

336427



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE MEXICO  
PLANTEL CHAPULTEPEC

4

TECNICAS Y FUNDAMENTOS QUE SE UTILIZAN EN EL  
DIAGNOSTICO DE MICOSIS.

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO**  
**P R E S E N T A :**  
**MENDOZA LANDGRAVE ROCIO**

MEXICO, D. F.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

200



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## AGRADECIMIENTOS:

- Quiero agradecer a todas y cada una de las personas que hicieron posible el que yo me encuentre en este lugar tan importante para mí, esas personas principalmente son.
- Mis maestros que aunque muchas veces no estábamos de acuerdo, me enseñaron lo valioso que es tener bases para el futuro.
- Mi familia que me apoyo a que siguiera adelante cuando me daba un poco por vencida, esto va en especial a mi tía y a mi prima y a un amigo incondicional que nos ha ayudado a todos nosotros, en especial a mi mamá., También quiero dar las gracias por su apoyo , comprensión y sobre todo por su paciencia a mi novio que la verdad me aguantó mucho.
- Y más que a nadie a mi mamá que con su gran amor supo guiarme para poder ser lo que soy ahora, ese amor incluyó algunos jalones de oreja. Y para mí ella es una mujer imprescindible

Hay mujeres que luchan un día

Y son buenas

Hay mujeres que luchan un año

Y son mejores

Pero hay mujeres que luchan

Toda una vida y estas son

Imprescindibles.

## INDICE

<b>INTRODUCCION</b> .....	1
<b>OBETIVOS</b> .....	10
<b>CAPITULO 1 "TIPOS DE MUESTRA Y TÉCNICAS DE APOYO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE HONGOS Y DE MICOSIS"</b>	
1.1 Muestras vías respiratorias bajas .....	11
1.1.1 Esputo	
1.2 Muestras genitourinarias .....	12
1.2.1 Orina	
1.2.2 Cuello uterino y canal vaginal	
1.3 Muestras cutáneas .....	12
1.3.1 Pelos	
1.3.2 Uñas	
1.4 Muestras subcutáneas .....	13
1.4.1 Exudados	
1.4.2 Trasadados	
1.4.3 Líquido cefalorraquídeo	
1.4.4 Sangre	
1.5 Muestras de tejidos .....	15
1.5.1 Biopsias	
1.5.2 Médula ósea	
1.6 Inoculación en animales .....	16
1.6.1 Subcutánea	
1.6.2 Intravenosa	
1.6.3 Intraperitoneal	
1.6.4 Intratesticular	
1.6.5 Intracerebral	
1.6.6 Intramuscular	
1.6.7 Superficial	
1.6.8 Ejemplos de animales que se usan para diagnóstico de algunas patologías y tipo de inoculación	
1.7 Luz de Wood .....	19
1.7.1 Patologías en las que se usa para su diagnóstico	
1.7.2 Fluorescencia de acuerdo a los diferentes tipos de patologías.	
1.8 Método de Kjeldahl .....	21

1.9 Fenómeno de Splendore-Hoeppli.....	22
1.9.1 Patologías en la que es característico	
1.9.2 Ilustraciones	
1.10 Microcultivo .....	24
1.11 Examen directo con hidróxido de potasio .....	27
1.11.1 Montaje	
1.11.2 Patologías en la que se usa para su diagnóstico y tipo de parasitación	
1.11.3 Ilustraciones	

## CAPITULO 2 "TINCIONES"

2.1 Introducción a las Tinciones .....	33
2.2 Tinción con Hidróxido de potasio y azul de Parker .....	35
2.2.1 Método	
2.2.2 Técnica	
2.2.3 Patologías en las cuales se utiliza para su diagnóstico uy observación al microscopio	
2.3 Tinción de PAS (ácido peryódico de schiff).....	37
2.3.1 Método	
2.3.2 Técnica	
2.4 Tinción de Gromori-Grocott.....	39
2.4.1 Método	
2.4.2 Técnica	
2.5 Tinción de Hematoxilina-Eosina.....	41
2.5.1 Método	
2.5.2 Técnica	
2.6 Micosis y tipos de muestra en las que se pueden utilizar las tinciones de PAS, Grocott y Hematoxilina-eosina.....	43
2.7 Tinción de Gram .....	48
2.7.1 Método	
2.7.2 Técnica	
2.7.3 Fórmulas de los colorantes	
2.8 Tinción de Wright y Giemsa.....	51
2.8.1 Método	
2.8.2 Técnica	
2.8.3 Fórmulas de los colorantes	
2.9 Micosis y tipos de muestras en las que se pueden utiliza las tinciones de Gram, Giemsa y Wright.....	54
2.10 Tinción con tinta china .....	56
2.10.1 Método	
2.10.2 Técnica	
2.11 Tinción de resaltado capsular (TCR).....	57
2.11.1 Método	
2.11.2 Técnica	

2.12 Tinción de Mucicarmin de Meyer.....	58
2.13 Patología en la que se pueden utilizar las tinciones de tinta china, resaltado capsular o mucicarmin de Meyer.....	59
2.14 Tinción de Zhiel-Neelsen.....	60
2.14.1 Método	
2.14.2 Técnica	
2.14.4 Patologías en las que se utiliza la tinción de Zhiel-Neelsen .....	62
2.15 Ilustraciones.....	64

### **CAPITULO 3 “MEDIOS DE CULTIVO”**

3.1 Antibióticos utilizados en los medios de cultivo.....	69
3.1.1 penicilina	
3.1.2 Estreptomina	
3.1.3 Gentamicina y Neomicina	
3.1.4 Cloramfenicol	
3.1.5 Cicloheximida	
3.2 Agar Dextrosa de Sabouraud.....	76
3.2.1 Modo de acción	
3.2.2 Composición	
3.2.3 Preparación	
3.2.4 Procedimiento experimental y evaluación	
3.3 Agar Mycosel .....	77.
3.3.1 Modo de acción	
3.3.2 Composición	
3.3.3 Preparación	
3.3.4 Procedimiento experimental y evaluación	
3.4 Agar Sangre y Agar Chocolate.....	79
3.4.1 Modo de acción	
3.4.2 Composición	
3.4.3 Preparación	
3.4.4 Procedimiento experimental y evaluación	
3.5 Agar BHI .....	81
3.5.1 Modo de acción	
3.5.2 Composición	
3.5.3 Preparación	
3.5.4 Procedimiento experimental y evaluación	
3.6 Agar Extracto de levadura .....	83
3.6.1 Modo de acción	
3.6.2 Composición	
3.6.3 Preparación	
3.6.4 Procedimiento experimental y evaluación	

3.7 Agar Nickerson .....	84
3.7.1 Modo de acción	
3.7.2 Composición	
3.7.3 Preparación	
3.7.4 Procedimiento experimental y evaluación	
3.7.5 Observación microscópica	
3.8 Agar Corn-meal .....	85
3.8.1 Modo de acción	
3.8.2 Composición	
3.8.3 Preparación	
3.8.4 Procedimiento experimental y evaluación	
3.9 Medio TTC .....	88
3.9.1 Modo de acción	
3.9.2 Composición	
3.9.3 Preparación	
3.9.4 Procedimiento experimental y evaluación	
3.10 Agar Alpiste negro.....	90
3.10.1 Modo de acción	
3.10.2 Composición	
3.10.3 Preparación	
3.10.4 Procedimiento experimental y evaluación	
3.11 Auxonogramas y Zimogramas .....	91
3.11.1 Auxonogramas	
3.11.2 Medios para Auxonogramas	
3.11.3 Zimogramas	
3.11.4 Patologías en las que se utilizan y características de diferentes especies en auxonogramas y zimogramas.	
3.12 Agar Löwenstein-Jensen .....	96
3.12.1 Modo de acción	
3.12.2 Composición	
3.12.3 Preparación	
3.12.4 Procedimiento experimental y evaluación	
3.13 Medios para hidrólisis de Caseína.....	98
3.13.1 Modo de acción	
3.13.2 Composición	
3.13.3 Preparación	
3.13.4 Procedimiento experimental y evaluación	
3.14 Medios para hidrólisis de Xantina, Hipoxantina y Tirosina.....	99
3.14.1 Modo de acción	
3.14.2 Composición	
3.14.3 Preparación	
3.14.4 Procedimiento experimental y evaluación	
3.14.5 Diferencias fisiológicas de las especies de <i>Nocardia</i> <i>Actinomadurae</i> y <i>Streptomyces</i>	
3.15 Patologías en las que se usan los medios de cultivo para su diagnóstico .....	101

3.16 Ilustraciones.....	110
-------------------------	-----

## CAPITULO 4 "PRUEBAS INMUNOLÓGICAS"

4.1 Introducción a las pruebas serológicas.....	114
4.1.1 Naturaleza general de los anticuerpos	
4.1.2 Generalidades de los anticuerpos	
4.1.3 Generalidades de los antígenos	
4.1.4 Esquemas de anticuerpos	
4.2 Fundamentos de las reacciones serológicas .....	117
4.3 Tipos de reacciones inmunológicas.....	118
4.4. Visión global y principios generales de los inmunoanálisis .....	120
4.5 Pruebas de sensibilidad cutánea .....	122
4.5.1 Procedimiento	
4.5.2 Diagnóstico	
4.5.3 Ejemplos de las intradermorreacciones	
4.6 Fundamentos de las reacciones de precipitinas .....	124
4.6.1 Precipitación en tubo	
4.6.2 Inmunodifusión simple	
4.6.3 Inmunodifusión doble	
4.6.4 Inmunodifusión doble en dos dimensiones	
4.6.5 Contraelectroinmunoforesis	
4.6.6 Inmunodifusión radial	
4.7 Fundamentos de las pruebas de aglutininas.....	135
4.7.1 Aglutinación directa	
4.7.2 Aglutinación indirecta o pasiva	
4.8 Prueba de fijación de complemento.....	138
4.9 Prueba de ELISA .....	139
4.10 Inmunoanálisis por fluorescencia.....	143
4.11 Radioinmunoanálisis .....	145
4.12 Pruebas serológicas útiles en la determinación de micosis .....	146

## CAPITULO 5 "PRUEBAS RADIOLÓGICAS"

5.1 Fundamentos de pruebas con Rayos X .....	149
5.2 Tomografía computarizada .....	151
5.3 Riesgos de la radiación .....	152
5.3.1 Medidas de seguridad en general para el uso de los rayos X	
5.4 Patologías en las cuales los estudios con rayos X son de utilidades .....	154
5.5 Ilustraciones .....	157

**CONCLUSIONES.....158**

**GLOSARIO.....159**

**BIBLIOGRAFIA.....172**

## INTRODUCCION

### TAXONOMIA

En la identificación preliminar de hongos aislados de materiales clínicos, es útil tener presente un esquema de clasificación. Se han propuesto diversas clasificaciones, ninguna de las cuales es adecuada para todos los propósitos. El término hongo en general se refiere a mohos y levaduras; técnicamente son microorganismos dentro de un reino separado caracterizados por la falta de hojas verdaderas, troncos o raíces. Carecen de clorofila y por ende no pueden obtener energía de fotosíntesis mas bien obtienen su nutrición a través de la absorción de compuestos orgánicos preformados, a esto se le conoce como quimiosíntesis. Morfológicamente son unicelulares o miceliales. (1)

La clasificación filogenética no ha sido de uso práctico en el laboratorio clínico para la identificación de hongos. Por ésta clasificación los hongos patógenos pueden incluirse dentro de cuatro filos: *I- Zygomycota; II- Ascomycota; III- Basidiomycota; y IV- Deuteromycota.*

Los *Zygomycetes* tienen hifas no tabicadas y se reproducen asexualmente por medio de esporas transportadas en esporangios, y sexualmente por la fusión de dos gametos o hifas compatibles para formar una *zigospora*. Los *Ascomycetes* tienen un micelio tabicado y se reproducen asexualmente por conidios transportados en una amplia variedad de conidióforos o sexualmente por medio de ascosporas producidas dentro de una estructura similar a un saco denominado *asco*. Los *Basidiomycetes* son tabicados y se reproducen asexualmente por conidios o sexualmente por basidiosporas.

Los *Deuteromycetes* tienen un micelio tabicado y en esta clase se incluyen a todos los hongos para los cuales no se ha descubierto un ciclo reproductor sexual. Los estados anamórficos se caracterizan por la reproducción asexual. Los grupos taxonómicos dentro de este no reflejan relaciones filogenéticas. Se reproducen exclusivamente en por la producción de conidios. (1)

Para confirmar la especie muchas veces es utilizada la compatibilidad sexual, sin embargo, muchos hongos carecen de un ciclo de reproducción sexual y deben clasificarse sobre la base de la morfología asexual y vegetativa, la fisiología y características similares.

Recientemente la comparación del DNA en base a la cantidad de guanosina y citocina y la homología de la secuencia han aclarado diversas relaciones.

La proliferación como levaduras o mohos no constituye una separación taxonómica ya que algunos subgrupos de cada grupo taxonómico mayor contienen especies de levaduras y hongos dimórficos.

A continuación se presenta una lista resumida de los grupos taxonómicos de interés especial en micología médica. La clasificación en los grupos principales dentro del reino de los hongos depende en primer término del tipo de espora que se forma después de la reproducción sexual (estado "perfecto" o *telomórfico*). Los hongos a los cuales no se les ha encontrado un ciclo de reproducción sexual se denominan imperfectos o *anamórficos* y pueden clasificarse dentro de la subdivisión de los

deuteromicetes sobre la base de su morfología de sus estructuras reproductoras asexuales. (1)

Algunas veces un hongo dado tiene más de un nombre y ubicación en el esquema de clasificación. Por ejemplo un hongo, típicamente en su haplofase, puede identificarse sobre la base de sus estructuras reproductoras asexuales características como una especie anamórfica específica en la subdivisión Deuteromycotina, pero durante la reproducción sexual el mismo hongo es reconocido por sus esporas sexuales como una especie teleomórfica con otro nombre. En muchos casos deben de retenerse ambos nombres porque una especie que se reproduce en forma sexual puede producir más de una forma anamórfica (asexual), como *H.capsulatum* que se encuentra clasificado en la familia Gymnoascaceae y Moniliaceae. A la inversa, una especie anamórfica puede representar realmente el tipo de apareamiento de más de una especie teleomórfica; es decir, dos o más especies teleomórficas (sexuales) pueden reproducirse de forma asexual para formar el mismo hongo anamórfico indiferenciable por ejemplo las especies de *aspergillus* dan en su forma teleomórfica diferentes especies como *Emericella* y *Sortorya*. (1)

**POSICION FILOGENETICA DE HONGOS MEDICAMENTE SIGNIFICATIVOS**

CLASE	ORDEN	FAMILIA	GENERO/ ESPECIE anamórfico	NOMBRE y ESTRUCTURA teleomórfico
Filo Zygomycota Zygomycetes	Entomophthorales	Entomophthoraceae	<i>Basidiobolus</i> <i>Conidiobolus</i> y <i>Entemophthora</i> .	
	Mucorales	Mucoraceae	<i>Absidia</i> , <i>Cunninghamella</i> , <i>Mortierella</i> , <i>Mucor</i> , <i>Phycomyces</i> , <i>Pilobolus</i> , <i>Rhizomucor</i> , <i>Rhizopus</i> <i>Syncephalastrum</i>	
Filo Ascomycota Hemiascomycetes	Endomycetales	Endomyceteaceae	( <i>Geotrichum</i> sp)*	<i>Endomyces</i> (ascosporas)
		Saccharomiceaceae	( <i>C.seudotropicalis</i> )*	<i>Kluyveromyces</i> (ascosporas)
Loculoascomycetes	Myringiales	Saccardinulaceae		<i>Piedraea hortae</i> (ascosporas)
	Microascales	Microascaceae	<i>Pseudallescheria</i> <i>boydii</i>	
Plectomycetes	Eurotiales	Eurotiaceae	( <i>A.nidulans</i> )* ( <i>A.fumigatus</i> )*	<i>Emericella</i> <i>Sortorya</i>
		Gymnoascaceae	( <i>H.capsulatum</i> )* ( <i>Trichophyton</i> sp)* ( <i>Mycrosporium</i> sp)	<i>Ajellomyces</i> <i>Arthroderma</i> <i>Nannizia</i>
Filo Basidiomycota Teliomycetes	Ustilaginales	Filobasidiaceae	( <i>C.neoformans</i> )*	<i>Filobasidiella</i>



Los clínicos, que deben tratar a pacientes con micosis locales o diseminadas, han hallado una clasificación orientada según las enfermedades, esta clasificación es más útil, en ésta los hongos se agrupan en tres categorías según el nivel que es afectado, estas categorías son *a)* micosis superficiales o cutáneas, *b)* micosis subcutáneas y *c)* micosis sistémicas. (1)

Las *micosis superficiales o cutáneas* son enfermedades fúngicas que permanecen limitadas a las capas externas de la piel, uñas o pelo, sin invadir el tejido o vísceras más profundas. Entre estas se encuentran las Tiñas o dermatomicosis, Piedra blanca y negra, Pitiriasis versicolor en sus dos variedades, Candidosis.

Las *micosis subcutáneas* están limitadas al tejido subcutáneo profundo, con solo raros informes de diseminación sistémica. En estas se encuentran: Cromomicosis, Esporotricosis, Feohifomicosis.

Las *micosis sistémicas* involucran vísceras y pueden diseminarse ampliamente por todo el cuerpo. Entre estas están: Aspergilosis, Actinomicosis, Blastomicosis, Candidosis, Coccidioidomicosis, Criptococosis, Geotricosis, Histoplasmosis, Micetoma, Nocardiosis, Paracoccidioidomicosis, Zigomicosis. (1)

## **CARACTERISTICAS PARA IDENTIFICAR A LOS HONGOS.**

Cuando se obtiene el cultivo de un hongo se deben de considerar características microscópicas y macroscópicas de su fisiología para poder definir género y especie, éstas características varían dependiendo del medio de cultivo y temperatura en la que se desarrollan, naturaleza de los azúcares, pureza de la peptona, grado de humedad, pH etc. por lo que se recomienda siempre para un primoaislamiento utilizar agar Sabouraud para estudiar y realizar la comparación de características estándares en las mismas condiciones tanto de humedad como temperatura, evitando así contaminaciones.<sup>(6)</sup>

Dentro de la morfología macroscópica se deben de estudiar las siguientes características:

- Forma y tamaño de la colonia
- Color en la superficie y en el reverso de la colonia
- Difusión del pigmento al agar
- Coloración
- Textura
- Superficie si ésta es elevada o no
- Aspecto
- Consistencia
- Rapidez de crecimiento<sup>(6)</sup>

Para poder observar las características microscópicas se pueden utilizar varios métodos entre los que se encuentran:

- a) Examen a través del tubo, en el que el tubo se pone debajo de la lupa del microscopio y se observa el borde de crecimiento, éste examen es muy rápido pero poco preciso.
- b) Examen de un fragmento de cultivo en el cual se toma un fragmento de la colonia y se dilacera y se observa con azul de lactofenol. Este método puede destruir los aparatos esporíferos y así dificultar la identificación.
- c) Método de cinta adhesiva transparente, el método es una variante del anterior pero en éste casi no se alteran sus aparatos esporíferos. Se corta un pequeño pedazo de cinta y por la parte terminal se adhiere al asa micológica, la parte que queda libre y por el lado adhesivo se pasa por arriba de la colonia y luego se coloca sobre el portaobjetos que previamente contiene una gota del colorante y se permite que el colorante suba por capilaridad para poder desprender la cinta del asa, una vez realizado esto se pone un cubre objetos arriba de la cinta y se observa al microscopio.
- d) Microcultivo o cultivo en lámina, éste método es el más preciso y permite observar las estructuras fúngicas *in situ* y consiste en obtener un cultivo sobre un porta objetos y observar el hongo bajo el microscopio, por lo que no hay alteración de su morfología.<sup>(6)</sup>

Dentro del estudio microscópico se deben de estudiar diferentes órganos fúngicos entre los que están:

- Talo: Filamentos o levaduras, se debe observar su grosor, bifurcaciones, si tiene septos o carece de éstos y color.
- Esporas asexuadas y aparato conidiógeno
- Esporas sexuadas y estructuras donde se forman
- Cualquier formación anexa (ornamentaciones)»»

**OBJETIVOS:**

- Recopilar y seleccionar la información de mayor utilidad y actualidad de las técnicas utilizadas en el diagnóstico de las micosis más frecuentes.
- Proporcionar un manual completo tanto en fundamentos como en técnicas para el diagnóstico de micosis que sea claro, didáctico y accesible, que sea utilizado en el apoyo de la asignatura de micología en la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo y a los egresados que aplican directamente estos conocimientos.

## **CAPITULO 1**

# **“TIPOS DE MUESTRAS Y TECNICAS DE APOYO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE HONGOS Y DE MICOSIS”**

## FUENTES ESPECIFICAS DE MUESTRAS

### 1.1 Vías respiratorias bajas

*Espuito:* debe recogerse de una tos profunda temprano por la mañana, poco después de que el paciente despierta. La boca debe enjuagarse energicamente exclusivamente con agua inmediatamente antes de recoger la muestra para minimizar la concentración de contaminantes orofaríngeos . La recolección de 24 horas es inaceptable ya que hay un exagerado desarrollo de microorganismos saprófitos en la muestra.

Cuando el paciente no puede espectorar espuito, puede introducirse solución fisiológica o isoprotenerol en el árbol bronquial por medio de un equipo de respiración positiva intermitente , esto produce profundos espasmos de tos. Ya sea espontáneo o inducido por medio de nebulizaciones, deben recogerse de 10 a 15 ml de espuito en un envase estéril con tapón a rosca y bien sellado, sin conservadores, el cual se rotula y se envía al laboratorio.

También se puede utilizar la aspiración transtraqueal para pacientes muy debilitados que no soportarian el tratamiento de inducción.

Para el diagnóstico de micosis pulmonares invasivas la biopsia broncoscópica es útil, particularmente si los infiltrados u otras lesiones se ubican más periféricamente en uno o más lóbulos de los pulmones; Se sigue el mismo método de recolección que en el espuito.(1)

## 1.2 Vias genitourinarias

**Orina:** Esta puede recogerse por la técnica de la parte media del chorro, o con una sonda uretral en el conector de goma blanda se pincha con agua y jeringa estériles y se toma la muestra; nunca se deben de tomar muestras de una bolsa recolectora , la recuperación de hongos es óptima en la primera orina particularmente cuando se tuvo una abstinencia de agua de 12 horas. Las muestras de 24 horas son inaceptables ya que existe un desarrollo exagerado de microorganismos saprófitos en la muestra.

Las muestras de orina deben ser procesadas inmediatamente o mantenerse en refrigeración (4°C) ya que la muestra que se deja a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hr puede ser no útil para la identificación de hongos dimórficos asociados con infecciones micóticas.

**Cuello uterino o canal vaginal:** Estas muestras se recuperan por medio de raspados, la obtención de cultivos tiene un valor cuestionable por la presencia en estos sitios de levaduras comensales que pueden desarrollar en el medio cultivo.<sup>(1)</sup>

## 1.3 Muestras cutáneas

Las muestras cutáneas pueden obtenerse raspando *escamas* de piel con el filo de una hoja de bisturí o portaobjetos estériles, estas escamas deben ser de los márgenes eritematosos periféricos. Los *pelos* pueden obtenerse con pinzas quirúrgicas, aquí se puede usar la luz de Wood para poder iluminar aquellos pelos parasitados por especies de dermatofitos. Las muestras de *uñas* infectadas se obtienen raspando las porciones superficiales con el filo de una hoja de bisturí antes de recoger una muestra más

profunda donde es más probable encontrar elementos micóticos. Las muestras se colocan en una caja petri estéril, o en un sobre.

Los sitios de donde se toman las muestras deben limpiarse con un algodón con alcohol al 70% para eliminar contaminantes bacterianos superficiales. (1)

#### **1.4 Muestras subcutáneas**

*Exudados* se obtienen por medio de la aspiración de aguja y jeringa estériles. Cuando se usa un hisopo para la recolección del material, debe extenderse hacia la profundidad de la herida sin tocar los bordes cutáneos adyacentes. La muestra debe colocarse inmediatamente en un medio de cultivo apropiado y si esto no es posible se debe de colocar en un medio de transporte de anaerobios. Deben de efectuarse cultivos para aerobios y anaerobios, siendo necesarios éstos últimos para recuperar si es que existen bacterias filamentosas y ramificadas del genero *Actinomyces*.

