cerca de la preparación. Amplía la imagen de ésta.

CONDENSADOR: Lente que concentra los rayos luminosos sobre la preparación.

DIAFRAGMA: Regula la cantidad de luz que entra en el condensador.

FOCO: Dirige los rayos luminosos hacia el condensador.

Sistema mecánico

SOPORTE: Mantiene la parte óptica. Tiene dos partes: el pie o base y el brazo.

PLATINA: Lugar donde se deposita la preparación.

CABEZAL: Contiene los sistemas de lentes oculares. Puede ser monocular, binocular.

REVÓLVER: Contiene los sistemas de lentes objetivos. Permite, al girar, cambiar los objetivos.

TORNILLOS DE ENFOQUE: Macrométrico que aproxima el enfoque y micrométrico que consigue el enfoque correcto.

Bibliografía:

- Cafarchia C, Iatta R, Latrofa M et al (2013) Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of dermatophytes. *Infect Genet Evol.*; 20:336-51
- Davel G, Canteros C, Rodero L (1997) Manual de procedimientos del Departamento Micología. Instituto Nacional Enfermedades Infecciosas, INEI, ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"..
- de Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figüeras J. Atlas of Clinical Fungí. Second edition. Centraalbureau voor Schimmelcultures / Universitat Rovira i Virgili. 2001.
- Ellis D, Davis S, Alexiou H et al (1992) Descriptions of medical QAP Fungí. Gillingham Printers Pty Ltd. Australia
- Gräser Y, Kuijpeers AFA, Presber W, de Hoog GS. Molecular taxonomy of Trichophyton mentagrophytes and T. tonsurans. *Med Mycol* 1999; 37:315-330.
- Gräser Y, Scott J, Summerbell R. The new species concept in dermatophytes-a polyphasic approach. *Mycopathologia*. 2008; 166:239-56
- Guarro J. (2012) Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*; 30:33–39
- Kwon-Chung, K.J, Bennet J.E. (1992) Medical Mycology. Part III. Superficial Mycoses. 105-197. Lea & Febiger Ed. Philadelphia. London.
- López Martínez R, Méndez Tovar L, Hernández Hernández F, et al (1995) Micología Médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio. 1ª Ed. México.
- Nenoff P, Hermann J, Gräser Y. Trichophyton mentagrophytes sive interdigitale? A dermatophyte in the course of time. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2007;5:198-202.