*Trasudados*: se obtienen igual que los exudados pero si es muy grande la cantidad de liquido en ambos casos se recomienda el uso de envases estériles, a menudo tanto Trasudados como exudados contienen sustancias semejantes a la tromboplastina y precursores de fibrina, pueden agregarse aproximadamente 10 ml de heparina estéril 1:1 al envase para evitar la coagulación de la muestra. Debe dejarse sedimentar el liquido a temperatura ambiente durante una o más horas. Se tira el sobrenadante y se toman alícuotas del sedimento (10-15ml) para la centrifugación y finalmente de 0.5-1ml del sedimento centrifugado se siembra en la superficie de medios adecuados. (1)

**Líquido cefalorraquídeo** Es recolectado por medio de la punción lumbar, se recogen tres tubos estériles separados de LCR; el primer tubo se usa para la determinación de la concentración de diversos constituyentes químicos, el segundo para el recuento de células y el tercero para cultivo, se utiliza el tercero ya que cualquier bacteria contaminante introducida con el pasaje de la aguja ha sido arrastrada a los otros dos tubos. Las muestras deben procesarse rápidamente si no es posible la muestra no debe refrigerarse se debe de dejar a temperatura ambiente o en una incubadora a 30°C ya que el líquido rico en proteínas y carbohidratos sirve como medio para la viabilidad de los microorganismos.

**Sangre:** Cuando se sospecha de una septicemia micótica se necesitan medios especiales para una recuperación óptima de hongos. Se dispone de numerosos sistemas de hemocultivo; sin embargo, todos los sistemas deben estar abiertos a aire atmosférico e incubarse a 30°C para aumentar la tasa y tiempo de recuperación.

La recuperación de hongos de hemocultivos puede mejorarse si se usa una botella bifásica que contiene 60 ml de caldo con infusión de cerebro-corazón y agar cerebro-corazón inclinado. Deben agregarse 10ml de sangre a esta botella un algodón estéril, una aguja taponada colocada en el tapón de goma que sirva como una ventana para el aire atmosférico e incubarse la botella en posición vertical a 30°C. Las botellas se examinan diariamente y la superficie del agar se inunda con la mezcla de caldo y sangre para su cultivo. Los cultivos se incuban durante 30 días. Si se usa sólo una botella con caldo, puede ser difícil detectar un crecimiento temprano de los hongos ya que muchas especies no producen turbidez.

El *Isolator* es un sistema de centrifugación y lisis con el cual se ha observado una mejor recuperación de hongos y otros microorganismos de hemocultivos. El *Isolator*

utiliza un tubo que contiene componentes que lisan leucocitos y eritrocitos y también inactiva complemento y quizás otros agentes antibacterianos en plasma. Una vez lisadas, las células liberan a los microorganismos contenidos en su interior y el paso de centrifugación sirve para concentrar a los microorganismos en la muestra de sangre. Este concentrado se inocula en la superficie de medios de cultivo apropiados. Las principales ventajas de este sistema son que los hongos se detectan con una mayor frecuencia y se reduce notablemente el tiempo para observar resultados obtenidos.<sup>(1)</sup>

### **1.5 Muestra de tejidos**

**Biopsias:** Se obtienen por medio de cirugía ya sea en el quirófano o en el consultorio, y estas muestras deben colocarse en una gasa estéril de 4x4 humedecida con solución fisiológica, si la muestra no puede procesarse, se debe colocar en un envase que tenga tapa para evitar que se reseque. No se deben de colocar en solución salina para inyección que contengan sustancias antimicrobianas.

Las muestras deben homogenizarse antes de que se inoculen en el medio de cultivo. Se deben de inocular aproximadamente 0.5-1 ml del homogenizado y se incuban a 30°C.

**Médula ósea:** Se obtiene por medio de aspiración o biopsia, por medio de la aspiración se realiza un frotis y luego se retiran de 3-5 ml y se ponen en un tubo estéril con heparina 1:1000. La médula obtenida por biopsia sigue el mismo tratamiento anteriormente descrito.<sup>(1)</sup>

## 1.6 INOCULACION EN ANIMALES

La inoculación en animales se usa en investigación, pero también puede ser útil de diagnóstico (las inoculaciones experimentales se hacen indistintamente con el material infeccioso o con cultivos). Los animales que se usan mayormente son conejos, ratas, ratones, cobayos y hamsters.

Para la inoculación se prepara una suspensión del hongo problema (ya sea del material infeccioso o del cultivo, si es del material infeccioso se le agregan antibióticos como cloramfenicol, ciclohexamida) en solución salina, unos 100mg/ml.

Esta solución puede ser inoculada por diferentes vías como:

- Subcutánea
- Intravenosa
- Intraperitoneal
- Intratesticular
- Intracraneal
- Superficial

**SUBCUTANEA:** Se sujeta al animal y se le alza un poco la piel y se inyecta con aguja de insulina en esa área sin llegar al músculo.

**INTRAVENOSA:** Es más sencilla en los conejos y se inyecta en las venas del pabellón auricular.

**INTRAPERITONEAL:** Se sostiene al animal inmovilizándole la cola y las patas, poniendo de manifiesto el abdomen, se inclina al animal con la cabeza hacia abajo para que los órganos y vísceras no se lastimen y se inyecta en la línea media del abdomen.

**INTRATESTICULAR:** Se presiona la cavidad abdominal para hacer visible los testículos para inyectar la suspensión.

**INTRACEREBRAL:** Se anestesia al animal con éter o cloroformo, se inmoviliza la cabeza, se inyecta en la parte posterior del cráneo en la parte derecha 0.02ml de muestra. La muerte en las primeras 24 horas indica traumatismo por la inoculación.

**INTRAMUSCULAR:** Se agarra al animal inmovilizando la cola y las patas y se le inyecta en músculo sin llegar a hueso, esta inoculación se realiza sobre todo en el muslo con jeringa para insulina.

**SUPERFICIAL:** Esta sólo se usa para dermatofitos se depila y escarifica la piel del animal en donde se va a inocular, después de esto se unta con miel de abeja (esta contiene al dermatofito).

La presencia de lesiones es indispensable para asegurar la patogenicidad del hongo. Si después de un tiempo el animal no muere se sacrifica. En la necropsia se

intenta obtener el cultivo del hongo inoculado (retrocultivo) y otra parte de los órganos se fija para el estudio histopatológico.

Se ha observado que usando el 5% de mucina gástrica de cerdo en la suspensión se aumenta la virulencia del microorganismo.

También actualmente se ha comprobado que la inoculación en huevos de gallina es un medio bueno para el primoasilamiento de hongos patógenos y para su cultivo en la forma en la cual parasita, esto por la temperatura y los nutrientes que tiene el huevo.

### EJEMPLOS DE ANIMALES QUE SE USAN PARA DIAGNOSTICO DE ALGUNAS PATOLOGIAS Y TIPO DE INOCULACION

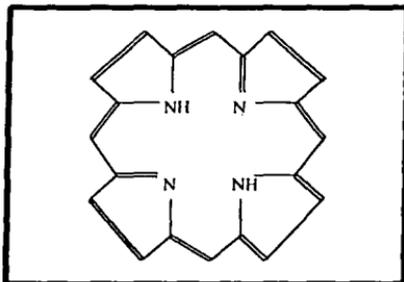
ANIMAL	TIPO INOCULACION	PATOLOGIA
Cobayo	Intratesticular	Blastomicosis Coccidioidomicosis Histoplasmosis Paracoccidioidomicosis
Ratón	Intraperitoneal	Histoplasmosis Criptococosis Cromomicosis Esporotricosis (Macho)
Ratón	Intracraneal	Criptococosis
Ratón	Intravenosa	Criptococosis
Rata	Intraperitoneal	Esporotricosis (Macho)
Hamsters	Intraperitoneal	Esporotricosis (Macho)
Cobayo	Superficial	Dermatomicosis
Ratón	Intramuscular	Micetoma

## 1.7 LUZ DE WOOD

La luz de Wood es un recurso para el diagnóstico de micosis superficiales en el consultorio, se utiliza sobre todo para casos de tiña de la cabeza, pero existe un inconveniente de que no todos los agentes causales generen fluorescencia ante esta.

Cuando se examinan los pelos es importante tomar en cuenta que se pueden generar falsos negativos cuando estos pelos tienen petrolatos (brillantinas, pomadas, etc) ya que se genera fluorescencia azul-violeta, o cuando el paciente por algún proceso tiene un exceso de descamación o cuando el cuarto o consultorio está muy iluminado.

La luz de Wood es luz ultravioleta de muy baja frecuencia (radiaciones de unos 365 nm) que al ponerse en contacto con los agentes causales que contienen sustancias de tipo porfirinicas, en el caso de los dermatofitos la sustancia fluorescente es la pteridina la cual es un compuesto orgánico con estructura cíclica que cuando se irradia con una longitud de onda adecuada, quedan excitados los electrones dentro de la molécula y cambian hacia un estado de mayor energía y cuando los electrones vuelven a su estado basal, la energía se libera en forma de fotones, cuyo nivel energético es menor (mayor longitud de onda) que el de la luz excitante, poniendo de manifiesto el grado de parasitación.<sup>(2,4,11)</sup>



Estructura básica de las porfirinas

**PATOLOGIAS EN LAS CUALES SE UTILIZA PARA SU DIAGNOSTICO**

- 1) Tiña de la cabeza
- 2) Pitiriasis versicolor
- 3) Eritrasma

**FLUORESCENCIA DE ACUERDO A LOS DIFERENTES TIPOS DE PATOLOGIAS EN LA QUE SE USA PARA SU DIAGNOSTICO**

Tiña de la cabeza	Verde
Microspórica	Amarillo-verdosa
Favus	No hay fluorescencia
Tricofítica	Amarillo-verdosa
Pitiriasis versicolor	Rojo coral
Eritrasma	

**Fluorescencia con Luz de Wood(6)**

\*Lampara de luz de 365nm en cuarto oscuro.

\*En el caso de eritrasma los pacientes no deben bañarse cuando van a ser expuestos a la luz ya que la sustancia fluorescente es soluble al agua (4)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 1.8 METODO DE KJELDAHL

Con éste método se determina la cantidad de Nitrógeno que existe en una muestra cualquiera que ésta sea.

### Procedimiento:

La muestra se digiere con ácido sulfúrico concentrado, sulfato de potasio que ayuda a la oxidación por la elevación de la temperatura de ebullición y un catalizador metálico.

Terminando la oxidación el nitrógeno se convierte en sulfato ácido de amonio, después se alcaliniza ésta solución. (Cuando se emplea mercurio como catalizador metálico se debe de utilizar tiosulfito de sodio para evitar que se formen complejos amoniacales de mercurio). El amoniaco liberado se destila con vapor de agua y se recoge en un vaso con ácido bórico o con una cantidad conocida de solución valorada de ácido clorhídrico; y la cantidad de amoniaco destilada se determina por acidimetría y éste va a ser directamente proporcional al nitrógeno de la muestra.(1)

## 1.9 FENOMENO DE SPLENDORE-HOEPPLI

Este fenómeno corresponde a una reacción que se lleva a cabo entre el antígeno y el anticuerpo. El fenómeno consiste en que las estructuras fúngicas se encuentran rodeadas de material eosinófilo fibrinoide con una distribución radiada. Este fenómeno es característico de varias patologías, pero, sin embargo puede ser un elemento inespecífico y presentarse en cualquier hongo o parásito.<sup>(6)</sup>

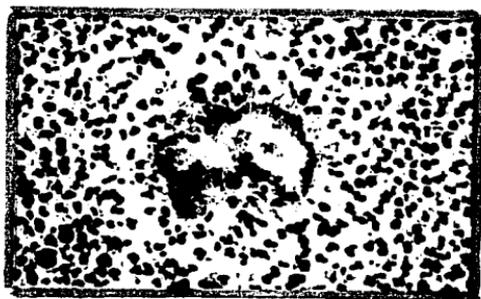
PATOLOGIAS EN LAS QUE ES CARACTERÍSTICO EL FENOMENO DE SPLENDORE-HOEPPLI	
Micetoma	Este fenómeno es el que forma las clavos en los granos actinomicóticos por <i>Nocardia</i> y <i>Actinomyces</i> .
Esporotricosis	El fenómeno se observa rodeando a una levadura y da lugar al conocido cuerpo asteroide.
Ficomicosis	Aquí el fenómeno se presenta rodeando a un filamento.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 1.9.2 Ilustraciones



Fenómeno de Splendore-Hoeppli en una Esporotricosis



Fenómeno de Splendore-Hoeppli en un micetoma



Fenómeno de Splendore-Hoeppli en Esporotricosis (1)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 1.10 MICROCULTIVO

El microcultivo puede hacerse en un cubreobjetos o en un portaobjetos. La técnica de cultivo en cubreobjetos es la siguiente:

Se trasplanta el trozo de un cultivo esporulado a estudiar en un tubo que contenga el medio de cultivo licuado, luego con un asa se depositan varias gotas de este medio en el centro de un cubreobjetos y se las extiende circularmente, después se introduce en una cámara húmeda, en donde deja que se madure, se incuba a 37°C durante una semana con el objeto de hacer que el cultivo se seque y se adhiera perfectamente al cubreobjeto, cuando se seca se fija el cultivo con alcohol etílico y se deja evaporar, una vez que está fijado se le pone una gota de lactofenol y se le bordea sobre un portaobjeto con luten de R. de Noyers, el preparado puede colorearse de diferentes maneras.

Otro método es el de *Henrici*, el cual consiste en realizar tres bordes en un portaobjeto esterilizado con parafina o con luten de R. de Noyers, dejando un espacio aproximado del tamaño de un cubreobjeto, luego se adhiere con calor un cubreobjeto, para que se tenga una cámara, ésta se llena con una pipeta Pasteur hasta sus dos tercios con una suspensión de esporos en medio gelosa licuado, y se deja incubar.

## **MICROCULTIVO ILUSTRADO**

**A:** Obtención de discos de agar estéril

**B:** Preparación de una cámara de húmeda estéril usando una Caja petri con agar agar al 2% colocando un portaobjetos estéril encima

**C:** Método alternativo en donde se coloca papel filtro en el fondo de la caja y el portaobjetos se apoya en varillas de vidrio. Los discos y el papel se mantienen húmedos con agua estéril durante el periodo de incubación .

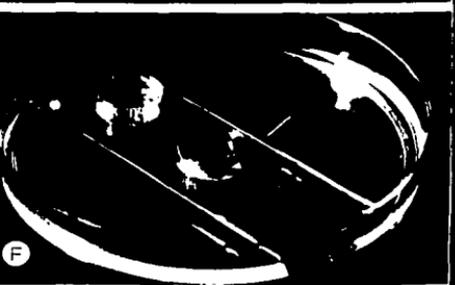
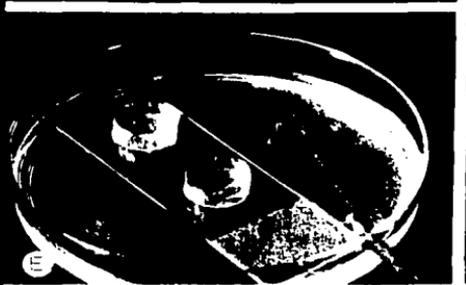
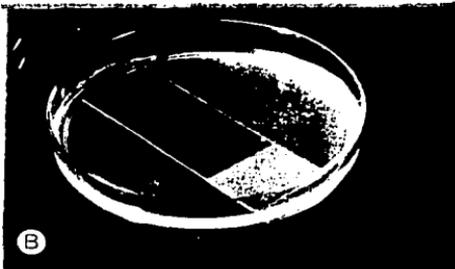
**D:** Colocación de los discos de agar en el portaobjetos

**E:** Inoculación de la superficie del bloque de agar , se inoculan cuatro cuadrantes.

**F:** Colocación de un cubreobjetos encima del bloque del agar antes de la incubación

**G:** Aspecto de un microcultivo

**H:** Colocación del cubreobjetos de un microcultivo en azul de lactofenol para el examen microscópico.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

5

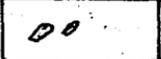
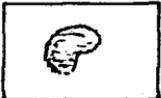
### 1.11 EXAMEN DIRECTO CON KOH AL 10%

El álcali fuerte desintegra cualquier tejido y moco de la muestra en la que se presume que se encuentran los hongos, ya que el álcali fuerte desnaturaliza a la queratina, por lo que permite observar si es que están presentes en estas; las estructuras fúngicas no se desintegran ya que la pared de los hongos esta compuesta en su mayor parte por quitina y ésta no es sensible al álcali.Ⓞ

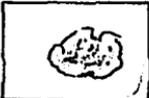
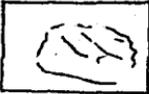
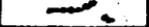
### MONTAJE CON KOH

- 1.-Colocar una gota de KOH al 10% (se puede realizar con KOH al 20%). En un portaobjetos, y mezclar con una pequeña cantidad del material a examinar:  
(piel, raspado de uñas, pelos,etc).
- 2.- Pasar suavemente el portaobjetos a través de la llama baja de un mechero Bunsen para facilitar el aclaramiento (no hervir).
- 3.- Se coloca un cubreobjetos sobre la gota y dejar reposar a temperatura ambiente unos 30 min, si la muestra es gruesa o viscosa.
- 4.- Examinar al microscopio en busca de estructuras fúngicas como hifas.

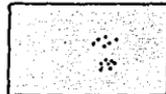
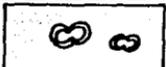
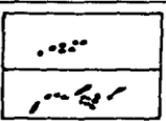
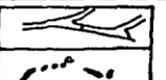
**PATOLOGIAS EN LAS CUALES SE UTILIZA PARA SU DIAGNOSTICO Y TIPO DE PARASITACION**

PATOLOGIA	TIPO DE PARASITACION	OBSERVACION AL MICROSCOPIO
<p>Tinea capitis (tiña de la cabeza)</p>	<p>Endotrix (esporas en el interior del pelo) Ectotrix (esporas en el exterior del pelo). En algunas ocasiones se llegan a observar filamentos</p>	
<p>Tinea corporis (Tiña del cuerpo) Tinea cruris (Tiña de la ingle) Tinea manum (Tiña de la mano) Tinea pedis (Tiña del pie) Tinea unguium (Tiña de las uñas) Tinea barbae (Tiña de barba y bigote)</p>	<p>Filamentos y arthroconidias</p>	
<p>Tinea nigra (Tiña negra)</p>	<p>Filamentos macrosifonados tabicados de color verde o marrón.</p>	
<p>Tricomicosis</p>	<p>Concreciones bacterianas alrededor del tallo piloso</p>	
<p>Micetoma</p>	<p><i>N.asteroides</i>, <i>N.brasiliensis</i> <i>N.otitis-cavarium</i> granos microsifonados de 50-150µ color blanco-amarillento forma fetoide/arrionado con clavos en la periferia</p> <p><i>A.madurac</i> Granos de 0.5-5mm de color blanco-amarillento, forma redonda irregular, de consistencia blanda, se observan flecos.</p>	  

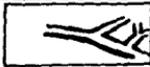
TESIS CON FALLA DE ORIGEN

PATOLOGIA	TIPO DE PARASITACION	OBSERVACION AL MICROSCOPIO
	<p><i>A. pelletieri</i> grano microsi-fonado de 200-400<math>\mu</math> , color rojo coral, redondo.</p> <p><i>S.somaliensis</i>. Grano de 0.5-1mm, color blanco grisáceo de forma redonda y muy duro</p> <p>Granos cunicéticos negros de tamaño grande 0.5-5mm de forma irregular de color negro o café ocre con filamentos. (<i>M.mycetomatis</i>, <i>M.grisea</i> <i>E.jeanselmi</i>).</p> <p>Granos eumicéticos blancos son de tamaño grande 0.5-3mm hialinos, de forma irregular, de color blanco-amarillento. (<i>P.boydii</i>, <i>Acremonium sp.</i>, <i>Fusarium sp.</i>).</p>	   
Piedra blanca	Concreciones alrededor del pelo formadas por esporas	
Piedra negra	Nódulos pigmentados café con ascas con 2 o más ascoporas.	
Cromomicosis	Células fumagoides, estructuras morenas de doble membrana.	
Rinosporidiosis	Esférulas de 300-400 $\mu$	
Lobomicosis	Levaduras en cadena de 8-12 $\mu$	
Coccidioidomicosis	Esférulas de doble membrana de aproximadamente 20-70 $\mu$	

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

PATOLOGIA	TIPO DE PARASITACION	OBSERVACION MICROSCOPICA
Histoplasmosis Americana y africana	Levaduras intracelulares, poco útil en la americana porque son muy chicas, de doble membrana	
Paracoccidioidomycosis.	Células multigemantes como "ratón miguelito", "huella de oso", "timón de barco".	
Blastomicosis	Levaduras multigemantes del mismo tamaño que la célula madre	
Candidosis	<i>C. glabrata</i> (++++) blastoconidias, <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. parapsilosis</i> pseudohifas y blastosporas.	
Geotricosis	Hifas tabicadas con artrosporas	
Entomoforomicosis -Conidiobolomicosis -Basidiobolomicosis	Hifas cenociticas Hifas anchas de pared gruesa con pocos septos y algunas granulaciones.	
Feohifomicosis	Filamentos macrosifonados gruesos de color café y en ocasiones acompañados de blastosporas	
Queratitis micótica	<i>Fusarium sp</i> y <i>Aspergillus sp</i> hifas anchas tabicadas y poco ramificadas. <i>Candida</i> pseudofilamentos y células gemantes	
Otomicosis	<i>Aspergillus sp</i> , hifas microconidias y pueden llegar a existir cabezas aspergiliares. <i>Candida</i> , blastosporas y pseudohifas. En el resto de los hongos no se observan formas de reproducción, solo hifas tabicadas.	

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

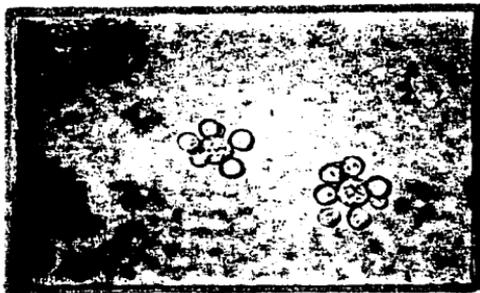
PATOLOGIA	TIPO DE PARASITACION	OBSERVACION MICROSCOPICA
Mucormicosis	Hifas cenociticas anchas y de pared gruesa, y dicotomisadas.	
Aspergilosis	En el caso <u>pulmonar</u> se ven hifas conidias y cabezas aspergilaes, en <u>onicomicosis y úlceras necróticas</u> hifas delgadas, tabicadas y hialinas	

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

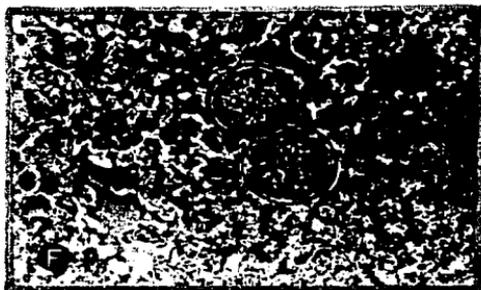
## ILUSTRACIONES



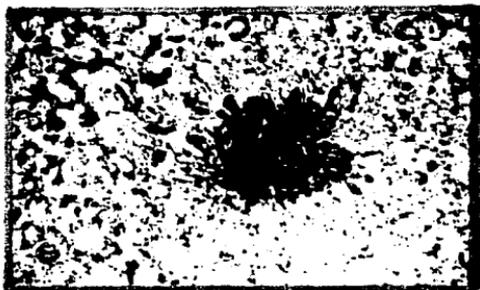
Examen directo con KOH de dermatomicosis



Examen directo con KOH Blastomicosis



Examen directo con KOH de Coccidioidomicosis



Examen directo de una Nocardiosis (11)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **CAPITULO 2**

### **“ TINCIONES ”**

## 2.1 INTRODUCCION A LAS TINCIONES

Para teñir los microorganismos se dispone de un gran número de compuestos orgánicos coloreados (colorantes). En general, estos compuestos son un tanto complejos en cuanto a su estructura molecular, de acuerdo con estos se pueden clasificar en grupos como colorantes de Trifenilmetano, colorantes de oxacina y colorantes de tiacina.

Una clasificación más práctica para el citólogo es de acuerdo con el comportamiento químico del colorante, es decir, ácido, básico y neutro. Un colorante ácido (aniónico) es aquel donde la balanza de la carga sobre el ión colorante es negativa; un colorante básico (catiónico) es aquel donde la carga llevada por el ión colorante es positiva. Un colorante neutro es una sal compuesta de un colorante ácido y un colorante básico, como el eosinato de azul de metileno. En general, los colorantes ácidos tiñen a los componentes celulares básicos y los colorantes básicos a los componentes celulares ácidos.

El proceso de la tinción supone una reacción de intercambio de iones entre el colorante y los sitios activos de la superficie o del interior de la célula. Los iones teñidos del colorante reemplazan a otros iones en los componentes celulares. Algunos agrupamientos químicos de proteínas y ácidos nucleicos celulares pueden participar en

la formación de sales con iones cargados positivamente con  $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$  y de ésta manera es posible ver éstas áreas periféricas de la célula que llevan una carga negativa en combinación con iones cargados positivamente. Ejemplo:



En un colorante básico, el ión coloreado está cargado positivamente (catión); si representamos este ión por el símbolo  $\text{MB}^+$  que en realidad es una sal, esta sal puede ser un cloruro y se puede representar así:



El intercambio iónico que tiene lugar en la célula durante la tinción se observa mediante la siguiente ecuación en la cual el catión  $\text{MB}^+$  reemplaza al catión  $\text{Na}^+$ .



Esta es una forma general de dar explicación al porque se tiñen las células de un color o de otro. Los colorantes ácido no tiñen a la célula y por tanto pueden ser usados para impartir un fondo de contraste Los colorantes básicos tiñen las células bacterianas uniformemente, a menos que el RNA del citoplasma sea destruido (15)

## 2.2 TINCIÓN CON HIDROXIDO DE POTASIO Y AZUL DE PARKER

Es igual que en el montaje con KOH se desintegra el tejido, ya que se desnaturalizan las proteínas, pero la diferencia es que aquí se tiñe la estructura del hongo con el azul, ya que la tinta es ácida y va a colorear los compuestos básicos de los hongos, esta tinción sirve para poner de manifiesto a los hongos lipofílicos (*P.ovale* y *P.orbicolare*). Porque contienen en su pared compuestos con los que realizan complejos coloridos.

### METODO<sup>(a)</sup>

Reactivos:

a) Hidróxido de potasio al 10% : 9gr de hidróxido de potasio  
90ml de agua destilada

b) Tinta azul de Parker 10ml

Mezclar a y b

### TECNICA DE TINCIÓN<sup>(a)</sup>

- 1.- Colocar una gota de la mezcla a/b en un portaobjetos, y mezclar con una pequeña cantidad del material a examinar: (piel, raspado de uñas, pelos, etc).
- 2.- Pasar suavemente el portaobjetos a través de la llama baja de un mechero Bunsen para facilitar el aclaramiento (no hervir).

- 3.- Se coloca un cubreobjetos sobre la gota y dejar reposar a temperatura ambiente unos 30 min, si la muestra es gruesa o viscosa.
- 4.- Examinar al microscopio en busca de estructuras fúngicas (blastosporas y filamentos).

**PATOLOGIAS EN LAS CUALES SE UTILIZA PARA SU DIAGNOSTICO Y OBSERVACION AL MICROSCOPIO**

PATOLOGIA	OBSERVACION AL MICROSCOPIO
Pitiriasis versicolor	Blastosporas y filamentos cortos conocidos como "albóndigas con spaghetti"
Dermatitis seborréica <i>(Pityrosporum sp)</i>	Blastosporas ligeramente alargadas de 2-4 $\mu$ por 1-2m de ancho con gemas pequeñas.
Psoriasis <i>(Pityrosporum sp)</i>	Blastosporas ligeramente alargadas de 2-4 $\mu$ por 1-2m de ancho con gemas pequeñas.
Foliculitis <i>(Pityrosporum sp)</i>	Blastosporas ligeramente alargadas de 2-4 $\mu$ por 1-2m de ancho con gemas pequeñas.
Blefarconjuntivitis <i>(Pityrosporum sp)</i>	Blastosporas ligeramente alargadas de 2-4 $\mu$ por 1-2m de ancho con gemas pequeñas.
Dacriocistitis <i>(Pityrosporum sp)</i>	Blastosporas ligeramente alargadas de 2-4 $\mu$ por 1-2m de ancho con gemas pequeñas.
Onicomycosis <i>(Pityrosporum sp)</i>	Blastosporas ligeramente alargadas de 2-4 $\mu$ por 1-2m de ancho con gemas pequeñas.

### 2.3 TINCION DE PAS (Acido peryódico de Schiff)

Es una tinción diferencial, que permite observar las estructuras fúngicas en color rojo, esto es, ya que los grupos hidroxilo adyacentes de los polisacáridos de las membranas fúngicas en presencia del ácido peryódico de Schiff se oxidan a aldehidos.

Se usa un colorante de contraste o de fondo que es el verde de malaquita o verde brillante, este colorante no reacciona con las estructuras fúngicas.<sup>(6)</sup>

#### METODO <sup>(6)</sup>

##### Reactivos:

- a) Acido peryódico: Solución acuosa al 1% de ácido peryódico  
ácido peryódico 1gr  
agua destilada 100ml
- b) Reactivo de Schiff: Fucsina básica 2g. Disuelta en agua destilada  
hirviendo 400ml  
Dejar enfriar hasta 50°C y agregar 10ml de HCl 2N y  
metabisulfito de sodio anhidro, 4g.  
Dejar la solución en reposo en la obscuridad durante la  
noche y agregar entonces 1g de carbón animal, filtrar  
Si al extender el colorante y secar toma un color rosa, agregar  
15ml de HCl 2N.

c) Agua sulfurosa: Agua destilada 50ml

Acido clorhídrico concentrado 0.5ml

Metabisulfito de sodio 0.2g.

### **TECNICA DE TINCION:**(6.7)

- Desparafinar
- Lavar con alcohol absoluto
- Lavar con alcohol al 70%
- Acido peryódico por 5 min. a temperatura ambiente
- Lavar con agua por 15 min.
- Cubrir con reactivo de Schiff de 15-45 min.
- Agua sulfurosa (3 baños de 5min. c/u).
- Lavar con agua por 10 min.
- Tinción de fondo ( verde de malaquita o brillante al 0.02%).
- Lavar con agua
- Lavado con alcohol absoluto
- Lavado con Tolueno
- Bálsamo de Canadá
- Cubrir con bálsamo de Canadá y cubre objetos.

## 2.4 TINCIÓN DE GROMORI-GROCOTT

Es una tinción específica ya que, la impregnación argéntica con nitrato de metenamina de plata colorea intensamente las paredes del hongo, no así las fibras reticulares ya que en presencia de ácido crómico los grupos hidroxilo adyacentes de los polisacáridos en la pared celular micótica se oxidan a aldehídos y estos forman un complejo oscuro de nitrato de plata-metenamina. (1,2)

### METODO (1,7)

#### Reactivos:

- a) Solución nitrato de plata(5ml): hexametilenotetramina al 3% (100ml)  
el precipitado blanco desaparece mediante agitación. Se diluyen 25ml de esta solución en 25ml de agua destilada. Al momento del empleo se agregan 2ml de Borato de sodio al 5%.

(se prepara en el momento)

- b) Agua acidulada: Agua con ácido acético 1:500  
c) Acido crómico al 5%  
d) Bisulfito de sodio al 1%  
e) Cloruro de oro al 0.1%  
f) Tiosulfato al 2%

## **TECNICA DE TINCION<sup>(6,7)</sup>**

- Desparafinar
- Enjuagar con agua destilada
- Oxidar durante 1 hora en ácido crómico al 5%
- Lavar con agua
- Bisulfito de sodio al 1% para eliminar el exceso de ácido crómico
- Lavar con agua 5-10min.
- Agua destilada 3 o 4 veces
- Solución de nitrato de plata, dejar a 58°C de 30-60 min. (los corte toman color amarillo castaño)
- Enjuagar con agua bidestilada 6 veces
- Cloruro de oro al 0.1% de 2-5 min.
- Enjuagar con agua bidestilada
- Fijar la plata con una solución de tiosulfato al 2% de 2-5 min.
- Agua corriente
- Agua acidulada
- Verde brillante (tinción de fondo o contraste)
- Carbonato de litio
- Enjuagar con agua destilada
- Enjuagar con alcohol absoluto.
- Tolueno y bálsamo de Canadá

## **2.5 TINCION DE HEMATOXILINA-EOSINA (HE)**

Esta técnica de tinción es una técnica diferencial ya que se utilizan dos tipos de colorantes uno básico como la hematoxilina y uno ácido como la eosina, la hematoxilina va a reaccionar con compuestos ácidos como la cromatina nuclear de las células y la eosina reacciona con sustancias básicas como estructuras citoplasmáticas.<sup>(14)</sup>

Al igual que otras tinciones el colorante ácido (eosina) va a reaccionar con los grupos hidroxilo de los polisacáridos de la pared del hongo, pero en otros casos la hematoxilina es la que va a teñir la pared por lo que se demuestra que no se puede generalizar ya que cada microorganismo es diferente. Un ejemplo de esto son los granos de micetoma en la que cada especie se tiñe de diferente manera debido a sus características físicas como dureza, tamaño y químicas como estructura de la pared, etc.

### **METODO<sup>(15)</sup>**

#### **Reactivos:**

- a) Hematoxilina al 0.2%
- b) Alcohol clorhídrico
- c) Azafrán alcohólico al 2.5%
- c) Eosina azulosa 1:5000

### **TECNICA DE TINCION<sub>10</sub>**

- Hematoxilina al 0.2% por 10 min.
- Lavar con agua por 10 min.
- Diferenciar con alcohol clorhídrico
- Azular con carbonato de litio
- Eosina azulosa 1:5000 por 5 min.
- Azafrán alcohólico al 2.5% (solo unas gotas)
- En caso de coloración excesiva agregar alcohol absoluto o del 96
- Tolueno
- Resina

**2.6 MICOSIS Y TIPOS DE MUESTRA EN LAS QUE SE PUEDEN UTILIZAR LAS TINCIONES DE PAS, GROCOTT Y HEMATOXILINA-EOSINA PARA SU DIAGNOSTICO.**

MICOSIS	TINCION	MUESTRA	OBSERVACION MICROSCOPICA
P. versicolor	PAS	Biopsia	Proceso ligeramente inflamatorio, las estructuras fungicas se encuentran en la capa cornea y se observan filamentos y blastosporas en capa córnea.
Tiña negra	Hematoxilina-eosina	Biopsia (no se utiliza mucho)	Se observan hifas y esporas pigmentadas en capa córnea
Dermatofitosis	PAS, Grocott	Biopsia (casos profundos)	Se observan esporas y filamentos con un proceso inflamatorio en capa córnea.
Micetoma	Hematoxilina-eosina	Biopsia	<p>Granuloma crónico inespecifico en dermis, en epidermis hay un infiltrado granulomatoso con microabscesos de PMN acompañado de plasmocitos y linfocitos, en los microabscesos se encuentran las estructuras fungicas conocidas como granos, pero cada agente etiológico se tiñe diferente.</p> <p><u>Granos de <i>Nocardia</i> sp:</u> Son lobulados se tiñen ligeramente en la periferia de lila (hematoxilina) y en el centro toma la eosina (rosa)</p> <p><u>Grano <i>A. madurae</i>:</u> Es grande tiene gran afinidad por la hematoxilina por lo que es de color lila o violeta intenso</p> <p><u>Grano <i>A. pelletieri</i>:</u> Es grande tiene poca afinidad por la hematoxilina, en el centro queda ligeramente pálido y su disposición es característica, porque deja espacios o hendiduras dando el aspecto de "plato roto"</p>

MICOSIS	TINCION	MUESTRA	EXAMEN MICROSCOPICO
			<p><u>Grano <i>S.somaliensis</i></u>: Es grande se tiñe poco con la hematoxilina, es de consistencia muy dura por lo que da una apariencia de "papas ruffles" al cortarse en el microtomo</p> <p><u>Grano <i>A. mycetomatis</i></u>: Es grande macrosifonado se tiñe ligeramente y de manera uniforme con la eosina, su consistencia puede ser filamentososa o vesiculosa.</p> <p><u>Grano <i>A. grisea</i></u> Grande, macrosifonado, se tiñe con la eosina en la periferia y en el centro ligeramente con la hematoxilina, presenta gran cantidad de vesículas.</p> <p><u>Granos de <i>P. boydii</i>(<i>S. apiosperum</i>), <i>Acremonium sp</i> (<i>Cephalosporium</i>) y <i>Fusarium sp.</i></u> No toman la hematoxilina y en cambio si la eosina, pero sólo por la periferia quedando el centro decolorado.</p>
Esporotricosis	PAS, Grocott	Biopsia	En ocasiones células gemantes en medio de cuerpos asteroides y un halo de irradiación compuesto de material cosinofílico, hay una combinación de imagen granulomatosa y reacción piógena
Coccidioidomicosis	PAS, Grocott Hematoxilina-eosina	Biopsia	La presencia de las estructuras fúngicas se encuentran por lo general en los granulomas; éstas estructuras son esférulas con endosporas

MICOSIS	TINCION	MUESTRA	EXAMEN MICROSCOPICO
Histoplasmosis	PAS, Grocott	Espudo, secreciones	Se observan estructuras levaduriformes dentro de PMN que miden entre 1-2 $\mu$ de diámetro con un halo refringente que simula una cápsula de ahí el nombre del agente etiológico
		Biopsia	Son de utilidad en casos mucocutáneos y ganglionares, se observa una reacción inflamatoria con numerosos PMN y macrófagos con levaduras intracelulares.
Histoplasmosis Africana	PAS, Grocott	Biopsia	Granuloma tuberculoide con gran cantidad de células gigantes(200 $\mu$ ) llenas de acúmulos de levaduras de tamaño grande (10-15 $\mu$ )
Paracoccidiosis	PAS, Grocott	Biopsia	Se observan granulomas tuberculoideos formados por células tipo Langhans, a cuerpo extraño y epiteloideos, linfocitos y microabscesos de PMN; a este nivel se encuentran los elementos fúngicos que son células multigemantes.
Blastomycosis Norteamericana	PAS, Grocott Hematoxilina-eosina	Biopsia	Granulomas compuestos por células gigantes, epiteloideos y linfocitos en el centro de esta imagen se encuentran las células monogemantes de paredes gruesas unidas por una base ancha, estas son las estructuras fúngicas.
Actinomicosis	PAS, Grocott	Biopsia	A la histopatología se observan granos microsifonados de gran tamaño(50-3000 $\mu$ ).
Rinosporidiosis	PAS, Grocott Hematoxilina-eosina	Biopsia	Reacción inflamatoria crónica células gigantes dispuestas alrededor de los elementos fúngicos (esferulas de 100-300 $\mu$ de diámetro con doble membrana y artroconidias.

MICOSIS	TINCION	MUESTRA	OBSERVACION MICROSCOPICA
Lobomicosis	PAS, Grocott	Biopsia	Granulomas subepidérmicos formados por histiocitos, células gigantes y extensas zonas de fibrosis hialina, las estructuras fúngicas por lo general se encuentran dentro de los macrófagos y células gigantes, las estructuras son células de aspecto levaduriforme monogemante o con disposición en cadenas
Candidosis	PAS, Grocott	Exudados, escamas, sangre, esputo, orina, LCR, etc.	Grandes acúmulos de blastosporas de aproximadamente 2-4 $\mu$ de diámetro y pseudomicelios cortos o largos en caso de uñas solo se observan blastoconidias en acúmulos
		Biopsia	Sólo en casos cutáneos profundos hay granuloma tuberculoide acompañado de estructuras fúngicas (blastosporas y pseudomicelios).
Criptococosis	PAS, Grocott Hematoxilina-cosina	Biopsia	Invasión histiositaria por levaduras de formas irregulares con yemas simples unidas por un tallo capilar rodeadas por una cápsula mucóide gruesa, también puede llegar a darse la extraña asociación de formas esféricas e hifas.
Geotricosis	PAS, Grocott	Biopsia	Granuloma tuberculoide con hifas tabicadas y artroconidias, éstas pueden dar un aspecto redondeado por lo que puede confundirse con Candidosis.
Mucormicosis	PAS, Grocott	Biopsia	Se aprecia trombosis arterial y necrosis y pequeñas zonas de infarctación, no importando el agente etiológico se presenta con clásicas hifas cenocíticas dicotomisadas de 10-25 $\mu$ de diámetro

MICOSIS	TINCION	MUESTRA	OBSERVACION MICROSCOPICA
Conidiobolomycosis.	PAS, Grocott	Biopsia	En la reacción inflamatoria aguda y crónica en la cual se encuentran los elementos fúngicos fagocitados estos son hifas cortas gruesas de 8-20m de diámetro cenocíticas o con pocos septos, es característico un halo eosinofílico conocido como fenómeno de Splendore-Hoepli (Ver pag 22 )
Aspergilosis	PAS; Grocott Hematoxilinaeosina	Biopsia	Granulomas inflamatorios en úlcera cutánea, necrosis, el agente etiológico aparece en forma de hifas tabicadas, en caso de micetoma se presentan granos eumicéticos.
Queratitis Micótica	PAS, Grocott	Escamas de úlcera corneal	Hifas anchas, casi siempre tabicadas poco ramificadas ( <i>Fusarium</i> y <i>Aspergillus</i> sp) Células gemantes y pseudohifas ( <i>C.albicans</i> ).
		Biopsia	Proceso inflamatorio agudo y supurativo con zonas de necrosis coagulativa, se observan hifas alineadas paralelamente a las láminas de la cornea y membrana de Descemet.
Basidiobolomycosis.	PAS, Grocott Hematoxilinaeosina,	Biopsia	Proceso inflamatorio a nivel de dermis y tejido subcutáneo con áreas de necrosis, numeros eosinófilos, células epiteloides y gigantes lo que hace el diagnóstico es la presencia de hifas cortas gruesas cenocíticas o con pocos septos

## 2.7 TINCIÓN DE GRAM

Esta tinción pone de manifiesto a los microorganismos dependiendo de su pared celular ya que en base a esta tinción estos se dividen en grampositivos y gramnegativos dependiendo del colorante que retenga ya que esta es una tinción diferencial; esta retención se debe a las diferencias que existen entre las paredes celulares de cada una, ambas contienen peptidoglucano.

La pared celular de los microorganismos grampositivos contiene: grandes cantidades de ácidos teicoicos y teicurónicos y polisacáridos.

La pared celular de los gramnegativos contienen: Lipoproteínas y una membrana exterior en la cual los fosfolípidos de la capa más externa han sido sustituidos por lipopolisacáridos.

### REACCION Y APARIENCIA DE LAS BACTERIAS DURANTE LA TINCION

Soluciones aplicadas por orden	Grampositivas	Gramnegativas
1: Cristal violeta (CV)	Las bacterias se tiñen de violeta	Las bacterias se tiñen en violeta
2: Solución yodo yodurado (I) LUGOL	Complejo CV-I se forma dentro de las bacterias, las bacterias permanecen violetas.	Complejo CV-I se forma dentro de las bacterias las bacterias permanecen violeta
3: Alcohol-cetona	Las paredes celulares se deshidratan, hay retracción de los poros, la permeabilidad disminuye, el complejo CV-I no puede salir de la bacteria, permanecen violeta.	Extracción de lípidos de la pared celular, aumento de porosidad, CV-I sale de la bacteria.
4: Safranina	Los microorganismos permanecen violeta	Los microorganismos toman este colorante y se tiñen de rojo.

## **METODO.**

Reactivos: Solución de Cristal violeta: a) Cristal violeta 2gr.

Alcohol etílico al 95% , 20 ml

b) Oxalato de amonio 0.9gr

Agua destilada 80ml

Mezclar solución Ay B y dejar reposar 24h antes de usar.

Safranina: a) Safranina 25 gr

Alcohol etílico 100ml

b) 10 ml de solución A y 90 ml de agua destilada

Lugol: Yoduro de potasio 1gr

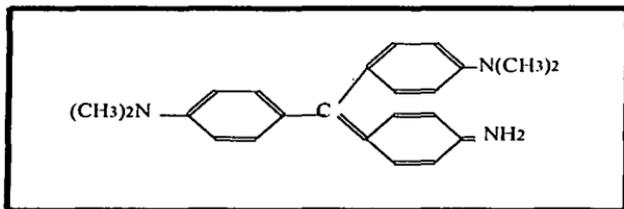
Cristales de yodo 1.5gr

Agua destilada 100ml

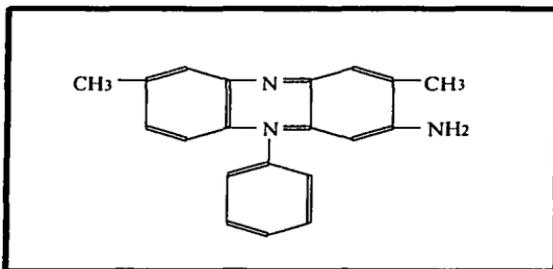
## **TECNICA DE TINCION (13)**

1. - Realizar frotis y fijar con calor
2. - Cubrir con Cristal violeta por 1 minuto
3. - Lavar con agua destilada, no secar
4. - Cubrir con yodo de Gram (lugol) por 1 minuto
5. - Lavar con agua destilada, no secar
6. - Decolorar por 10 a 30 seg. Con agitación suave  
con alcohol cetona (30ml de acetona y 70ml de alcohol)
7. - Lavar con agua, no secar
8. - Cubrir por 10-30 seg. con safranina (solución al 2.5%  
en alcohol al 95%).
9. - Lavar con agua y permitir que seque.

**FORMULAS DE LOS COLORANTES UTILIZADOS EN LA TINCION DE GRAM**



**Cristal Violeta**  
(hexametilpararrosanilina)



**Safranina**  
(dimetilfenosafranina)

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## 2.8 TINCION DE WRIGHT Y GIEMSA

Estas tinciones son diferenciales ya que se basan en la utilización de dos colorantes uno básico y uno ácido. Estas tinciones se utilizan mayormente para visualizar estructuras intracelulares.

Los colorantes policromáticos (Giemsa y Wright) son mezcla de azul de metileno alterado por calentamiento en solución de bicarbonato de sodio o en bicromato ácido (azur de metileno) y eosina. El azur de metileno es azul violeta y tiñe los componentes celulares ácidos, como el ácido micólico y el RNA citoplasmático. La eosina es roja y tiñe los componentes más básicos como los grupos hidroxilo de los polisacáridos de la pared de los hongos. Algunas estructuras se tiñen con ambos componentes. (16)

Los microorganismos micóticos se van a teñir de morado ya que se tiñen de ambos colorantes, y como son microorganismos básicamente intracelulares son de un tamaño muy pequeño por lo que no se logra diferenciar cada parte.

**METODO** a) Giemsa: Reactivos: Solución de Giemsa ( Polvo de Giemsa 600mg

Alcohol metilico 50ml

Glicerina neutra 50ml

El polvo se machaca con glicerina en un mortero. Luego se pone en un mortero, se pone a baño María 2h a 55°C, filtrar y dejar madurar 2 semanas.

Solución amortiguadora Giemsa:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  6.77g

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.59g

$\text{H}_2\text{O}$  destilada 1000ml

Se utiliza mezclando 2 ml de la solución con 6ml del Amortiguador.

b) Wright: Reactivos: Reactivo de Wright: Colorante Wright 0.3g

Glicerina 3 ml

Alcohol metílico 100ml

Solución amortiguadora Wright:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  2.56g

$\text{KH}_2\text{HPO}_4$  6.63g

$\text{H}_2\text{O}$  destilada 1000ml

**TECNICA :** (6)

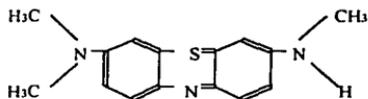
a) Giemsa:

- Se realiza frotis de manera habitual y fijar
- Cubrir con la solución del amortiguador y el colorante
- Dejar reposar de 45-60 min.
- Lavar
- Dejar secar
- Observar al microscopio

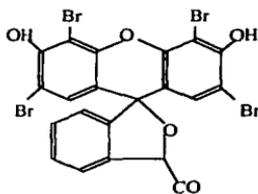
b) Wright:

- Realizar frotis
- Colorante Wright 2 min.
- Agregar solución amortiguadora y mover la laminilla
- Dejar los reactivos hasta que se forme una nata de color verde metálico
- Enjuagar
- Dejar secar
- Observar al microscopio

### FORMULA DE AZUR DE METILENO Y DE LA EOSINA



Azur de metileno



Eosina

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**2.9 MICOSIS Y TIPOS DE MUESTRA EN LAS QUE SE PUEDEN UTILIZAR LAS TINCIONES DE GRAM, WRIGHT Y GIEMSA PARA SU DIAGNÓSTICO**

MICOSIS	TINCION	MUESTRA	OBSERVACION MICROSCOPICA
<i>P.versicolor</i>	Gram	Examen directo de cultivo	Levaduras Gram positivas y filamentos
Eritrasma	Gram, Giemsa	Frotis directo	Filamentos Gram positivos microsfonados de aprox. 10 $\mu$ de largo por 1 $\mu$ de ancho con acúmulos de formas difteroides y bacilares que miden entre 1 y 2 $\mu$ .
Queratolitis puntata	Gram Giemsa	Frotis directo	Filamentos Gram positivos microsfonados (0.5-1 $\mu$ de diámetro) con abundantes formas cocoides (++++)
Candidosis	Gram Giemsa Wright	Frotis directo	Blastosporas (++++) de aprox. 2-4 $\mu$ diámetro y/o pseudomicelios cortos o largos.
Enfermedades Por <i>Pityrosporum</i> (dermatitis se-reica) (Psoriasis) (Foliculitis) (Blefarconjuntivitis) (Onicomicosis)	Gram	Frotis directo	Levaduras Gram positivas de 1-1.5 $\mu$ de diámetro con gemas muy pequeñas, dan el aspecto de una "botella" (+++).

MICOSIS	TINCION	MUESTRA	OBSERVACION MICROSCOPICA
Nocardiosis	Gram	Frotis directo  Biopsia cerebral	Hifas microsifonadas Gram positivas de 0.5-1 m de largo septadas y con escasos fragmentos que se liberan. Es posible observar numerosos micelios septados microsifonados Gram positivos.
Actinomicosis	Gram  Giemsa Wright	Frotis directo  Biopsia	Bacterias Gram positivas, micelio microsifonado corto de 3-8 $\mu$ las hifas son de 1m de diámetro y con gran cantidad de formas cocoides y bacilares (++++). También se pueden observar granos. Granos de tamaño variable basófilos multilobulados y en ocasiones con clavos en la periferia.

## 2.10 TINCION CON TINTA CHINA

Esta tinción nos ayuda a poner de manifiesto a microorganismos que contienen cápsula que con otras tinciones resulta más tardado, caro, etc. La cápsula de los microorganismos están formadas en su mayoría por mucina, la cual desplaza las partículas coloidales de carbón de la tinta china y se presenta la cápsula como un halo claro alrededor del microorganismo en un fondo negro.<sup>15</sup>

**METODO<sup>15</sup>** Reactivos: a) Solución salina al 0.9%

b) Tinta china

### **TECNICA DE TINCION<sup>15</sup>**

- Colocar una pequeña gota de solución salina en un portaobjetos
- Agregar una pequeña cantidad de cultivo joven o poner una gota de muestra que puede ser: LCR, orina, esputo, lavado bronquial etc.
- Mezclar bien
- Agregar una pequeña gota de tinta china
- Cubrir inmediatamente con un cubreobjetos, dejando que se extienda como una película fina del mismo
- Examinar al microscopio primero a seco fuerte 40X y posteriormente a inmersión
- Bajar el condensador para reducir la luz en forma marcada.
- Se recomienda usar tinta china Pélikan debido a la estructura fina de las micelas en este tipo de tinta. se le puede agregar timerosal al 0.3% como conservador.

## 2.11 TINCION DE RESALTADO CAPSULAR

Esta técnica pone de manifiesto la cápsula de los microorganismos y al microorganismo como tal, ya que se basa en el principio de la tinción de la tinta china previo tratamiento con fucsina básica la cual penetra la cápsula y reacciona con el ácido micólico de la pared del hongo quedando de un tono rosado, y la cápsula como un halo blanco ya que, la cápsula de los microorganismos desplaza las partículas coloidales de la tinta china.

### METODO

#### Reactivos:

a) Fucsina básica: Solución A: Fucsina básica 4g, alcohol etílico 20 ml.

(dejar reposar 24hrs)

Solución B: Fenol (cristales) 8ml, Agua destilada

100ml.

b) Mezclar las dos soluciones y filtrar.

### TECNICA

- Realizar frotis de Líquido cefalorraquídeo
- Aplicar fucsina básica de 2-3 min.
- Dejar secar
- Realizar frotis tipo sanguíneo con una gota de tinta china
- Secar y ver a microscopio

Existe otra técnica de tinción diferencial para poner de manifiesto la cápsula de *C.neoformans*, ésta técnica se llama tinción de mucicarmin de Meyer, ésta técnica es un poco costosa por lo cual no se realiza con frecuencia en nuestro país.

A continuación se describe el fundamento de la técnica.

## **2.12 TINCION DE MUCICARMIN DE MEYER**

El colorante de carmin junto con los iones aluminio, forma complejos con tejidos mucopolisacáridos impartiendo tonos de coloración de rojo a rosado, dando diferentes tonalidades a las diferentes capas de mucopolisacáridos de la cápsula.

El colorante exhibe especificidad hacia las mucinas de origen fibroblástico y se colorean de modo insatisfactorio.

**2.13 PATOLOGIA EN LA QUE SE UTILIZAN LA TINCIÓN DE RESALTADO CAPSULAR , LA TINCIÓN DE TINTA CHINA Y LA TINCIÓN DE MUCICARMIN**

**PATOLOGIA:**

- CRIPTOCOCOSIS

**TINCIÓN:**

- Tinta China
- Tinción de resaltado capsular
- Tinción de Mucicarmin de Meyer

**OBSERVACION MICROSCOPICA:**

- Tinta china: células levaduriformes con un halo blanco que es la cápsula, en un fondo negro
- Tinción de resaltado capsular : Células levaduriformes en un tono rosado con un halo blanco/rosado que representa la cápsula, en un fondo negro
- Tinción de mucicarmin: La cápsula de la célula se tiñe de diferentes tonos de rojo a rosado, visualizándose los 4 tipos de mucopolisacáridos de la célula

## 2.14 TINCION DE ZIEHL-NEELSEN

Esta tinción sirve para poner de manifiesto a bacterias o micobacterias acido-alcohol-resistentes, esto se debe a que las bacterias acido-alcohol-resistentes están rodeadas de una envoltura cerosa resistente a la tinción. Se requiere calor o un detergente (tergitol) para que el colorante penetre a través de dicha envoltura. Una vez teñidas las bacterias acidorresistentes soportan el tratamiento con alcohol ácido, en tanto que las otras bacterias se decoloran con el alcohol ácido.

El complejo carbofucsina penetra a la envoltura cerosa y se fija al ácido micólico de la pared celular micobacteriana. (14)

### METODO (1)

#### Reactivos:

a) Solución de Fucsina fenicada (carbofucsina): Fenol 2.5g

Alcohol 95% 5ml

Fucsina básica 0.5g

Agua destilada 100ml

b) Solución alcohol ácido 3%: Acido clorhidrico concentrado 3ml

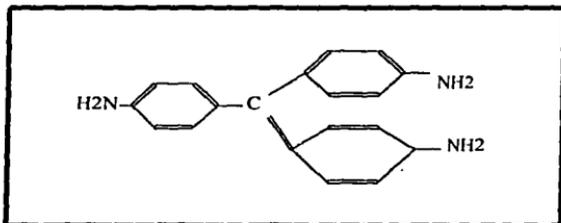
Alcohol 70% 100ml

## **TECNICA(6)**

- Realizar frotis y fijarlo al calor
- Fucsina fenicada y calentar hasta emisión de vapores
- Lavar con agua
- Decolorar con alcohol ácido
- Lavar con agua
- Cubrir con azul de metileno por 7 min. (colorante de fondo)
- Lavar con agua
- Secar y observar al microscopio.

### FORMULA DEL COMPUESTO COLORIDO CARBOLFUCSINA

Este compuesto es el que se fija al ácido micólico de la pared celular del microorganismo.



### PATOLOGIAS EN LA QUE SE UTILIZA LA TINCION DE ZIEHL-NEELSEN PARA SU DIAGNOSTICO

PATOLOGIA	TIPO DE MUESTRA	OBSERVACION MICROSCOPICA
Actinomicosis	Biopsia	Granos de tamaño variable multibulados y en ocasiones con clavos en la periferia, no son ácido-alcohol resistentes por lo que se tiñen de azul.
Nocardiosis	Expectoración, LCR  Biopsia	Hifas microfionadas de 0.5-1 $\mu$ de diámetro por varias micras de largo septadas y con escasos fragmentos que se liberan. Son parcialmente ácido-alcohol-resistentes ya que con el ácido sulfúrico se destiñen pero con el ácido clorhídrico no. Cerebral: Proceso inflamatorio compuesto por PMN, se pueden observar micelios septados microfionados parcialmente ácido-alcohol-resistentes

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 2.15 ILUSTRACIONES



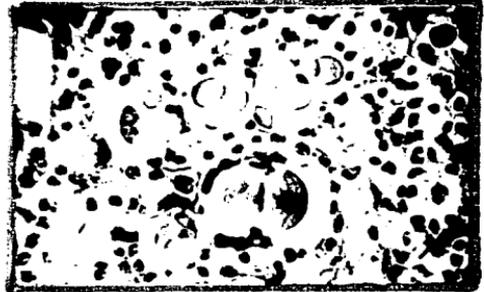
Biopsia Candidosis . Tinción GROCOTT



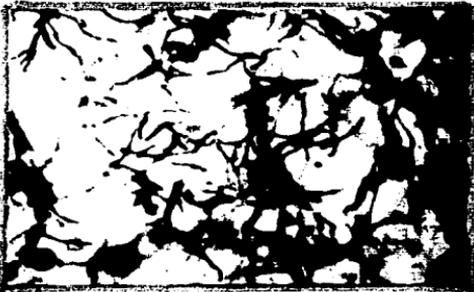
Biopsia Candidosis . Tinción GROCOTT



Preparado de Candidosis teñida con Gram



Biopsia Cromomicosis Tinción Hematoxilina y eosina



Biopsia Dermatomicosis teñida con PAS

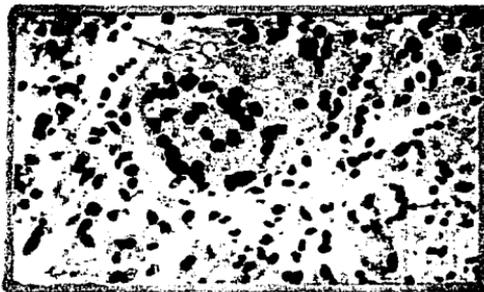


Biopsia de Pitiriasis Versicolor Tinción PAS<sub>(1)</sub>

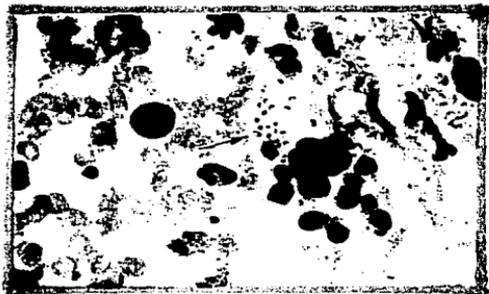
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



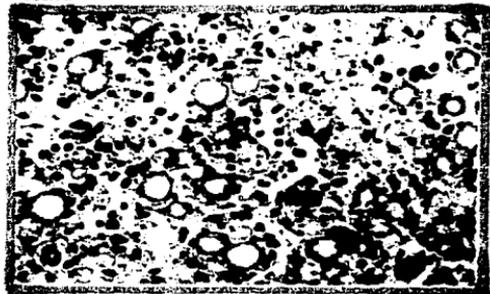
Biopsia Histoplasmosis . Tinción GROCOTT



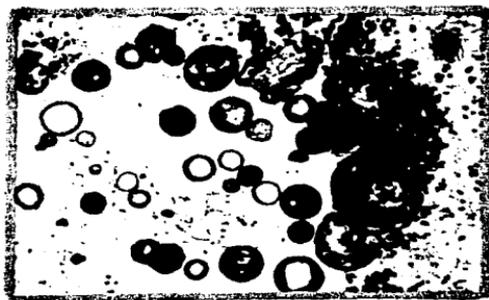
Biopsia Histoplasmosis . Tinción Hematoxilina eosina



Biopsia Histoplasmosis Teñido con Wright



Biopsia Coccidioidomycosis Tinción PAS

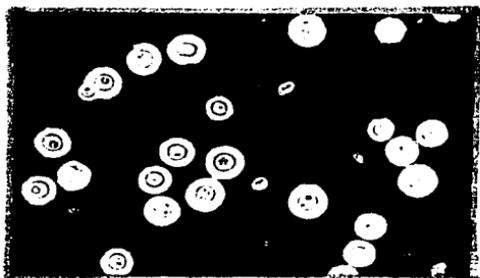


Biopsia Coccidioidomycosis mostrando  
Diferentes estadios del hongo. teñido con  
GROCOTT

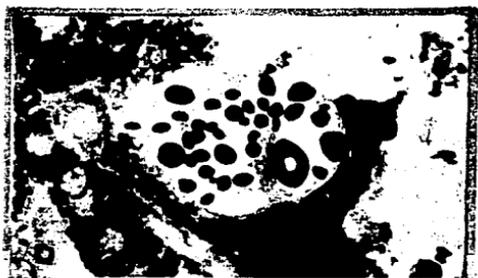


Biopsia de Paracoccidioidomycosis teñida  
con GROCOTT (13)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Preparado Tinta China de una Criptocosis



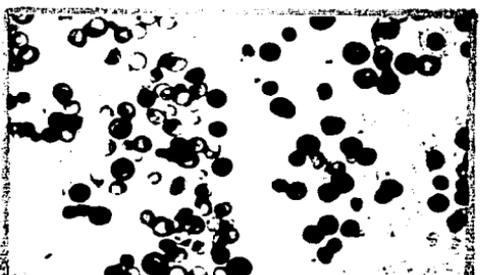
Biopsia Criptococosis. Tinción GROCOTT



Preparado Bronquial de Criptococosis teñido con PAS mostrando la forma pseudohifal del hongo



Biopsia Blastomicosis. Tinción PAS

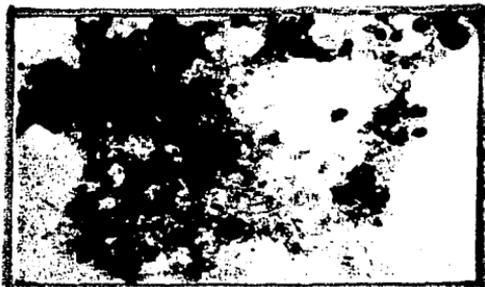


Biopsia Blastomicosis teñida con GROCOTT



Biopsia Blastomicosis teñida con PAS<sub>(1)</sub>

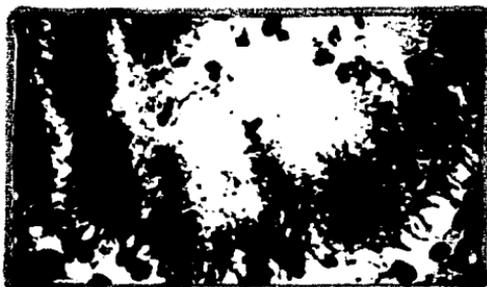
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Biopsia esporotricosis . Tinción Gram



Preparado de una nocardiosis teñido con  
Ziehl-Neelsen



Biopsia de Micetoma teñido con Gram



Biopsia de Micetoma teñido con Hematoxilina  
y eosina (1)

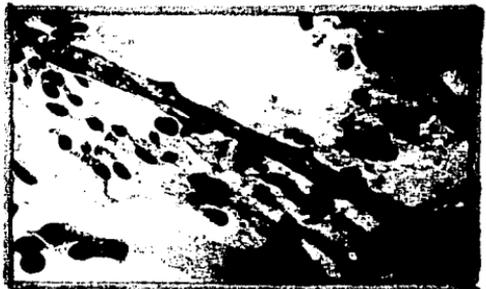
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



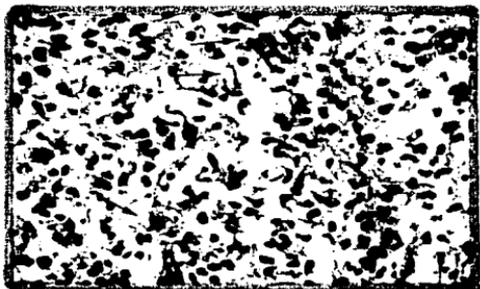
Biopsia Aspergilosis .Tinción PAS



Biopsia Aspergilosis .Tinción PAS



Biopsia de Zigomicosis teñida con PAS



Biopsia Zigomicosis teñida con Hematoxilina y eosina



Biopsia Zigomicosis teñida con Hematoxilina-eosina (1)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **CAPITULO 3**

### **“ MEDIOS DE CULTIVO ”**

### 3.1 ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS EN LOS MEDIOS DE CULTIVO

#### PENICILINA:

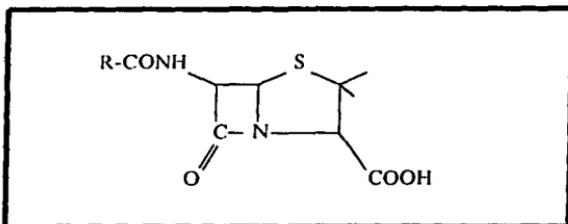
Las penicilinas son inhibidoras de la pared celular, su mecanismo de acción se da en el último estadio de la síntesis de la pared celular ya que la penicilina inhibe las uniones cruzadas catalizadas por enzimas del peptidoglucano que es considerado como un todo. Durante ésta etapa en las cadenas lineales del peptidoglucano se producen ligaduras cruzadas por una reacción de transpeptidación en la que se forma un puente peptídico entre dos cadenas adyacentes con la eliminación de la D-alanina terminal y la penicilina lo que hace es que se acumulen intermediarios de síntesis de la pared celular, nucleótidos de uridina sin uniones cruzadas, y las nuevas paredes no se pueden formar.

La penicilina inhibe y de forma reversible las D-alanina carboxipeptidasas, que son las que eliminan de manera específica las D-alanina de las cadenas pentapeptídicas laterales, inhibe también las transpeptidasas que son las que realizan las uniones cruzadas.

Las penicilinas también tienen un efecto lítico el cual es el resultado de un desequilibrio en el crecimiento celular e involucra a las autolisinas, que son las enzimas que hidrolizan el peptidoglucano y que participan en el recambio de la pared celular y en la separación de las bacterias después de la división celular.

En los microorganismos Gram positivos la penicilina también promueve la liberación de lípidos y ácidos teicoicos por lo que se produce un fenómeno de autólisis.

La unión de las penicilinas se lleva a cabo por las proteínas que están presentes en casi todas las membranas de las bacterias y se les conoce como PBP (proteína de unión a la penicilina). Tiene preferencia por bacterias Gram positivas. (17)



**Estructura química de la Penicilina**

### ESTREPTOMICINA:

La estreptomycin es bactericida ya que inhibe la síntesis proteica, en forma in vitro provoca la inhibición de la síntesis de polipéptidos y provoca errores de lectura de los mensajeros de polipéptidos sintéticos.

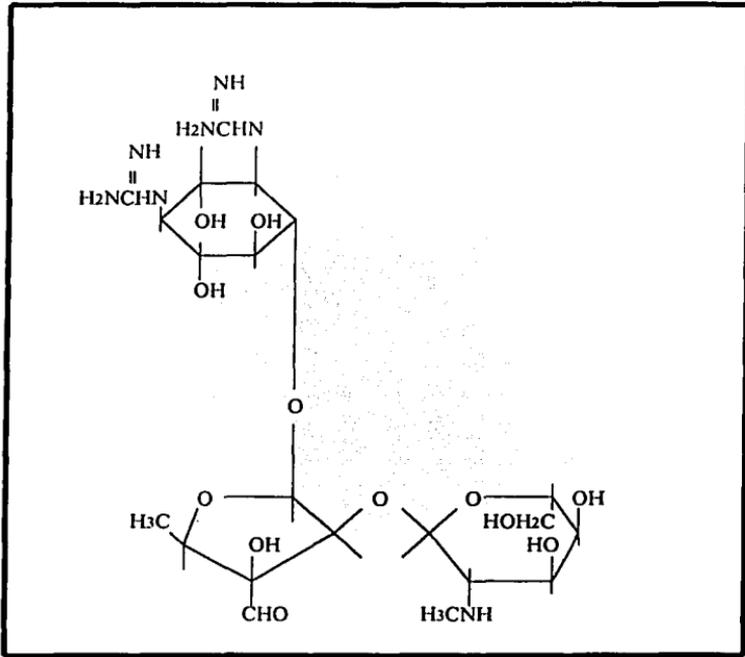
La inhibición de polipéptidos se realiza ya que la estreptomycin se une de forma irreversible a la subunidad ribosómica 30S, por lo que interrumpe de forma drástica el ciclo del ribosoma en la iniciación de la síntesis proteica.

La interacción de la estreptomycin con la subunidad 30S es compleja. Una única proteína en la subunidad ribosómica 30S, la S12, es el objetivo final de éste medicamento, pero para que se lleve a cabo la unión de la estreptomycin se requieren de por lo menos otras cuatro proteínas ribosómicas que son la S3, S4, S5 y la S9.

Los errores de lectura en polipéptidos sintéticos se dan por la inhibición de la incorporación de sustancias polimerizadas por síntesis dirigida y puede estimular la incorporación de aminoácidos no codificados por estos polimeros.

Tiene preferencia por bacterias Gram positivas, negativas y *M.tuberculosis*.(1)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



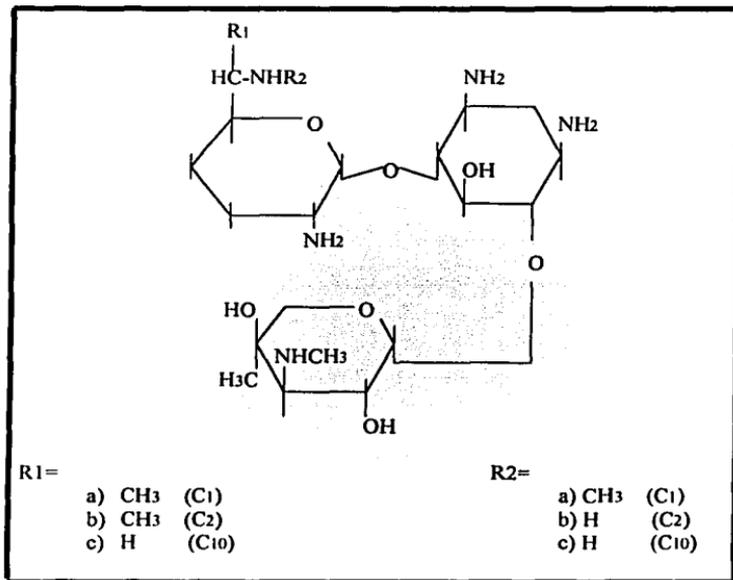
**Estructura química de la Estreptomina**

### GENTAMICINA Y NEOMICINA

La gentamicina y la Neomicina también son inhibidores de la subunidad ribosómica 30S, inhibiendo así la síntesis proteica, también producen ambigüedad en la traducción, pero el nivel de error de la lectura producido es mucho mayor que en la estreptomina, son antibióticos aminociclitol aminoglicosídicos, que actúan como bactericidas más

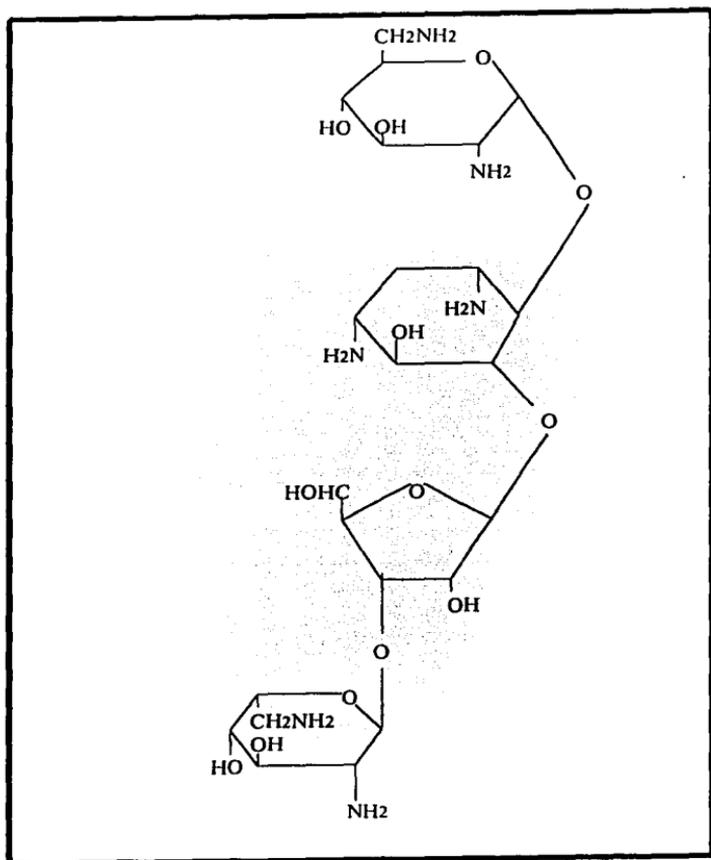
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

que bacteriostáticamente. El mecanismo de acción es similar a la de la estreptomina, pero en este caso tienen por lo menos dos sitios de unión en el ribosoma a diferencia de la estreptomina que solo contiene uno. Tienen preferencia por microorganismos Gram negativos pero si inhibe también Gram positivos.<sup>(12)</sup>



Estructura química de las diferentes Gentamicinas

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Estructura química de la Neomicina

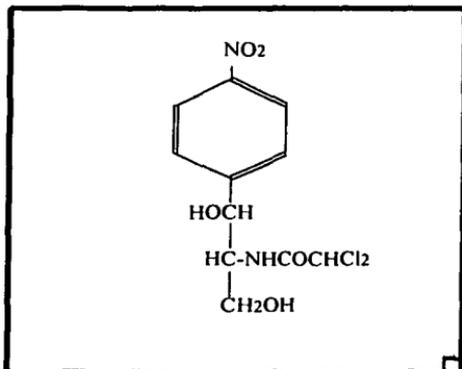
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## CLORAMFENICOL

El cloramfenicol es un antibiótico bacteriostático, el cloramfenicol inhibe la proliferación de los microorganismos ya que interfiere la síntesis proteica por que se une a la subunidad ribosómica 50S por medio de una unión estereoespecífica 1:1 entre el número de moléculas del cloramfenicol y los ribosomas presentes.

La intervención se lleva a cabo por la unión del cloramfenicol a un sitio ubicado sobre la unidad 50S en la vecindad pero no en el mismo lugar, donde se une el extremo aminoacilo del aminoacil-tRNA al centro donde se lleva a cabo la catálisis de la peptidiltransferasa. Este sitio parece ser la proteína L16 que se encuentra directamente implicada en la actividad de la peptidiltransferasa.

El cloramfenicol actúa sobre bacterias Gram positivas, negativas, rickettsias y clamidias.<sup>(12)</sup>



Estructura Química del Cloramfenicol

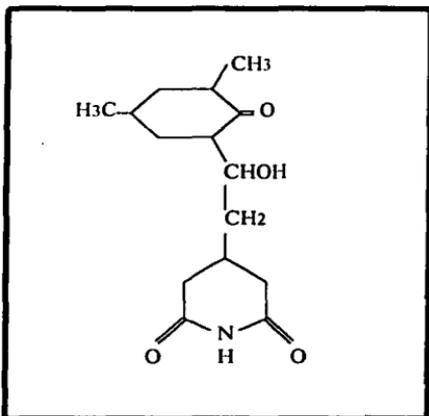
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## CICLOHEXIMIDA (ACTIDIONE)

La cicloheximida también conocida como actidione es un antibiótico que inhibe la biosíntesis proteica de los microorganismos.

Esta inhibición la lleva a cabo por que suspende la síntesis proteica en los ribosomas 80S de los eucariotas por el bloqueo del enlace peptídico pero no inhibe la de los ribosomas 70S en los procariotas.

La unión del fármaco se lleva a cabo en las subunidades mayores de los ribosomas.



Estructura química de la Cicloheximida

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 3.2 AGAR DEXTROSA DE SABOURAUD

#### Modo de acción:

Este medio es óptimo para el crecimiento micótico, en este medio de cultivo se tienen relativamente grandes concentraciones de carbohidratos (2-4%), Este medio no contiene ningún agente que selectivo que inhiba el crecimiento de la biota microbiana indeseada. La inhibición del crecimiento de bacterias en este medio se efectúa por medio del pH el cual es de 5.6, este efecto puede ser realizado ajustando el pH a valores extremos como 3.5 o 10.0.

Si el hongo que se va a sembrar proviene de una muestra que puede estar muy contaminada con bacterias se le pueden agregar al medio agentes inhibidores entre los cuales están la penicilina que se le agregan 200U/ml, estreptomycin 40U/ml y/o el actidione 0.5mg/ml. (20)

#### Composición (g/l)

Dextrosa	40g
Peptona de carne	5g
Peptona de caseína	5g
Agar-agar	15g

#### Preparación:

Disolver 65g en un litro, ajustar el pH a 5.6 y meter a esterilizar en autoclave a 15lbs de presión durante 15 minutos.

#### Procedimiento experimental y evaluación:

Sembrar el microorganismo, se incuba a temperatura de 28°C y en algunos casos excepcionales a 37°C (temperatura del cuerpo humano). Los dermatofitos aparecen después de 5-20 días, otros hongos crecen usualmente antes de los 5 días.<sup>(20)</sup>

### 3.3 AGAR MYCOSEL

Este medio se usa para el aislamiento de hongos patógenos particularmente de dermatofitos provenientes de muestras muy contaminadas.

#### Modo de acción:

Este medio contiene cicloheximida la cual es usada para inhibir a las bacterias que se lleguen a encontrar en la muestra que contiene probablemente dermatofitos, logrando así el crecimiento pleno de estos.

También contiene cloramfenicol el cual inhibe ampliamente bacterias y mohos contaminantes. En algunos casos también algunos hongos patógenos son inhibidos por estos agentes; por lo que se debería de inocular también en un medio sin agentes inhibidores.

Algunas veces a la muestra se le agrega simultaneamente gentamicina para suprimir a bacterias que son resistentes al cloramfenicol, en una concentración de 40mg/lit.<sup>(20)</sup>

**Composición g/lit**

Peptona de harina	10g
Dextrosa	10g
Cicloheximida	0.4g
Cloramfenicol	0.05g
Agar-agar	12.5g

**Preparación:**

Disolver 33 g en un litro, esterilizar en autoclave a 15 lbs de presión por 15 minutos, evitar la relicuefacción.

**Procedimiento experimental y evaluación:**

Obtener la muestra e inocular en la superficie del medio, incubar por 3 semanas a 28°C, si se sospecha de una endomicosis (micosis subcutánea y/o sistémica incubar a 37°C también.

Si no se puede identificar la colonia es necesario sembrarla en un medio sin supresores, como el Sabouraud para poder realizar la comparación.<sup>(20)</sup>

### 3.4 AGAR SANGRE Y AGAR CHOCOLATE

Se usa éste medio para el aislamiento de microorganismos exigentes, especialmente especies patógenas y para establecer formas de hemólisis.

#### Modo de acción:

Este medio de cultivo representa una base rica en nutrientes la cual es óptima para el crecimiento de todos los microorganismos. El pH es de 6.8 el cual estabiliza los glóbulos rojos y favorece la formación de una clara hemólisis. La sangre de borrego desfibrinada es más adecuada para la determinación de especies hemolíticas.

El agar chocolate es un medio extremadamente rico en nutrientes y se puede preparar calentando el medio después de la adición de la sangre.

En algunas ocasiones se utiliza sangre de humano sobre todo para la identificación de las micobacterias.<sup>(20)</sup>

#### Composición (g/l)

Extracto de corazón	10g
Triptosa	10g
Cloruro de sodio	5g
Agar-agar	15g
Sangre	50-80ml

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

**Preparación:**

Disolver 40g en un litro, esterilizar en autoclave a 15 lbs de presión por 15 min. dejar enfriar a 45-50°C, adicionar 5-8% de sangre desfibrinada.

Preparación del agar chocolate: después de mezclar la sangre calentar el medio por aproximadamente 10 minutos a 80°C , con frecuencia se vuelve turbulento el agar antes de ponerse obscuro.

**Procedimiento experimental y evaluación:**

Inocular en la superficie de la caja petri en forma estriada, dejar incubar por 1-2 días a 37°C.

Checar las colonias que forman y no hemólisis macro y micromorfológicamente.

### 3.5 AGAR BHI (Brain heart infusion)

Este medio se utiliza para el cultivo de microorganismos patógenos muy exigentes, ya que este medio es demasiado rico en nutrientes.

#### Modo de acción:

En este medio crecen todo tipo de microorganismo ya que es muy rico en nutrientes por lo que también llegan a desarrollar microorganismos no deseados (contaminantes) los cuales pueden inhibirse con la adición de penicilina 20 I.U y 40µg de estreptomycin por ml de medio, pero si es usado para el aislamiento selectivo de *Histoplasma capsulatum* y *Blastomyces sp* se deben de agregar 0.05µg de ciclohexamida por ml y 0.5 µg de cloramfenicol por ml.

Este medio no es muy adecuado para la determinación de microorganismos hemolíticos cuando la sangre que se le agrega contiene glucosa.

#### Composición (g/l)

Infusión de cerebro	12.5g
Infusión de corazón	5g
Peptona proteinisada	10g
Cloruro de sodio	5g
Fosfato dihidrogenado de Sodio	2.5g
Agar-agar	15g

**Preparación:**

Disolver 52 gramos de agar en un litro , esterilizar en autoclave a 15lbs de presión por 15 minutos.

**Procedimiento experimental y evaluación:**

Sembrar y dejar incubar a 37 °C durante 15-20 días observar las características micro y macromorfológicas y comparar con la colonia aislada en el medio de primoaislamiento.

### 3.6 AGAR EXTRACTO DE LEVADURA

Este medio se utiliza para el aislamiento de levaduras y mohos de varios materiales.

#### Modo de acción:

El medio contiene extracto de levadura el cual contiene una gran cantidad de vitaminas aproximadamente unos 3 gramos/litro, lo cual permite el crecimiento de gran cantidad de microorganismos, ya que estos las utilizan para su alimentación; pero principalmente se utiliza para los hongos y levaduras.<sup>(20)</sup>

#### Composición (g/l)

Extracto de levadura	5g
Dextrosa	10g
Agar-agar	20g

#### Preparación:

Disolver 35 gr en un litro de agua, esterilizar en autoclave a 15lbs de presión por 15min.

#### Procedimiento experimental y evaluación.

Inocular sobre la superficie del medio por medio de estria, incubar a 28°C o a 37°C si se desea (sospecha de hongo dimórfico) por 2-3 días, observar las características micro y macromorfológicas.<sup>(20)</sup>

### 3.7 AGAR NICKERSON (Biggy)

Este medio es útil para el primoaislamiento diferenciación preliminar de *Candida* sp. y otras levaduras.

#### Modo de acción:

Este medio de cultivo contiene además de extracto de levadura, glicina y glucosa, los cuales forman su medio base; el indicador sulfito de bismuto provee una amplia supresión de microorganismos contaminantes.

Las especies de *Candida*, así como, la mayoría de las levaduras, crecen normalmente en este medio ya que reducen el sulfito de bismuto y al hacerlo cambia el color de la colonia a café o negro.

Se puede utilizar 2mg/lt de neomicina para asegurar la inhibición de bacterias contaminantes. (20)

#### Composición:

Dextrosa	10g
Extracto de levadura	1g
Glicina	10g
Sulfito de bismuto	7g
Agar-agar	15g

**Preparación:**

Disolver 43g en un litro, agitar bien hasta disolver el precipitado, meter a esterilizar en autoclave a 15 lbs de presión por 15 minutos.

**Procedimiento experimental y evaluación:**

Tomar el espécimen del agar de primoaislamiento y sembrar sobre la superficie del medio, incubar a 28°C y si es necesario a 37°C.

Si crecen colonias con apariencia pastosa y se reduce el sulfito de bismuto dando un color café o negro usualmente son levaduras.

Algunos dermatofitos y mohos pueden crecer en este medio pero son fáciles de reconocer por el micelio aéreo que forman estos. (20)

### **3.8 AGAR CORN-MEAL**

Este medio se utiliza para la diferenciación de levaduras particularmente de *Candida albicans* y *Candida stellatoidea* de otras especies de *Candida* por medio de la producción de las típicas clamidosporas. Otros tipos de levaduras que crecen en éste agar pueden ser diferenciadas en el criterio de las bases micromorfológicas.

Este medio es muy adecuado para los procedimientos en el diagnóstico micológico.

**Modo de acción:**

El medio de cultivo tiene extracto de maíz que es el único nutriente de éste. El carecimiento de nutrientes junto con la deficiencia de oxígeno en las condiciones de cultivo crean un medio ambiente pobre el cual induce la formación de estructuras específicas como las clamidosporas y el pseudomicelio los cuales son estructuras de resistencia en algunas levaduras. La adición de polisorbato incrementa la formación de clamidosporas en *Candida albicans* logrando con la adición del polisorbato (Tween 80) que el medio se vuelva aún más impropio para la levadura y crezcan más clamidosporas

(20)

**Composición (g/l)**

Extracto de maíz	5g
Agar-agar	10g

**Preparación:**

Disolver 15g del medio en un litro, mezclar y meter a esterilizar en utocalve por 15 min a 15 lbs de presión.

**Procedimiento experimental y evaluación.**

De la colonia que crezca en el medio de primoaislamiento sembrar en el agar corn-meal en forma de zig-zag dividiendo la caja en 3-4 partes , Incubar por 4 días a

28°C. El aumento de la temperatura puede favorecer la formación de clamidosporas pero sin llegar a 37°C, ya que a esta temperatura no se forman.

Evaluar la colonia directamente bajo el microscopio.

#### OBSERVACION MICROSCOPICA

Estructuras fúngicas	Hongo
Clamidosporas de 6-12 $\mu$ de diámetro pseudomicelio, blastosporas de 3-6 $\mu$ de diámetro.	<i>C. albicans</i> , en ocasiones <i>C. stellatoidea</i> .
Pseudomicelio, algunas veces micelio verdadero, blastosporas, No hay formación de clamidosporas.	Otras especies de <i>Candida</i>
Artrosporas, blastosporas, micelio verdadero, ocasionalmente pseudomicelio.	<i>Trichosporum</i> sp
Blastosporas, no hay clamidosporas ni pseudomicelio.	Otras especies de levaduras
Ascosporas en el asco	Levaduras perfectas
Artrosporas, micelio verdadero, no hay blastosporas.	<i>Geotrichum</i> sp

### 3.9 MEDIO TTC (CLORURO DE TRIFENILTETRAZOLIO)

Este medio es utilizado para diferenciar diferentes especies de un mismo genero, principalmente se usa para la diferenciación del género Candida.

Modo de acción:

Las sales de tetrazolio se van a unir a la membrana celular del microorganismo. Cuando esto sucede el microorganismo va a empezar a reducir las convirtiéndolas a formazona dando un pigmento rojo que es proporcional a la actividad del microorganismo en las sales. (entre mas reducción o actividad mayor será la coloración).<sup>(23)</sup>

Composición: (g/l)

Glucosa cruda	40g
Peptona de carne	5g
Peptona de caseína	5g
Agar-agar	15g

Solución de cloruro de trifetil tetrazolio al 1%

Preparación:

Disolver 37 gr del agar en un litro y esterilizar en autoclave por 15 min a 15 lbs de presión, una vez esterilizado agregar 7.5 ml de la solución de cloruro de tetrazolio y mezclar.<sup>(20,23)</sup>

**Procedimiento experimental y evaluación:**

Inocular en la superficie del medio de forma estriada e incubar a 25 o 37°C por 24-48 hrs y observar las características macromorfológicas de la colonia.

**Ejemplo:**

<b>ESPECIE</b>	<b>COLOR COLONIA</b>
<b>C.albicans</b>	rojo grande rugosa
<b>C.tropicallis</b>	rosa mate pequeña
<b>C.kruseii</b>	rosa muy pálida brillante
<b>C.glabrata</b>	rosa violáceo brillante

### 3.10 AGAR ALPISTE NEGRO O NIGER

#### Modo de acción:

Este medio se utiliza para la identificación de *C.neoformans*, este medio es una prueba bioquímica para éste hongo, el modo de acción es que el hongo contiene una enzima llamada fenoloxidasa la cual al entrar en contacto con el ácido cinámico del alpiste (*Gizotia abyssinica*) va a oxidarlo y formar un pigmento pardo o negro. (1)

#### Composición: (g/l)

- Semillas de Guizotia abassinicia 50g
- Agar-agar 15g

#### Preparación:

Moler las semillas y agregar 1000ml de agua destilada, hervir por 30 min., colar y el extracto de semillas ajustarlo a 1000ml con agua destilada. Agregar el agar y hervir hasta disolución. Esterilizar a 15 lbs de presión por 15 min., colocar en cajas Petri estériles. (1)

#### Procedimiento experimental y evaluación:

Sembrar de la colonia sospechosa e incubar a temperatura ambiente por 3 días, si existe un pigmento pardo o negro en la colonia es positivo para *C.neoformans*, pero también se debe de llevar acabo su auxonograma. (1)

### 3.11 AUXONOGRAMAS Y ZIMOGRAMAS

Estos métodos son importantes en levaduras, para poder determinar la especie de la que se trata en base a las características fisiológicas de la colonia.

Para sembrar la cepa problema se realiza una suspensión en solución salina estéril.

#### AUXONOGRAMA

Los auxonogramas se basan en la utilización o asimilación de alimentos con carbono o nitrógeno; ya que en el alimento que utiliza el microorganismo va a desarrollar y formar una colonia.

El material empleado comprende cajas Petri estériles con medio para auxonogramas.

#### Medio para auxonograma

a) Asimilación de azúcares: Se comprueba la asimilación de glucosa, galactosa, Maltosa, sacarosa, lactosa, rafinosa, treholasa y celobiosa.

- Gelosa	20g
- Sulfato de amino	2g
- Fosfato monopotásico	1.5g
- Sulfato de Magnesio	0.25g
- Biotina	10 <sup>7</sup> U
- Tiamina	10 <sup>7</sup> U
- Piridoxina	10 <sup>7</sup> U

- Acido nicotínico 10<sup>7</sup> U
- Pantotenato de calcio 10<sup>7</sup> U
- Inositol 10<sup>7</sup> U
- Solución de Berthelot 10 gotas
- Agua bidestilada 1000ml

*Solución de Berthelot:*

H <sub>2</sub> O	1000	ml
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> , 9H <sub>2</sub> O	50	g
MnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	2	g
CaSO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0.50	g
NiCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0.05	g
CoCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0.05	g
SO <sub>4</sub> TiO, 4H <sub>2</sub> O	0.20	g
ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0.10	g
CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	0.05	g
GI <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 4H <sub>2</sub> O	0.10	g
BO <sub>3</sub> H <sub>3</sub>	0.05	g
SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub>	1	ml

b) Asimilación de nitrógeno: Se utiliza para comprobar la utilización de Sulfato de amonio y nitrato de potasio

- se utiliza el medio anterior, sin sulfato de amonio ya que este también se comprueba y se le agregan 20 g de glucosa pura.

Se coloca el medio en cajas Petri, sin el alimento que se desea probar, ya sea carbono o nitrógeno, se siembra cubriendo toda la superficie con la suspensión de levaduras, después se colocan los discos impregnados con las soluciones ya sean de azúcares o nitrogenados (los mencionados anteriormente) según sea el caso, estos discos son desecados en la estufa, sin que llegara a quemarse .

El hongo crecerá alrededor del disco que contenga el alimento que necesite para reproducirse, ya que sin un alimento esencial no hay desarrollo»

## ZIMOGRAMA

Estos estudios se basan en la fermentación de azúcares por medio de las enzimas que contiene el microorganismo, si es una fermentación positiva se visualiza por un cambio de color en el medio ya que se usa un indicador ácido-básico y al romperse el azúcar por el microorganismo el medio se vuelve más ácido y el indicador cambia de color, el indicador que se usa generalmente es el Rojo de metilo o el de Andrade (solución de fucsina al 0.5% en agua destilada, más NaOH 1N hasta que el color vire a rosa y finalmente a amarillo. En estos estudios el indicador se usa con una solución peptonada.

Se utilizan tubos de hemólisis Ivan-Hall con un estrechamiento y una perla de vidrio que sirve como válvula, se les agregan aproximadamente 4ml de medio y bajo técnica estéril se agregan unas gotas de solución al 30% del azúcar escogido (glucosa, maltosa, sacarosa, galactosa, lactosa e inulina).

Si hay viraje del indicador indica acidificación (se llevó acabo la fermentación) y la aparición de una burbuja debajo de la perla de vidrio indica formación de gas»

**PATOLOGIAS EN LAS QUE SE UTILIZAN LOS AUXONOGRAMAS Y ZIMOGRAMAS PARA SU DIAGNOSTICO**

- Candidosis
- Criptococosis

**CARACTERISTICAS DE LAS DIFERENTES ESPECIES DE LEVADURAS EN LOS AUXONOGRAMAS**

Organismo	ASIMILACION						
	Dextrosa	Maltosa	Sacarosa	Lactosa	Rafinosa	Trehalosa	Inositol
<i>Cryptococcus neoformans</i>	+	+	+	-	+/-	+	+
<i>C.albidus</i>	+	+	+	+ <sup>o</sup>	+	+ <sup>o</sup>	+
<i>C.luteolus</i>	+	+	+	-	- <sup>o</sup>	+	+
<i>C.laurentii</i>	+	+	+	+	+ <sup>o</sup>	+	+
<i>C.albicans</i> *	+	+	+*	-	-	+	-
<i>C.tropicallis</i>	+	+	+ <sup>o</sup>	-	-	+	-
<i>C.parapsilosis</i>	+	+	+	-	-	+	-
<i>C.kruseii</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>C.guilliermondi</i>	+	+	+	-	+	+	-
<i>C.pseudotropicalis</i>	+	-	+	+	+	-	-
<i>C.glabrata</i>	+	-	-	-	-	+	-

<sup>o</sup> Variación de las cepas

\* *Candida stellatiodea* se incluye con *C.albicans*, la única diferencia es la asimilación de la sacarosa

La única especie que utiliza nitratos es *C.albidus*

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**CARACTERISTICAS DE LAS DIFERENTES ESPECIES DE LEVADURAS EN LOS ZIMOGRAMAS**

Organismo	FERMENTACION					
	Dextrosa	Maltosa	Sacarosa	Lactosa	Galactosa	
<i>Cryptococcus Neoformans</i>	-	-	-	-	-	
<i>C.albidus</i>	-	-	-	-	-	
<i>C.loteolus</i>	-	-	-	-	-	
<i>C.laurentii</i>	-	-	-	-	-	
<i>C.albicans</i>	G	G	°	-	G	
<i>C.tropicalis</i>	G	G	G	-	G	
<i>C.parapsilosis</i>	G	-	-	-	G°	
<i>C.kruseii</i>	G	-	-	-	-	
<i>C.guillermondi</i>	G	-	G	-	G	
<i>C.pseudotropicalis</i>	G	-	G	G	G	
<i>C.glabrata</i>	G	-	-	-	-	

G Fermentación detectada por la producción de gas  
 ° Variación de las cepas

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

### 3.12 AGAR LÖWENSTEIN- JENSEN

Este medio se utiliza para la detección de las micobacterias principalmente.

#### Modo de acción:

El medio contiene verde de malaquita el cual actúa como inhibidor de bacterias y mohos contaminantes. Además contiene L-Asparagina que es un aminoácido esencial para el desarrollo de las micobacterias. Este medio favorece el crecimiento de las micobacterias que son de crecimiento lento, las que crecen más rápido lo hacen en un periodo de 7 días.

#### Composición: (g/ 1.6lt)

Fosfato de potasio dihidrogenado	1.56g
Sulfato de magnesio	0.15g
Citrato de magnesio	0.375g
L-asparagina	2.25g
Harina de papa	18.75g
Verde de malaquita	0.25g

**Preparación:**

Disolver 37.5g de medio en 600ml de agua, mezclar y meter a esterilizar a la autoclave a 15 lbs de presión por 15 min. Dejar enfriar a 50°C y adicionar 1 lt de huevos previamente mezclados bajo condiciones estériles, mezclar cuidando de no formar burbujas de aire, vaciar en tubos con rosca y mantener en una posición inclinada o en cajas petri y calentar para la coagulación a 80°C aproximadamente por 45 minutos.(0621)

**Procedimiento experimental y evaluación:**

Inocular en el medio de cultivo de manera masiva por extensión la superficie, esto se realiza directamente del esputo, lavado gástrico o de otras muestras. Incubar a 37°C por mas de 1 semana hasta 12 semanas máximo. Observar las características de la colonia macro y microscópicamente.(0621)

### 3.13 MEDIO PARA HIDRÓLISIS DE CASEINA

Este medio se utiliza para la tipificación de especies del género *Nocardia*, *Actinomadura* y *Streptomyces*.<sup>(4)</sup>

#### Modo de acción:

Este medio se basa en la hidrólisis de la caseína que se encuentra en él por medio de las enzimas de los microorganismos, si existe la enzima que degrade la caseína se va a observar un cambio notorio en el medio.

#### Composición (g/100ml)

Dextrosa	1g
Leche descremada	1.5g
Agar-agar	2g

#### Preparación:

Mezclar la dextrosa y el agar en 50ml de agua hasta que no haya grumos, la leche descremada disolverla en otros 50 ml de agua, una vez realizadas las dos mezclas esterilizar por separado en autoclave a 10 lbs de presión por 10 min. Dejar enfriar a aproximadamente a 45°C y mezclar ambas soluciones, vaciar en cajas petri.<sup>(4,6)</sup>

#### Procedimiento experimental y evaluación:

Inocular de la colonia sospechosa en la superficie del medio, incubar a temperatura ambiente durante 24-48hrs. Y observar si existe hidrólisis en el medio.

### 3.14 MEDIO PARA HIDRÓLISIS DE XANTINA, HIPOXANTINA Y TIROSINA

Al igual que el medio para hidrólisis de caseína sirve para tipificar las especies del género *Nocardia*, *Actinomadurae* y *Streptomyces*.<sup>(4)</sup>

#### Modo de acción:

Se basa en el principio de la llave y cerradura de las enzimas; si el microorganismo tiene la capacidad de degradar el compuesto a estudiar se va a fijar en éste y lo va a metabolizar, dando así una prueba positiva la cual va a ser variar el medio, esto se visualiza con una zona más clara en el agar.

#### Composición: (g/l)

Xantina o hipoxantina	4g
Si se investiga tirosina	5g
Agar-agar	23g

#### Preparación:

Mezclar en un litro de agua las concentraciones mencionadas anteriormente, y esterilizar en autoclave a 15lbs de presión por 15min.<sup>(4,6)</sup>

**Procedimiento experimental y evaluación:**

Inocular de la colonia problema sobre la superficie del medio e incubar a temperatura ambiente por 24-48hrs. Observar si existe hidrólisis de los compuestos estudiados.

**DIFERENCIAS FISIOLÓGICAS DE LAS ESPECIES PATÓGENAS DEL GENERO  
NOCARDIA, ACTINOMADURAE Y STREPTOMYCES**

ESPECIE	PRUEBAS			
	Hidrólisis Caseína	Hidrólisis Tirosina	Hidrólisis Xantina	Hidrólisis Hipoxantina
<i>N.asteroides</i>	-	-	-	-
<i>N.brasiliensis</i>	+	+	-	+
<i>N.otitis-caviarum</i>	-	-	+	+
<i>A. madurae</i>	+	+/-	-	+
<i>A.pelletieri</i>	+	+	-	+
<i>S.somaliensis</i>	+	+	-	-

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**3.15 PATOLOGIAS EN LAS QUE SE USAN LOS MEDIOS DE CULTIVO PARA DIAGNÓSTICO**

PATOLOGIA	MEDIO DE CULTIVO Y TEMPERATURA DE INCUBACION	CARACTERISTICAS DE LA COLONIA DEL AGENTE ETIOLÓGICO	TIEMPO DE INCUBACION
Dermatofitosis	Sabouraud, micosel, Extracto de levadura 28°C	<p><i>T.rubrum</i>: Algodonosa, pigmento rojo vino difusible al medio.</p> <p><i>T. tonsurans</i>: Colonias - aterciopeladas, granulosa con pigmento marrón difusible al medio.</p> <p><i>T. mentagrophytes</i>: una es granulosa y otra vellosa.</p> <p><i>T. concentricum</i>: Colonia sedosa, cerebriforme.</p> <p><i>M. canis</i>: Colonia blanca vellosa radiada con pigmento difusible al medio amarillo.</p> <p><i>M. gypseum</i>: Colonia blanca amarillenta rugosa.</p> <p><i>E. floccosum</i>: Colonia blanca, vellosa. Ligera-mente aterciopelada pigmento verde difusible al medio.</p>	10-15 días
Pitiriasis Versicolor	Micosel 25 o 35°C	<i>P. orbiculare</i> : Colonia cremosa, blanca amarillenta.	8 días

PATOLOGIA	MEDIO DE CULTIVO Y TEMPERATURA DE INCUBACION	CARACTERISTICAS DE LA COLONIA DEL AGENTE ETIOLÓGICO	TIEMPO DE INCUBACION
Tiña negra	Micosel, Sabouraud 22°C	<i>E.wernekii</i> : A la semana colonia cremosa negra limitada. 3semanas verde aterciopelada.	3-4 semanas
Piedra blanca	Sabouraud 25-28°C	<i>T.beigelii</i> : Colonia de aspecto cerebriforme	5-8días
Piedra negra	Sabouraud 28°C	<i>P.hortai</i> : Negra verdosa limitada, acuminada, lisa y en ocasiones aterciopelada.	10 días
Tricomicosis	BHI, gelosa sangre, extracto de levadura 37°C	<i>C.temis</i> : Colonias pequeñas rugosas, opacas color blanco amarillento	24-48hrs
Eritrasma	Gelosa sangre, chocolate BHI 37°C	<i>C. minutissimum</i> : limitadas, brillantes, blancas, convexas.	24-48hrs
Queratolitis Puntata	Extracto de levadura 37°C	<i>Corynebacterium sp.</i> : Colonias limitadas, cremosas, brillantes, convexas, blancas.	24-72hrs
	Sabouraud, Extracto de Levadura 37°C	<i>D.congolensis</i> : Limitada rugosa, cremosa de color amarillo-naranja.	48-72hrs
	BHI 37°C	<i>M.sedentarius</i> : Limitada lisa, brillante, cremosa, blanca amarillenta.	48-72hrs
Micetoma	Para primoaislamiento de cualquier clase de agente etiológico BHI, y Löwenstein-Jensen 37°C	<b>ACTINOMICETOS</b> <i>N.brasiliensis</i> : Limitada, seca, dura, blanca amarillentas.	

PATOLOGIA	MEDIO DE CULTIVO Y TEMPERATURA DE INCUBACION	CARACTERISTICAS DE LA COLONIA DEL AGENTE ETIOLÓGICO	TIEMPO DE INCUBACION
Cont. Micetoma	Para la resiembra en agar Sabouraud con actidione para los actinomicetos y cloramfenicol para los eumicetos 22°C	<p><i>N.asteroides</i>: Limitadas, secas, de color naranja, acuminada, surcada, de consistencia suave.</p> <p><i>N.otitis-cavarium</i>: Limitadas secas, duras, blancas planas, yesosas.</p> <p><i>A.madurae</i>: Colonias pequeñas, limitadas, de color amarillento.</p> <p><i>A.pelletieri</i>: Colonias limitadas de color rojo coral, húmedas, blandas, acuminadas y cerebriforme.</p> <p><i>S.somaliensis</i>: Pequeñas, limitadas, secas, duras, blancas amarillentas, a veces azulosas.</p> <p><b>EUMICETOS</b> Hongos negros</p> <p><i>M.mycetomatis</i>: Limitadas de color café amarillento, de aspecto veloso, pigmento negro difusible al medio.</p> <p><i>M.grisea</i>. Limitadas, velosas, secas grises, aspecto de "pelo de ratón", pigmento difusible al medio marrón.</p>	<p>8-12 días</p> <p>15-40 días</p> <p>10-20 días</p>

PATOLOGIA	MEDIO DE CULTIVO Y TEMPERATURA DE INCUBACION	CARACTERISTICAS DE LA COLONIA DEL AGENTE ETIOLÓGICO	TIEMPO DE INCUBACION
Cont. Micetoma		<p><i>E. jeanselmei</i>: Colonias de tipo levaduriforme, húmedas y glabras. (5 días). después de los 5 días se vuelven vellosas, secas de color verde, pigmento negro difusible al medio.</p> <p>hongos blancos <i>P. boydii</i>: Colonia seca, vellosa, limitada, en un inicio blancas y después de unos días se tornan cafes , pigmento similar poco difusible al medio.</p> <p><i>Cephalosporium sp</i>: Colonias limitadas, vellosas, húmedas, planas de color blanco-amarillento, algunas cepas de <i>C. falciforme</i> tienen pigmento violeta al reverso.</p> <p><i>Fusarium sp</i>: Colonias planas de color blanco o blanco amarillento con pigmento naranja o violeta difusible al medio.</p>	2-10 días
Esporotricosis	<p>Sabouraud y micosel a 28°C (fase filamentososa)</p> <p>BHI, gelosa sangre a 37°C (fase levaduriforme)</p>	<p><i>S.schenkii</i>: Colonias radiadas, membranosas, de color blanco, después de unos días aparece micelio aéreo, acuminada de color café obscuro.</p> <p><i>S.schenkii</i>: Colonias cremosas, amarillentas, ligeramente acuminadas, similar a colonias bacterianas.</p>	<p>3-8 días</p> <p>3-5 días</p>

PATOLOGIA	MEDIO DE CULTIVO Y TEMPERATURA DE INCUBACION	CARACTERISTICAS DE LA COLONIA DEL AGENTE ETIOLÓGICO	TIEMPO DE INCUBACION
Cromomicosis	Sabouraud y micosel a 25°C	<p><i>P. pedrosoi</i>: Colonias pardas, vellosas, aterciopeladas limitadas, en ocasiones pigmento negro difusible al medio</p> <p><i>P. verrucosa</i>: Colonia plana limitada, negra vellosa aterciopelada con pigmento negro poco difusible al medio.</p> <p><i>C. carrioni</i>: Colonias planas radiadas verdes o grisáceas, aterciopeladas, vellosas, con pigmento difusible al medio.</p>	<p>3-4 semanas</p> <p>3-4 semanas</p> <p>2-3 semanas</p>
Coccidioidomycosis	Sabouraud, Micosel a 22°C	<i>C. immitis</i> : Colonias limitadas, blancas, de aspecto veloso de consistencia seca.	4-8 días
Histoplasmosis	<p>Sabouraud y micosel a 28°C (fase filamentosa)</p> <p>Gelosa sangre, BHI y Extracto de levadura a 37°C (fase levaduriforme)</p>	<p><i>H. capsulatum</i>: Existen 2 tipos de colonias la A (proviene de una cepa blanca) y la B (cepa café pardo), ambas son de aspecto veloso, limitadas y secas.</p> <p><i>H. capsulatum</i>: Colonias levaduriformes, pequeñas de color blanco amarillento y son limitadas.</p>	<p>1-2 semanas</p> <p>1-2 semanas</p>

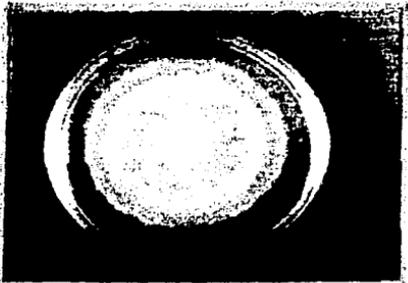
PATOLOGIA	MEDIO DE CULTIVO Y TEMPERATURA DE INCUBACION	CARACTERISTICAS DE LA COLONIA DEL AGENTE ETIOLÓGICO	TIEMPO DE INCUBACION
Paracoccidioidomicosis	Sabouraud y Extracto de levadura a 28°C (fase filamentosa)	<i>P. brasiliensis</i> : Colonias limitadas, algodonosas, rugosas, de color blanco-amarillento y después se van tornando café.	10-12 días
	Gelosa sangre y gelosa Chocolate a 37°C (fase levaduriforme)	<i>P. brasiliensis</i> : Colonias limitadas cremosas, rugosas o cerebriformes de color blanco-amarillento.	10-12 días
Blastomicosis Nortamericana	Sabouraud, micosel a 28°C (fase filamentosa)	<i>B. dermatitidis</i> : Colonias limitadas, vellosas, ligeramente húmedas de color blanco que se van poniendo café.	2-4 semanas
	Gelosa sangre y gelosa 37°C (fase levaduriforme)	<i>B. dermatitidis</i> : Son cremosas limitadas, plegadas amarillentas.	1-2 semanas
Candidosis	Sabouraud, micosel, etc 25°C	<i>Candida sp.</i> Colonias limitadas, planas, opacas, generalmente son lisas, aunque se llegan a presentar rugosas, son de color blanco o amarillentas. Aquí no se pueden diferenciar las especies por lo que se recomienda realizar los auxonogramas y zimogramas, además de la siembra en Corn-meal Ver pag. ( 85 ).	48-72 hrs
Criptococosis	Sabouraud, Extracto de Levadura, BHI a 37°C	<i>C. neoformans</i> : Colonias limitadas, mucoides, convexas, blanco amarillento dan un aspecto de "leche condensada".	2-3 días

PATOLOGIA	MEDIO DE CULTIVO Y TEMPERATURA DE INCUBACION	CARACTERISTICAS DE LA COLONIA DEL AGENTE ETIOLÓGICO	TIEMPO DE INCUBACION
Cont. Criptococosis	Niger o alpiste negro 37°C	<i>C. neoformans</i> : Colonias café marrón, mucoides.	
Geotricosis	Sabouraud a 25 o 37°C	<i>G. candidum</i> : Colonias blancas, vellosas y húmedas.	2-5 días
Aspergilosis	Sabouraud a 28°C	<p><i>A. niger</i>: Son planas, granuladas, negras e ilimitadas.</p> <p><i>A. fumigatus</i>: Son colonias planas ilimitadas, polvosas o aterciopeladas, verdes, en ocasiones presentan un halo micelial blanco alrededor de la colonia raras veces un pigmento ocre al reverso.</p> <p><i>A. flavus</i>: Son ilimitadas, polvosas o aterciopeladas de color verde amarillento algunas cepas dan un pigmento color ocre difusible al medio.</p>	1-5 días
Mucormicosis	Sabouraud, gelosa sangre 28°C	<i>Rhizopus sp.</i> , <i>Mucor sp.</i> , <i>Absidia sp.</i> , y <i>Cunninghamella sp.</i> : Colonias blancas vellosas, algodonosas, tienden a llenar los recipientes en donde son cultivados, con el tiempo se vuelven cafés o grisáceas.	3-5 días.

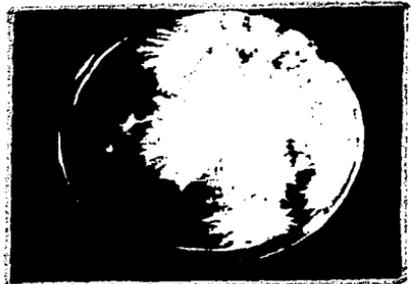
PATOLOGIA	MEDIO DE CULTIVO Y TEMPERATURA DE INCUBACION	CARACTERISTICAS DE LA COLONIA DEL AGENTE ETIOLÓGICO	TIEMPO DE INCUBACION
Entomoforomicosis			
Conidiobolomicosis	Sabouraud + cloramfenicol a 25 o 37°C	<i>C. coronatus</i> : Colonias limitadas, glabras membranosas, adherida al medio de color blanco-beige con escaso micelio húmedo.	3-4 días
Basidiobolomicosis	Sabouraud a 22°C	<i>B. haptosporus</i> : Limitadas de color blanco-beige de aspecto membranoso, rugoso y con escaso micelio húmedo.	2-3 días
Feohifomicosis	Sabouraud a 22°C	<i>C. bantianum</i> : Colonias compactas, vellosas, de color negro o gris con pigmento difusible al medio.  <i>E. gougerotti</i> : Colonias cremosas, negras y al paso del tiempo se convierte en una colonia vellosa y seca.	8-10 días  5-8 días
Actinomicosis	BHI, gelosa sangre a 37°C	<i>A. israelii</i> (principal agente etiológico de la actinomicosis): Masas miceliales suspendidas dando el aspecto de "araña", blancas amarillentas, cuando crecen se vuelven acuminadas, brillantes de aspecto ceroso.	3-6 días
Nocardiosis	Igual que Mictoma		

109

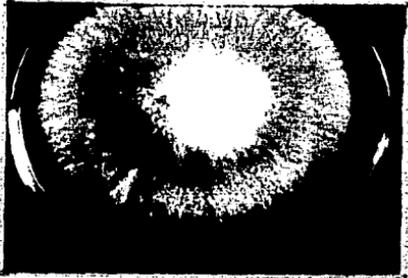
### **3.16 ILUSTRACIONES**



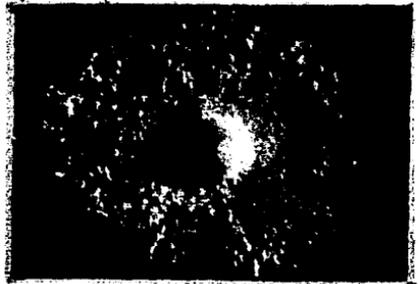
Colonia *M. m*



Colonia *M. m*



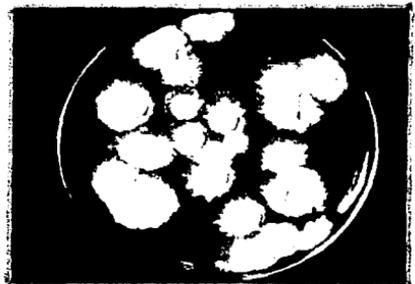
Colonia *M. m*



Colonia *E. coli* sobre *E. coli* son iguales



Colonia *M. m* sobre *E. coli*  
de interferencia por examen directo



Colonia *M. m* sobre *E. coli*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Colonia Micelial *H. capsulatum*  
o de *S. dermatitidis* son iguales



Colonia Levaduriforme *H. capsulatum*  
o de *S. dermatitidis* son iguales



Colonia Micelial de *S. boydii*

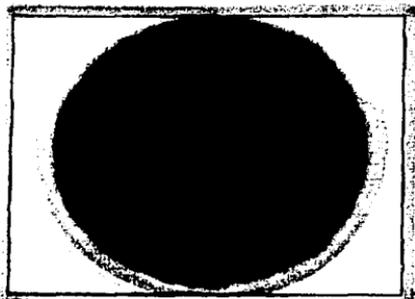


Colonia Levaduriforme de *S. boydii*



Colonia Micelial de *S. boydii* (1)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Colonia de *E. coli*



Colonia de *Pseudomonas*



Colonia de *Bacillus*



Colonia de *Staphylococcus*

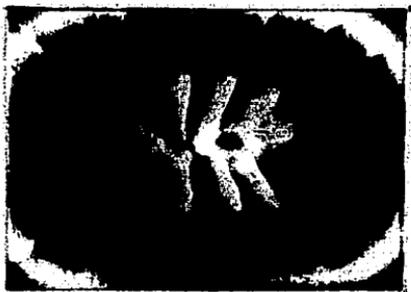


Colonia de *Klebsiella*



Colonia de *Streptococcus*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Colonia *Penicillium* sp.



Colonia *Fusarium* sp. (13)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **CAPITULO 4**

# **“PRUEBAS INMUNOLÓGICAS”**

## 4.1 INTRODUCCION A LAS PRUEBAS SEROLOGICAS

### NATURALEZA GENERAL Y CARACTERISTICAS DE LOS ANTICUERPOS

Un anticuerpo es una molécula bifuncional que se une a los antígenos mediante sus sitios para la fijación de éstos o que sirve como elemento de unión para que los antígenos se fijen a las células del sistema inmunitario, pueden cumplirse ambas funciones simultáneamente.<sup>(2)</sup>

### GENERALIDADES DE LOS ANTICUERPOS

- a) Se producen como respuesta a un estímulo antigénico
- b) Existen cinco clases (isótopos) de inmunoglobulinas: (IgG, IgE, IgA, IgM e IgD) las IgG se subdividen en cuatro grupos y las IgA e IgM en dos subgrupos. Todas las moléculas de anticuerpos conocidas contienen cadenas ligeras  $\lambda$  y  $\kappa$ , y pesadas, que son diferentes dependiendo del tipo de inmunoglobulina de la que se trate: IgG ( $\gamma$ ), IgA ( $\alpha$ ), IgM ( $\mu$ ), IgE ( $\epsilon$ ) e IgD ( $\delta$ ).
- c) La estructura de los anticuerpos es heterogénea, de acuerdo con los correspondientes puntos antigénicos y con su función *in vivo* e *in vitro*.
- d) Todos los anticuerpos poseen la capacidad de conjugarse con sus respectivos antígenos.

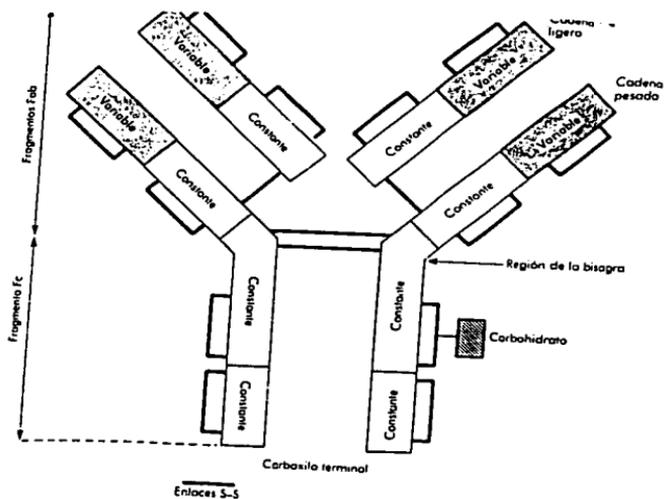
Los anticuerpos pueden clasificarse de acuerdo con su origen, su especificidad frente al huésped o las características de la reacción inmunológica en la que participan.

## GENERALIDADES DE LOS ANTIGENOS

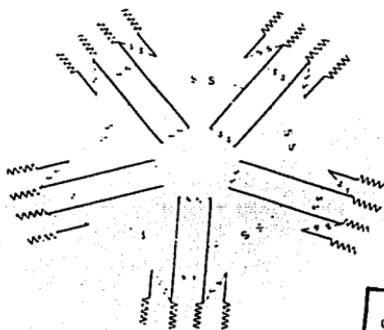
Los antígenos son moléculas de proteínas las características que le dan un carácter antigénico son:

- a) Las moléculas deben de ser identificadas por el organismo como no propias
- b) El peso de la molécula debe de ser mayor a 100,000 daltons, las moléculas menores de este peso son inmunógenos débiles y la que pesan menor de 10,000 daltons se deben de unir a una proteína para poder tener una reacción antigénica y se les conoce comúnmente como haptenos.
- c) Complejidad química y estructural
- d) Deben de tener pequeños grupos químicos en la molécula que pueden estimularse y reaccionar con los anticuerpos a estos grupos se les conoce como determinantes antigénicos o epitopos. En general un epítipo tiene alrededor de 5 aminoácidos o azúcares, pero lo que determina la especificidad antigénica es la estructura global tridimensional.
- e) La constitución génica del huésped ya que cada individuo reacciona de diferente manera a los antígenos.
- f) La dosificación y tiempo y vía de entrada del antígeno al organismo pueden desarrollar diferentes tipos de respuestas inmune.

### REPRESENTACION ESQUEMATICA DE IgG



### ESQUEMA DE LA ESTRUCTURA PENTAMERICA DE LA IgM



(5) TESIS CON FALLA DE ORIGEN

#### **4.2 FUNDAMENTOS DE LAS REACCIONES SEROLÓGICAS**

Cuando una sustancia penetra al organismo y es reconocida como extraña y estimula la formación de inmunoglobulinas (anticuerpos) que tengan la capacidad de combinarse con la sustancia reconocida como extraña que dio lugar a su formación se va a dar el complejo antígeno-anticuerpo.

Los métodos serológicos se basan en la especificidad de las reacciones antígeno-anticuerpo para el diagnóstico de varias enfermedades, ya que la presencia de un anticuerpo específico en el suero, sugiere o indica que existió o existe una infección causada por el antígeno que determina la formación de ese anticuerpo.

Cuando se sospecha de algún agente etiológico y no se puede aislar este, las pruebas serológicas son de gran ayuda para poder determinarlo y también para poder valorar la continuidad de la infección.

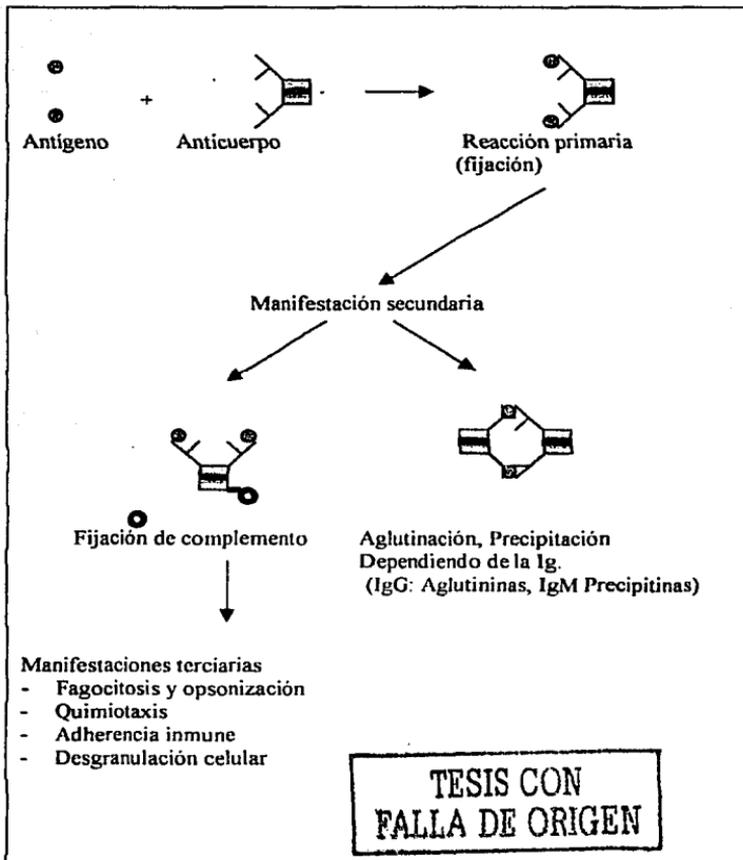
Para poder obtener resultados fehacientes sobre una posible enfermedad se deben de tomar muestras lo más pronto posible, 2 semanas después y una tercera alrededor de la cuarta semana.

Cuando los títulos de anticuerpos dan iguales en las muestras quiere decir que la producción de dichos anticuerpos fue debido a una infección pasada.(17)

### 4.3 TIPOS DE REACCIONES INMUNOLOGICAS

Las pruebas antígeno-anticuerpo pueden clasificarse según si la prueba depende de una interacción primaria entre el anticuerpo y el antígeno que se basa en el reconocimiento específico y la combinación de un determinante antigénico con el punto de conjugación de su anticuerpo correspondiente o si se basa en una manifestación secundaria tal como una precipitación, floculación, aglutinación, fijación de complemento, etc. Las reacciones terciarias tienen lugar como reacciones biológicas subsiguientes a los niveles primarios y secundarios, estas reacciones incluyen muchos efectos biológicos de la activación de complemento, como la opsonización, fagocitosis, quimiotaxis, etc. (2)

## REACCIONES ANTIGENO-ANTICUERPO



Las pruebas cuantitativas, que dependen por completo de la interacción primaria entre el antígeno y el anticuerpo comprenden la inmunofluorescencia, el radioinmunoensayo y pruebas inmunoenzimáticas.

Las pruebas primarias son más sensibles que las secundarias o terciarias y no dependen de variables que controlan las reacciones secundarias o terciarias.

Las pruebas primarias requieren de:

- Un antígeno purificado o una preparación de anticuerpos
- Una técnica para cuantificar el antígeno o el anticuerpo mediante el uso de un radioisótopo, enzima o marca fluorescente.
- Un método para separar el complejo reacción antígeno-anticuerpo de los antígenos o anticuerpos libres.

#### **4.4 VISION GLOBAL Y PRINCIPIOS GENERALES DE LOS INMUNOANÁLISIS**

Los inmunoanálisis son técnicas diseñadas para poder detectar y en algunos casos hasta cuantificar los antígenos o anticuerpos. Pueden emplearse reactivos marcados o sin marca, los reactivos no marcados presentan limitaciones en cuanto a la sensibilidad ya que para poder detectarlos deben formarse grandes cantidades de complejos antígeno-anticuerpo. Algunos ejemplos de estos son: inmunoprecipitación y aglutinación, para detectar dichos complejos por técnicas de equilibrio o cinéticas.

**SENSIBILIDAD RELATIVA DE LAS PRUEBAS INMUNOLOGICAS  
DE REACCIONES DE TIPO SECUNDARIO<sup>o</sup>**

<b>PRUEBA INMUNOLOGICA</b>	<b>MINIMO DE ANTICUERPO DE- TECTABLE O NECESARIO PA- RA LA REACCION EN <math>\mu</math>g</b>
Precipitación	
<i>Precipitación en tubo</i>	0.1
Inmunodifusión	0.1-0.3
Aglutinación	
Cualitativa	0.05
Cuantitativa	0.02-0.1
Hemaglutinación	0.001
Fijación de complemento	0.05

Los sistemas de inmunoanálisis basados en el anticuerpo como reactivo analítico específico pueden subdividirse en dos clases de métodos principalmente. Estos son: Los análisis de Tipo I que se basan en el empleo de un *exceso de anticuerpo* sobre el elemento utilizado, y los de Tipo II donde la cantidad de anticuerpo es *menor que* la del elemento que se analiza en el sistema.<sup>(3)</sup>

Tipo I: antígeno + exceso de anticuerpo  $\longrightarrow$  *Complejo antígeno-anticuerpo + anticuerpo residual.*

Tipo II: exceso de antígeno + anticuerpo  $\longrightarrow$  *Complejo antígeno-anticuerpo + antígeno residual.*

#### **4.5 PRUEBAS DE SENSIBILIDAD CUTANEA (Intradermorreacciones)**

Con éstas pruebas se investiga la inmunidad celular del individuo, la cual consiste en una defensa menor en la defensa del hospedero contra los microbios invasores. Esta se encuentra formada por células de gran complejidad que combinan características específicas e inespecíficas, entre las que se encuentran las células linfoides dependientes del timo que reconocen a los microbios invasores e inician una cadena de respuestas en las cuales incluyen reacciones inflamatorias mononucleares, destrucción citotóxica de las células invasoras, activación de macrófagos fagocitarios y reacciones de hipersensibilidad retardada en los tejidos.

En el curso de dichos acontecimientos, los microorganismos o células extrañas son fijados en su punto de entrada, limitando así su invasividad.<sup>(1)</sup>

#### **PROCEDIMIENTO**

Se realizan inyectando intradermicamente en el antebrazo o en la región interescapulovertebral, 0.1ml de soluciones de antígenos obtenidos de filtrados de cultivos o extractos de polisacáridos (fase levaduriforme o filamentosa) de los hongos que causan micosis tanto superficiales como profundas, la dilución de las soluciones por lo regular es de 1:2000 (aproximadamente  $5 \times 10^7$  células por ml), la lectura se efectúa entre las primeras 24-48hrs.<sup>(2)</sup>

## DIAGNOSTICO

La intensidad de la reacción se mide por el tamaño de la induración, no por el eritema. Una reacción positiva mide 5mm de diámetro, cuando miden menos de 5mm la reacción es dudosa y si no existe induración es negativa. (6)

## EJEMPLOS DE LAS INTRADERMORREACCIONES

ANTÍGENO	INDICATIVA DE:
- Candidina	No es diagnóstica e indica contacto previo con el hongo
- Coccidioidina	Si es positiva indica infección, pero si es positiva con lesiones es buen pronóstico y si hay lesiones pero es negativa es un mal pronóstico
- Esporotricina	Sólo es diagnóstica cuando se presentan lesiones
- Histoplasmina	Es diagnóstica si es positiva
- Tricofitina	No es diagnóstica y aveces se utiliza en dermatofitosis inflamatorias y profundas.
- Paracoccidioidina	Diagnóstica si es positiva, pero existen reacciones cruzadas con la histoplasmina.

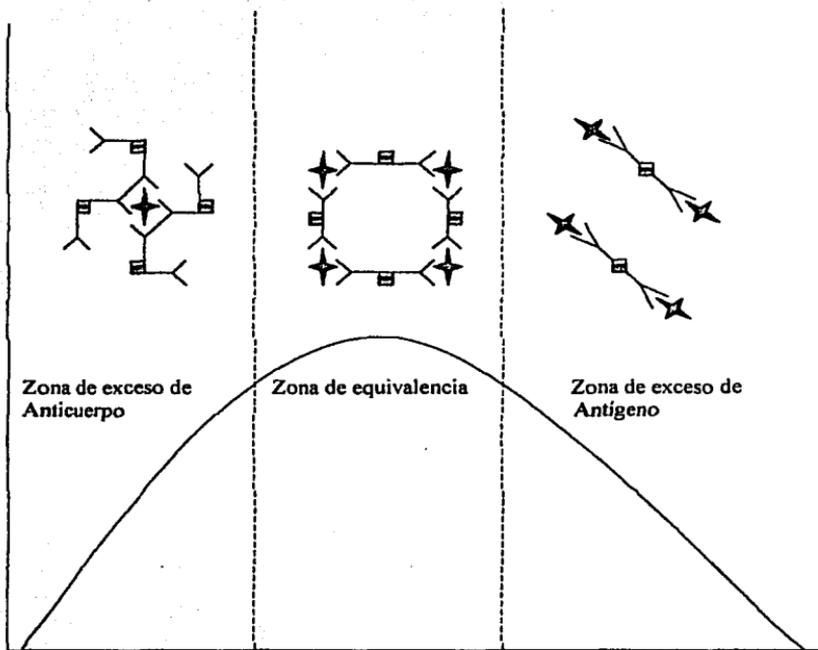
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### 4.6 FUNDAMENTOS DE LAS REACCIONES DE PRECIPITINAS

El precipitado que se constituye cuando se combinan grandes complejos de antígeno y anticuerpo para formar un retículo insoluble se ha utilizado profusamente para identificar y cuantificar las reacciones inmunológicas. El anticuerpo principal que se determina son las IgM, que son inmunoglobulinas primarias.<sup>(2)</sup>

Cada una de las formas de aplicación de las técnicas de precipitación tiene una ventaja distinta de sensibilidad, especificidad y simplicidad.

En las reacciones de precipitación (precipitina), el antígeno se encuentra en solución. El anticuerpo entrelaza las moléculas de antígeno en proporciones y agregados variables (precipitados), en la zona de equivalencia, proporciones óptimas de antígeno-anticuerpo se combinan y la precipitación es máxima, cuando hay exceso de anticuerpo el sobrenadante tiene anticuerpo sin combinar y la precipitación es submáxima y en la zona con exceso de antígeno todo el anticuerpo se combina, pero la precipitación es reducida ya que muchos de los complejos formados son solubles.<sup>(3)</sup>



\*En el eje de las X se tiene la concentración de antígeno

\*En el eje de las Y se tiene al precipitado antígeno-anticuerpo

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

La cuantificación del antígeno se determina midiendo la cantidad de precipitado, esto se logra comparando el problema con estándares conocidos o también se pueden realizar midiendo la cantidad de nitrógeno del precipitado que proviene del antígeno, con frecuencia esta medición se realiza con el micrométodo de Kjeldhal (Ver pag 21) y si

las proporciones son adecuadas precipita todo el antígeno, por tanto el nitrógeno del precipitado proveniente del antígeno puede ser deducido y se puede realizar una cuantificación directa del anticuerpo en el suero inmunológico.

Los factores que afectan las reacciones de precipitación son, temperatura, pH, proporciones de reactantes, concentración de sales, etc.

La reacción de precipitación constituye la base de muchas técnicas inmunoquímicas ya sea cuantitativas o cualitativas.

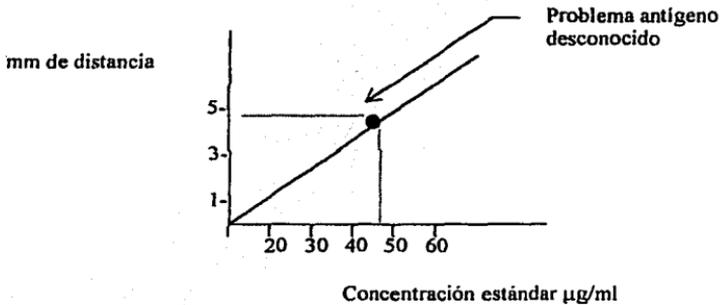
### **PRECIPITACION EN TUBO**

Consiste en preparar una serie de tubos de ensayo, los cuales cada uno tiene una cantidad conocida de antisuero, después a cada uno se le añade en forma secuencial una cantidad creciente de antígeno utilizado para la inmunización, después se deja reposar cierto tiempo para que tenga lugar la precipitación, una vez que se forma el precipitado se compara con los estándares que contienen cantidades de antígeno conocido y según el ancho de la banda de precipitación es la cantidad de antígeno.

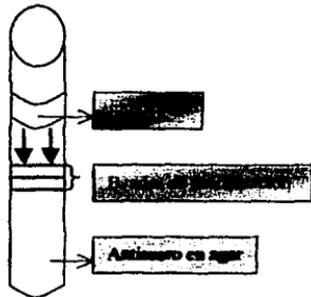
## **INMUNODIFUSION SIMPLE**

Comprende la incorporación de anticuerpos en el gel de agar a una temperatura lo suficientemente baja para evitar la desnaturalización y permitir el relleno de los recipientes adecuados como tubos de ensayo, placas de Petri o portaobjetos. La aplicación directa del antígeno que hay que estudiar se realiza entonces como una capa en el tubo de ensayo o por difusión desde un disco introducido en las placas del agar. Después de un tiempo de espera para permitir una difusión y equilibrio, aparece la formación de bandas de precipitación en el agar. La observación visual confirma la presencia de una línea de precipitación en el agar. Esta línea se forma en el punto de relación óptima antígeno-anticuerpo, que es el mismo punto de equivalencia del precipitado. La distancia de la línea de precipitación del punto de aplicación del antígeno es directamente proporcional a la concentración del antígeno cuando se usa una cantidad definida de antisuero.

Mediante una comparación gráfica con preparaciones de estándares de antígenos, se puede determinar la cantidad del antígeno desconocido. El principio de la técnica consiste en que el antígeno difunde a través del agar que contiene los anticuerpos hasta conseguir el punto de equivalencia y que se forme la línea de precipitación.)



inmunodifusión sencilla en una dimensión (tubo de Oudin) el antígeno difunde de la capa superior al interior del agar que contiene el antisuero, en el cual se forman las líneas de precipitación a los puntos de equivalencia para cada antígeno distinto.



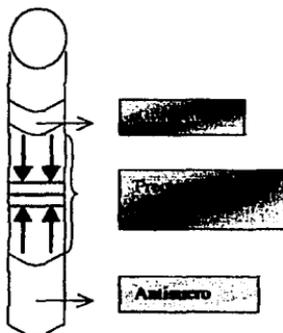
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **INMUNODIFUSIÓN DOBLE**

El principio de la prueba es el mismo que en la inmunodifusión simple, los recipientes pueden ser del mismo tipo que en la simple, pero en este caso se incorpora un gel de agar como medio de soporte, el cual separa el antígeno del anticuerpo; El antígeno y el anticuerpo se aplican en puntos separados mediante cilindros perforantes en el agar o bien colocando el anticuerpo en la base del tubo de ensayo y separándolo del antígeno mediante una capa de agar, se deja reposar entre 18-48 horas para que los reactantes se pongan en contacto en la interfase de difusión, y en el punto de equivalencia se formará una línea de precipitación.

Este método también se puede utilizar de forma semicuantitativa inspeccionando el grosor de la línea de precipitación y determinando la distancia de migración desde los depósitos de los reactantes, ya que si la línea de precipitación se forma más cerca de donde se deposita el antígeno quiere decir que hay un exceso de anticuerpo y si se forma más cerca del depósito del anticuerpo quiere decir que existe un exceso de antígeno. La comparación con un antígeno de concentración conocida que ha reaccionado en un equilibrio paralelo.»

Inmunodifusión doble en una dimensión el antígeno difunde en el agar partiendo de la capa superior mientras que el anticuerpo lo hace desde abajo. En los puntos de equivalencia de cada antígeno diferente se forman bandas de precipitación.



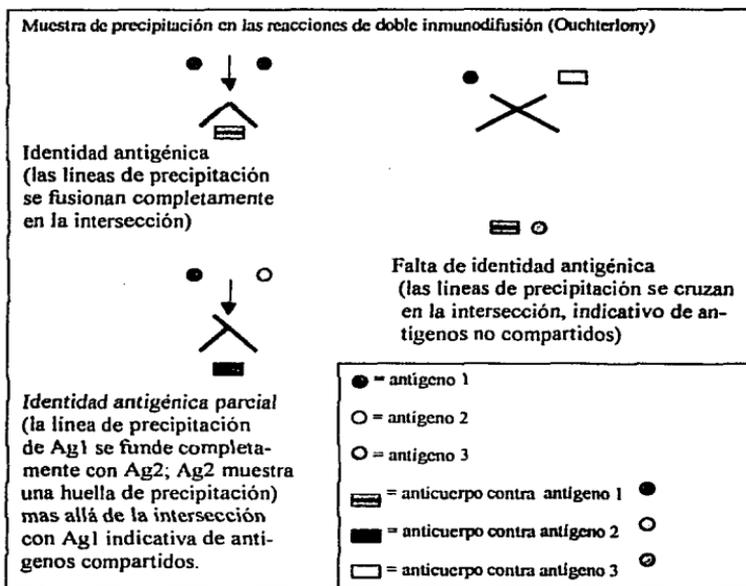
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### INMUNODIFUSION DOBLE EN DOS DIMENSIONES

Este es un método también se conoce como método de **Ouchterlony** que representa una variación del método inmunodifusión doble. Esta técnica se lleva a cabo en un caja de Petri o en un portaobjetos y se utiliza para comparar diferentes antígenos o distintos anticuerpos.

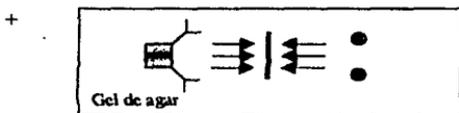
El principio es básicamente el mismo de lo que es la inmunodifusión, pero aquí se trata de demostrar a las moléculas que comparten una estructura antigénica similar, idéntica o que no comparten ninguna.

Las moléculas que comparten una estructura antigénica idéntica en la línea de precipitación forman una figura de completa coalescencia, mientras que las que presentan diferencias antigénicas parciales muestran un dibujo o figura de espolón, y las moléculas que son diferentes totalmente en su estructura antigénica muestran un dibujo entrecruzado de las líneas de precipitación.



### CONTRAELECTROINMUNOFORESIS (Reacción de electroinmunodifusión)

Este método es una variación de la reacción de inmunodifusión doble creada por el aumento de la difusión de los reactantes en gel de agar mediante el uso de la corriente eléctrica. El anticuerpo se coloca en el recipiente que favorece su difusión en dirección al cátodo, mientras que los antígenos, que suelen ser más negativos, se colocan en el depósito que favorece su migración al ánodo. El efecto electroforético (el paso de la corriente eléctrica por el agar) acelera la movilidad de los reactantes y su movimiento de encuentro, por lo que, la línea de precipitación se forma mucho más rápido de 30 a 60 min.



Electroinmunodifusión

Este método es 10 veces más sensible que la doble difusión sin corriente eléctrica. Este método está limitado a los antígenos ácidos. Es el más útil para la detección rápida de antígenos en los líquidos corporales; éste método se usa mucho para la detección de antígenos polisacáridos en LCR.

TESIS CON  
TALLA DE ORIGEN

### **INMUNODIFUSION RADIAL (IDR)**

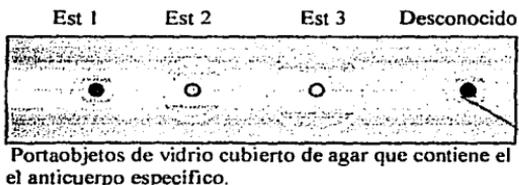
Es una técnica que se ha demostrado y que es de gran utilidad para cuantificar las inmunoglobulinas y proteínas séricas en el laboratorio clínico. El enfoque presenta básicamente una variación de la técnica de inmunodifusión simple, pero aquí se han incorporado el anticuerpo en el agar que se vierte sobre una bandeja o placa de cristal, se cortan unos discos en el agar y en ellos se coloca el material de experimentación. En general éste método se utiliza para cuantificar valores séricos de diferentes inmunoglobulinas, sobre todo IgG e IgM, IgE no se puede medir por que su concentración es muy baja.

Cantidades conocidas de estándares se colocan en algunas depresiones frente a otras con material desconocido a investigar. Después de haber dejado transcurrir un tiempo adecuado para que se lleve acabo la difusión y formación de anillos de precipitación alrededor de los discos, se traza gráficamente una curva estándar midiendo los diámetros de los anillos de precipitación para los diferentes estándares de concentración. Estos diámetros y concentraciones conocidas (estándares) se trazan en un papel semilogarítmico y se realiza a sí una curva patrón, por lo que después los diámetros de los anillos de precipitación de los problemas se interpolan en la curva patrón y así podemos conocer la concentración del material desconocido, el resultado se expresa en  $\mu\text{g/ml}$ .

En algunos casos, el deterioro del material desconocido de análisis puede dar lugar a la aparición de fragmentos de precipitación que también determinarán la aparición como artefacto de anillos dobles o triples de precipitación. Sin embargo, este

tipo de problemas aparecen en raras ocasiones y, en general, el método es el más simple y directo para la detección directa de macromoléculas como las inmunoglobulinas.<sup>(2,3,17)</sup>

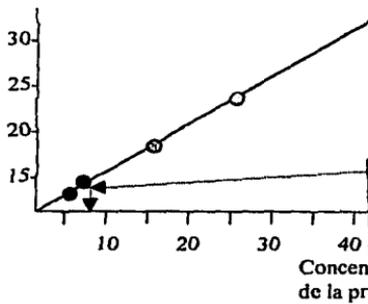
Diagrama de inmunocuantificación mediante el método de inmunodifusión radial simple



Línea de precipitación

- Estándar 1
- Estándar 2
- Estándar 3
- Desconocido o muestra

Diámetro del anillo  
De precipitación (mm)



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Concentración del reactante  
de la prueba (µg/ml)

#### 4.7 PRINCIPIOS Y FUNDAMENTOS DE LAS PRUEBAS DE AGLUTININAS

Cuando el antígeno no se encuentra en solución, pero se encuentra presente sobre la *superficie* de una partícula o célula y este entra en contacto con el anticuerpo que en este caso se trata de IgG que son inmunoglobulinas de memoria, da lugar a la formación de grumos de las partículas lo que se le conoce como *aglutinación*, que es una reacción serológica clásica que comprende la aglomeración de una suspensión celular mediante un anticuerpo específico. Este fenómeno se puede observar cuando antígenos corpusculares, como las células sanguíneas o microorganismos se exponen a un anticuerpo en condiciones adecuadas.

La reacción de aglutinación tiene lugar en dos pasos, el primero es cuando el anticuerpo se une al antígeno y el segundo es cuando se da la aglutinación denominando así al antígeno como antígeno completo.

La prueba de aglutinación es semicuantitativa, algunas veces la aglutinación puede ser valorada visualmente, la reacción de aglutinación es muy sensible y existen una gran cantidad de antígenos que se pueden detectar por medio de esta prueba, también es muy simple haciéndola muchas veces es engañosa, por lo que hay que tener un programa de control de la calidad mediante el uso de reactivos bien caracterizados y también se debe de conocer muy bien las causas de cuando pueden darse resultados falsos positivos y negativos.

Las reacciones de aglutinación se pueden clasificar en directas e indirectas estas últimas también se les conoce como pasivas.

### **PRUEBA DE AGLUTINACION DIRECTA**

Es una reacción que se manifiesta mediante una aglomeración de células o de una suspensión de partículas insolubles como microorganismos por anticuerpos específicos.

La agregación se lleva a cabo por anticuerpos que poseen dos o más receptores de conjugación cuando estos se encuentran unidos a los antígenos que se encuentran en la superficie celular o muy cerca de ella.

### **PRUEBA DE AGLUTINACIÓN INDIRECTA O PASIVA**

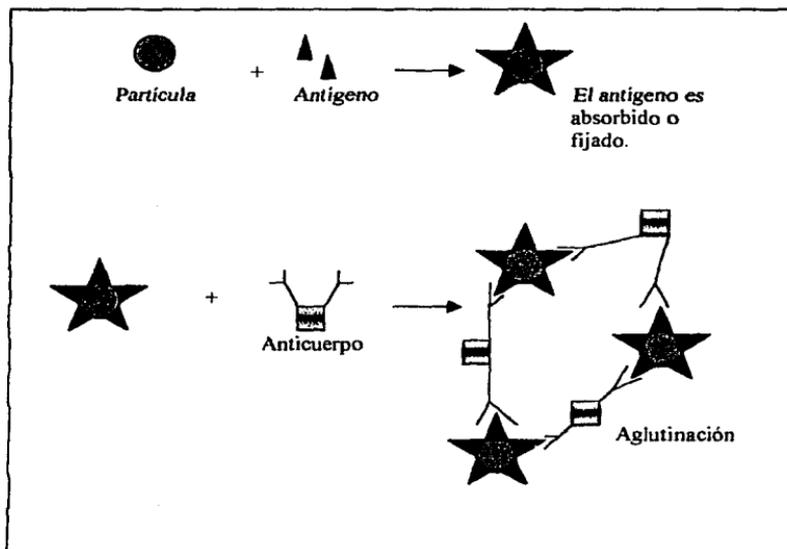
Es una técnica que tiene mucha utilidad en el laboratorio clínico, esta prueba se basa en la aglutinación de células o partículas inertes que son recubiertas de antígeno o anticuerpo soluble. Se le conoce como pasiva ya que las partículas son portadoras pasivas y los antígenos pueden ser absorbidos físicamente o acoplados en la superficie por enlaces covalentes.

Los glóbulos rojos humanos se pueden utilizar con gran eficacia como partículas inertes, los glóbulos rojos deben de ser primeramente adsorbidos por células no recubiertas para eliminar anticuerpos inespecíficos que puedan dar lugar a aglutinaciones inespecíficas, para que los antígenos se conjuguen mejor con la célula a los hematíes o glóbulos rojos se les da un tratamiento con ácido tánico.

Unas de las principales partículas que se utilizan como partículas inertes son la bentonita, colodión, carbón vegetal y el látex.

El látex es una suspensión de partículas esféricas de un polímero de poliestireno. Las proteínas y/o polisacáridos se adsorben en la superficie, o por enlaces covalentes a través de grupos carboxilo, por lo que permite que las partículas sean aglutinadas por el anticuerpo específico.»

### Aglutinación pasiva



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### 4.8 PRUEBA DE FIJACIÓN DE COMPLEMENTO (FC)

Se le conoce como complemento a un sistema que está constituido por 20 o más proteínas plasmáticas que interactúan entre si mismas y con las membranas celulares. Cada componente o sea cada proteína debe de ser activado en secuencia y bajo condiciones apropiadas para que la reacción progrese.

La prueba de FC sirve para identificar el antígeno en base a el anticuerpo, esto se realiza en dos etapas:

En la primera etapa se encuentra el antígeno y el anticuerpo (uno conocido y otro desconocido) se mezclan con una cantidad conocida de complemento, si el antígeno y el anticuerpo coinciden se entrelazan y se fijan al complemento y si estos compiten el complemento se consumirá.

En la segunda etapa a la mezcla primerz se le agregan eritrocitos sensibilizados (recubiertos con anticuerpo eritrocitario) como indicador. Si antígeno y anticuerpo mezclados han fijado complemento en la primera etapa, una cantidad menor de complemento se adherirá a los eritrocitos sensibilizados y éstos permanecerán sin hemolizar, es decir la prueba es positiva, pero si en el primer paso el anticuerpo no se combina con el antígeno. el complemento estará libre para adherirse a los eritrocitos y se hemolizarán, esto es una prueba negativa.

La cantidad de hemólisis se mide para determinar la cantidad de complemento que no se consumió en la primera etapa.<sup>(A.17)</sup>

#### **4.9 PRUEBA DE ELISA (enzyme-linked-immuosorbent assay)**

Esta prueba se basa en la especificidad de los anticuerpos. Se emplean enzimas como ligandos para unir las moléculas de anticuerpos; las reacciones enzimáticas son muy sensibles por eso mismo algunos productos de reacciones enzimáticas se pueden medir en cantidades muy pequeñas, por lo que la utilización de ligandos enzimáticos disminuye la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo requerida para su detección

La unión de las enzimas con los anticuerpos se realiza de una manera covalente, de modo que no se alteran las propiedades catalíticas de la enzima y el anticuerpo queda con su misma especificidad. Dentro de las enzimas más utilizadas se encuentran: peroxidasa, fosfatasa alcalina y galactosidasa, las cuales catalizan reacciones cuyos productos son de color y se pueden determinar en muy pocas cantidades.

Dentro de las pruebas de ELISA se encuentran dos métodos el directo y el indirecto. En la directa se detectan antígenos, en este método el antígeno queda atrapado entre dos capas de anticuerpo.

##### **Procedimiento:**

La muestra se coloca en los pozos de una placa de microtitulación la cual esta recubierta con anticuerpos específicos para el antígeno que se desea detectar, si el antígeno está presente en la muestra quedará atrapado por los sitios de fijación del antígeno sobre el anticuerpo, después se lava para eliminar el material que no se asocia, se adiciona el segundo anticuerpo con la enzima conjugada que también es específico para el antígeno y se fijará en los determinantes antigénicos restantes, se vuelve a lavar y se determina la actividad enzimática del material adherido en cada pozo, adicionando

el sustrato de la enzima. El color formado es proporcional a la cantidad de antígeno presente.

### ELISA para la detección de antígenos



1: El anticuerpo contra el antígeno se une al pozo del microtitulador



2: La muestra se adiciona como fuente de antígeno, lavar

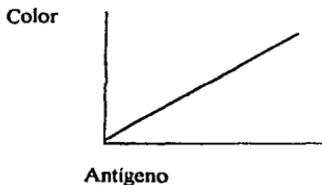
Emparedado de doble anticuerpo



3: Anticuerpo marcado con enzima ☆ (anticuerpo secundario) adicionada  
El anticuerpo marcado con enzima se fija con el antígeno; lavar



4: Se adiciona el sustrato □ para la enzima  
Producto de color de la enzima ☆ formado  
El color es proporcional a la cantidad de antígeno



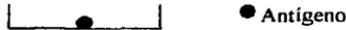
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

En la prueba indirecta se detectan anticuerpos

Procedimiento:

En este tipo de ELISA los pozos del microtitulador se recubren con el antígeno y se le adiciona una muestra de suero, si existen anticuerpos en el suero para ese antígeno se formara el complejo antígeno-anticuerpo, después se debe de lavar y se le adiciona un segundo anticuerpo de "detección", que es un anticuerpo IgG anti-humano de cabra o de conejo el cual contienen una enzima conjugada, se adiciona el sustrato de la enzima y como en el caso directo se determina la actividad enzimática por medio del color que desarrolla y este es proporcional a la cantidad de anticuerpo circulante en el suero. (15)

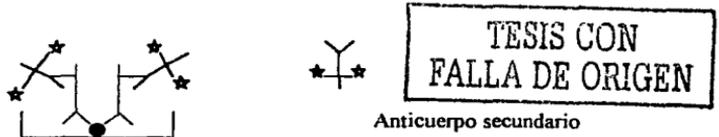
ELISA indirecto para la detección de anticuerpos



1: El antígeno se fija al pozo del microtitulador



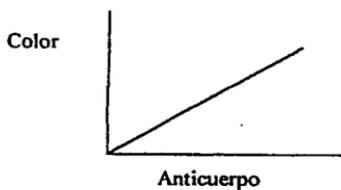
2: El anticuerpo del suero se adiciona; se lava



3: Se adiciona el anticuerpo anti-humano marcado con enzima. Se lava



4: Se adiciona el sustrato a la enzima. El color formado es proporcional a la cantidad de anticuerpo en el suero



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### 4.10 INMUNOANÁLISIS POR FLUORESCENCIA

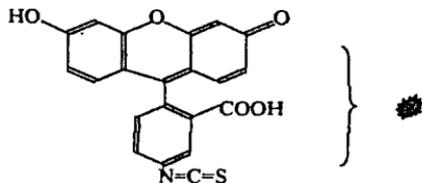
Las moléculas de anticuerpos pueden volverse fluorescentes agregándoles químicamente un compuesto orgánico fluorescente, como la rodamina B o el isotiocianato de fluoresceína, esta unión se realiza mediante enlaces covalentes por lo que no se daña la especificidad del anticuerpo de manera importante, esta unión hace posible que se detecten los anticuerpos en el microscopio de fluorescencia. Esto es posible ya que una molécula de tipo fluorescente al ser irradiada por luz de una longitud de onda adecuada (luz UV de baja frecuencia), se excitan los electrones y cambian a un estado de mayor energía (cambian de órbita) y cuando recupera su estado basal (su órbita) la energía se libera en forma de fotones, los cuales tienen mayor longitud de onda que la luz con la que se irradia.

Cada compuesto fluorescente tiene un parámetro máximo de excitación y emisión.

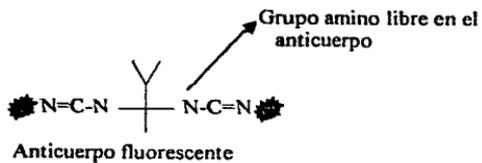
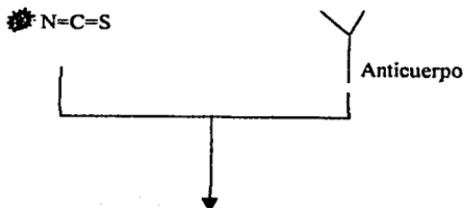
Existen dos tipos de procedimientos de los inmunoanálisis fluorescentes, el **directo** y el **indirecto**. En el directo los anticuerpos contra el organismo son por sí mismos fluorescentes, y ocurre cuando el anticuerpo marcado reacciona en forma directa con el antígeno., se realiza de forma similar al ELISA directo.

Indirecto se pone de manifiesto un anticuerpo que se encuentra en la superficie de una célula que forma complejo antígeno-anticuerpo, el antígeno que se agrega es conocido y después se le adiciona el anticuerpo marcado que va a reaccionar con determinantes antigénicos (epitopos) libres del antígeno adicionado y se volverá a formar un complejo antígeno-anticuerpo el cual es fluorescente y se visualiza en el microscopio de fluorescencia. (2,3,17,18)

### Preparación de anticuerpo fluorescente



### Isotiocianato de fluoresceína



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### 4.11 RADIOINMUNOANALISIS

Los radioinmunoanálisis (RIA) son los métodos más sensibles y versátiles que existen para la cuantificación de antígenos o haptenos que pueden ser marcados con radiactividad.

Se basa en la competencia por un anticuerpo específico entre la concentración marcada la cual es conocida y la no marcada del material la cual no es conocida.

Los complejos formados entre el antígeno o hapteno y el anticuerpo se pueden separar entonces determinándose la cantidad de radiactividad y la concentración del antígeno no marcado (desconocido) se determina comparándose el efecto con los obtenido usando varias concentraciones de un antígeno estándar predeterminado

Existe un tipo de RIA que se utiliza para la determinación cuantitativa de anticuerpos séricos IgE, que reaccionan con un alérgeno específico, la cual se conoce como prueba de absorción alérgorradiactiva (RAST), el propósito del estudio es valorar la reacción a algunos estimulantes de alergias, constituye una alternativa segura y conveniente de valoración cutánea.

**4.12 PRUEBAS SEROLOGICAS UTILES EN LA DETERMINACION DE MICOSIS**

Infección	Antígenos	Pruebas	Interpretación
Aspergilosis	<i>A.fumigatus</i> <i>A.niger</i> <i>A.flavus</i>	Inmunodifusión	Una o varias bandas de precipitación sugieren una infección activa. Estas bandas parecen estar relacionadas con los títulos de FC. cuantas más bandas mayor título
Blastomicosis	<i>B.dermatitidis</i> Forma levadura  Filtrado de cultivo de levaduras	FC  Inmunodifusión	Los títulos de 1:8 a 1:6 sugieren infección activa, los títulos 1:32 o superiores son indicativos. Pueden presentarse reacciones cruzadas con pacientes que tengan Histoplasmosis y Coccidioidomicosis. Una disminución de los títulos es indicativa de regresión de la infección. Los resultados preliminares muestran que es más sensible que FC, se detectan hasta un 80% de los casos.
Candidosis	<i>C.albicans</i>	Contrainmuno-electroforesis  Aglutinación en látex	Prueba difícil de interpretar ya que las precipitinas también se presentan en los individuos sanos. Precipitación visible después de las 2-3 semanas de iniciada la enfermedad.
Coccidioidomicosis	Coccidioidina	FC	Infección activa títulos de 1:2 a 1:4 en títulos bajos se deben de seguir pruebas repetidas a intervalos de 2-3 semanas. Las lesiones pulmonarias suelen dar falsos negativos. Los títulos son directamente proporcionales a la gravedad de la infección

Infección	Antígenos	Pruebas	Interpretación
Coccidioidomicosis	Coccidiolina  Coccidiolina	Inmunodifusión  Aglutinación en látex   FC	Los resultados se corresponden con FC y pueden utilizarse como prueba selectiva. Las precipitinas aparecen durante las 3 primeras semanas de la infección, tiene valor diagnóstico pero no pronóstico. Las pruebas falsas positivas se presentan con frecuencia cuando se utilizan suero diluido o LCR. Se presenta de manera tardía por lo general cuando las precipitinas disminuyen o desaparecen, su título se mantiene durante el curso de la enfermedad y es directamente proporcional a la cantidad de parásitos. Títulos mayores entre 1:64 o más indican diseminación de la enfermedad.
Criptococosis	No se utiliza antígeno, sino partículas de látex recubiertas con globulina hiperinmune anticriptocócica	Aglutinación en látex	La presencia de polisacáridos criptocócicos en los líquidos orgánicos es indicativa de criptococosis. La regresión de los títulos es indicativa de mejoría. En LCR se determinan un 95% de las enfermedades con meningitis y un 30% sin meningitis. La presencia de los polisacáridos se manifiesta con la aglutinación.
Histoplasmosis	Histoplasmina y levadura de <i>H. capsulatum</i>	FC	Los títulos de 1:8 a 1:16 son sospechosos de infección; títulos de 1:32 o más elevados son indicativos de infección activa. En pacientes

Infección	Antígenos	Pruebas	Interpretación
Histoplasmosis	Histoplasmina	continuación FC	<p>con aspergilosis, blastomycosis o coccidioidomicosis se presentan reacciones cruzadas aunque los títulos son más bajos.</p> <p>En personas que han sufrido una exposición previa a <i>H. capsulatum</i> en un 17 a un 20% la prueba sale positiva aunque no se este con una infección.</p> <p>El antígeno de levadura es más efectivo que la histoplasmina.</p>
	Histoplasmina	Inmunodifusión	<p>Cuando aparecen las bandas de los antígenos de la fase Micelial y levaduriforme se indica una infección activa, la banda micelial(M) puede aparecer sola e indica una infección inicial o crónica la banda levaduriforme(L) aparece más tarde que la M y desaparece más pronto y esta desaparición puede indicar remisión de la enfermedad.</p> <p>La prueba no es fiable se presentan muchos falsos positivos y falsos negativos cada análisis positivo se debe de confirmar con FC.</p>
Esporotricosis	Levadura de <i>S.schenckii</i>	Aglutinación	<p>Los títulos de 1:80 o más suelen indicar infección activa. En algunos casos cutáneos se pueden presentarse pruebas negativas en infecciones extracutáneas se dan pruebas positivas.</p>

## **CAPITULO 5**

# **“PRUEBAS RADIOLÓGICAS”**

## 5.1 FUNDAMENTOS DE PRUEBAS CON RAYOS X

Los tejidos blandos y óseos del cuerpo se pueden examinar por medio de los rayos X (rayos Roentgen) que son vibraciones electromagnéticas de longitud de onda muy corta que son producidos cuando los electrones de movimiento rápido chocan con diversas sustancias. Por su corta longitud de onda pueden penetrar sustancias muy densas y producir una sombra o esbozo que se registra en una película fotográfica. Basicamente el principio o fundamento de una radiografía se basa en las diferentes densidades que tienen los órganos del cuerpo, las cuales producen sombras de intensidad variable sobre la película que es afectada de igual manera que con la luz. La sensible emulsión de plata de la película experimenta un cambio químico cuando se expone a la radiación

Los rayos X viajan a la velocidad de la luz en línea recta y cuando estos pasan a través de una materia, la intensidad es reducida por la absorción que se lleva a cabo, la cual entre más densa sea la materia mayor absorción de estos va a tener, y la placa se revela y fija produciendo una imagen negra, blanca y de varios tonos de gris.

Actualmente existen equipos que se basan en los rayos X que usan técnicas de alta resolución, pantallas de televisión, registros magnéticos digitales e impresores láser que producen imágenes más definidas de órganos y huesos.

En estos estudios también se utilizan medios de contraste los cuales afectan la densidad de un órgano para poder visualizarlo de mejor manera posible, estos medio deben de ser inocuos, inertes y no impedir ninguna función fisiológica. Pueden ser radiolúcidos los cuales permiten la transmisión de los rayos X pero sin ofrecer resistencia o radiopaco los cuales no dejan pasar la transmisión de los rayos X. Algunos estudios utilizan sistemáticamente los medios de contraste.

Cuando se usan estos medios pueden existir reacciones adversas las cuales pueden ir desde náuseas y vómito hasta un colapso cardiovascular, depresión del SNC o muerte si no se atiende.(19)

## **5.2 TOMOGRAFIA COMPUTARIZADA (CT)**

La tomografía computarizada (CT) también es conocida como tomografía axial computarizada (CAT); ésta técnica utiliza los rayos X, pero de alta resolución (un estrecho haz de rayos X) junto con un aparato especial que contiene un sistema detector móvil.

La técnica de CT sirve para examinar esqueleto axial, cerebro, médula espinal, contenido torácico y abdominal.

En las radiografías normales la imagen se proyecta hacia una placa y en la TC una computadora proporciona rápidamente cálculos complejos, determinantes del grado de haces de rayos X absorbidos por los tejidos en su trayectoria. Los valores numéricos calculados obtenidos son entonces convertidos en sombras grises o de color para su observación.<sup>(16)</sup>, por lo que su función más valiosa es que proporciona la forma y características de los tejidos dentro de órganos sólidos.

La radiación por exposición varía dependiendo de la máquina pero su rango oscila dentro de los 1.5-5 rads por lo que se debe evitarse su uso innecesario.<sup>(17,18)</sup>

### 5.3 RIESGOS DE LA RADIACION

Cuando el cuerpo se somete a radiaciones pueden existir algunos riesgos los cuales pueden ser de dos tipos: somáticos y/o genéticos. Un riesgo de tipo genético es cuando por radiación, las células reproductoras (específicamente el DNA dentro de éstas) sufren mutaciones y causar cambios en la descendencia del paciente.

Los riesgos somáticos son los que ocurren en los tejidos corporales diferentes a las células reproductoras.

Los riesgos de la exposición de la radiación no sólo son cuando se recibe una única cantidad grande sino también cuando se manejan cantidades pequeñas pero repetidamente, ya que la radiación es acumulativa; la radiación puede aumentar el riesgo de cáncer después de un periodo latente de muchos años.

Una mujer en el primer trimestre de embarazo está particularmente en riesgo, ya que un embrión o feto expuesto puede nacer con anomalías.<sup>(11)</sup>

Para poder prevenir estos riesgos tanto para el personal médico, técnico como para el paciente se toman varias medidas de seguridad.

#### MEDIDAS DE SEGURIDAD EN GENERAL

- a) Todo el personal de radiología como los pacientes debe de vestir batas y guantes.
- b) El armazón del tubo de rayos X debe revisarse periódicamente para evitar escapes.
- c) Los registros médicos del paciente deben revisarse cuidadosamente para valorar la frecuencia de los exámenes radiológicos de diagnóstico y la dosis recibida en cada estudio.

- d) Los tubos de rayos X deben tener capas adicionales de aluminio que actúan como medios de filtración que reducen la exposición a la radiación sin sacrificar los detalles.
- e) Debe usarse película rápida así como pantallas que refuercen la acción de los rayos X.
- f) Se pueden utilizar conos ajustables o fijos, así como diafragmas para reducir la exposición a su nivel más bajo posible. Estos aditamentos deben restringir la zona irradiada, evitando exposición periférica excesiva.
- g) Deben protegerse las gónadas en todos los pacientes capaces de procrear hijos a menos que el examen sea del abdomen en la zona gonadal. (19)

**5.4 PATOLOGIAS EN LAS CUALES LOS ESTUDIOS CON RAYOS X SON DE UTILIDAD PARA VISUALIZAR EL GRADO DE PARASITACIÓN Y PARA EVALUACION DE ESTA**

PATOLOGIA	PRUEBA	CASOS EN QUE SON DE UTILIDAD Y OBSERVACION
Cromomicosis	Rayos X y tomografía	Sólo en los casos de metástasis y osteólisis, que son sumamente raros
Esporitricosis	Rayos X	Casos pulmonares y osteoarticulares En casos pulmonares se visualizan áreas de condensación o infiltrados de tipo miliar, adenopatías hiliares y en raras ocasiones ensanchamiento mediastinal
Rinosporidiosis	Rayos X	Casos nasales para visualizar el avance del hongo.
Coccidioidomycosis	Rayos X	En casos pulmonares óseos y articulares. En casos pulmonares se observan infiltrados de tipo neumónico, derrame pleural, lesiones similares a las de tuberculosis miliar, llegan a existir fibrosis y cavitaciones
Paracoccidioidomycosis	Rayos X	Casos pulmonares, se observan infiltrados difusos y lesiones nodulares bilaterales, raras veces se ven cavidades.
Histoplasmosis	Rayos X	Casos osteolíticos, pulmonares y meningeos; En casos pulmonares se observan nódulos diseminados a ambos pulmones, adenopatías hiliares, lesiones cavitarias, fibrosis y derrame pleural, en los otros casos se observa el avance del hongo.

PATOLOGIA	PRUEBA	CASOS EN QUE SON DE UTILIDAD Y OBSERVACION
Micetoma	Rayos X	Cualquier parasitación para visualizar el grado de afección ósea
Candidosis	Rayos X	Casos pulmonares, se observan infiltrados en forma de líneas definidas u opacidades en parches similares a las de una bronconeumonía y en casos más graves parece tuberculosis miliar.
Mucormicosis	Rayos X y tomografía	Casos pulmonares y rino-cerebrales Para visualizar la afección ósea. En el caso rino-cerebral se observa el fenómeno de sinusitis (senos paranasales nublados y sin niveles de fluidos), en ocasiones fistulas y lesiones osteolíticas. En el caso pulmonar no existen signos patognomónicos, solo indica neumonia no específica e infiltración, se han reportado masas fúngicas parecidas a las de <i>Aspergillus</i> .
Feohifomicosis	Rayos X y tomografía	Casos con abscesos cerebrales. Se Visualiza el absceso.
Criptococosis	Rayos X y tomografía	Casos pulmonares y meníngeos. En los casos pulmonares se observa infiltración parecida a la tuberculosis, lesiones sólidas que simulan neoplasias o abscesos pulmonares y en proceso crónico moteado miliar difuso.

PATOLOGIA	PRUEBA	CASOS EN QUE SON DE UTILIDAD Y OBSERVACION
Geotricosis	Rayos X y tomografía	Casos bronquiales y pulmonares. En los casos pulmonares se observan zonas densamente infiltradas bien limitadas uni ó-bilaterales y por lo general se encuentran en lóbulos superiores. En el caso bronquial hay un engrosamiento difuso peribronquial con manchas de infiltrado en base pulmonar
Aspergilosis	Rayos X	Casos pulmonares, se observa una imagen de bronconeumonía con infiltrados y múltiples zonas de consolidación que se confunden - con carcinomas pulmonares.
Actinomicosis	Rayos X	Casos abdominales, cervico-faciales y torácico- pulmonar, determinan el ataque óseo, manifiestan las lesiones pulmonares y localizan las masas tumorales en intestino.
Nocardiosis	Rayos X	Casos pulmonares y cerebrales. En los casos pulmonares se observa un infiltrado similar a tuberculosis y se confunde con ésta

## 5.5 ILUSTRACIONES



Tomografía axial computarizada, el lado izquierdo nos muestra el ataque al cerebro y el lado derecho la perforación en el paladar en una mucormicosis



Radiografía de una Aspergilosis pulmonar, la flecha indica la masa fúngica



Radiografía de una Criptococosis pulmonar (4)

TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN

## CONCLUSIONES:

- Se alcanzaron los objetivos propuestos, ya que se logró recopilar la información más actual y útil de las técnicas utilizadas para el diagnóstico de micosis más comunes en nuestro país. El trabajo es de gran utilidad ya sea en el campo profesional como en el desarrollo académico ya que:
- Durante el desarrollo del trabajo se analizaron los fundamentos de las diferentes técnicas de tinción y en base a estos se pueden proponer otras técnicas o sustituirlas.
- También los fundamentos de los medios de cultivo, y gracias a esto también podemos sustituirlos o prepararlos en base a los nutrientes que necesita cada microorganismo.
- En los fundamentos de las pruebas inmunológicas observamos que son de utilidad en caso de micosis sistémicas y que nos pueden dar un valor diagnóstico y también pronóstico.
- Por último también se revisaron los fundamentos de las pruebas radiológicas y que estas solo son de utilidad en micosis sistémicas.

## GLOSARIO

### A

**Absceso:** Colección localizada de pus en una cavidad formada por la desintegración de tejido.

**Absorción:** acción y efecto de absorber, que es el paso de materiales sólidos, líquidos o gaseosos, disueltos en agua hacia dentro o a través de células vivas, por medio de un proceso de ósmosis, los hongos típicamente se nutren por absorción a través de la pared celular y membrana plasmática.

**Abstricción:** Formación de esporos por la separación de porciones sucesivas del esporóforo a través del crecimiento.

**Acidófilo:** Se aplica a los organismos que crecen en sustratos ácidos, también se aplica a los corpúsculos celulares que tienen afinidad por los colorantes ácidos.

**Acrópeto, ta:** Extremo superior de algo, se refiere a lo que se desarrolla desde la base hacia el ápice. En una sucesión de conidios acrópeta el conidio que está en la punta es el más joven.

**Acropleurógeno:** Que sostiene esporos en el ápice y en los lados del micelio.

**Acuminado:** Terminado en punta sin importar su consistencia.

**Acuminado:** Que tiene una protuberancia o elevación en o cerca del centro de una colonia.

**Adenopatía:** Cualquier enfermedad de los ganglios especialmente linfáticos.

**Aereo:** Que crece, se forma o existe en el aire.

**Aeróbico:** Que requiere de la presencia de oxígeno para desarrollarse.

**Agar:** Sustancia mucilaginoso obtenida de varias especies de algas marinas que se emplea con frecuencia como un gel de diversos medios de cultivo para microorganismos.

**Alantoide:** Que tiene forma de salchicha.

**Aleurioconidios:** Espora de reproducción asexual, que se origina por hinchamiento de una célula terminal o lateral en algunos hongos imperfectos.

**Algodonoso:** Con pelos largos, blancos y suaves como el algodón, varios tipos de micelio son de este tipo.

**Ameboide:** Semejante a una ameba y por tanto cambian de forma.

**Amerospora:** Esporo asexual unicelular, es decir no tabicado.

**Anaeróbico:** Que vive o se desarrolla en ausencia de oxígeno.

**Anélido:** Un tipo de célula conidiógena (fiálide anillada) que produce conidios blásticos en sucesión basípeta y a medida que se van desprendiendo los conidios se forma una cicatriz semejante a un anillo o collar en la pared externa de la boca de la fiálide.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Antibiótico:** Sustancia producida de manera artificial o natural (por un organismo) que daña o mata a otro organismo.

**Antropofílico:** En micología médica se refiere a un hongo que preferentemente infecta al hombre.

**Apéndice:** Parte saliente de alguna otra estructura., generalmente accesoria.

**Apical:** Ubicado en la punta de una extremidad puntiaguda, en micología se refiere a la esporulación a partir del extremo de una estructura hifal especializada.

**Arciforme:** Con forma de arco.

**Artrospora:** Espora que resulta de la fragmentación de una hifa, en la terminología moderna estas esporas se denominan conidios holoártricos.

**Asca:** Célula en forma de saco o bolsa que generalmente contiene un número definido de ascosporas que se forman después del cariogamia y la meiosis.

**Ascocarpio:** termino general para un saco micelial dentro del cual se forman los ascos o ascas y las ascosporas.

**Ascomicetes:** Clase taxonómica de hongos que se reproducen por ascosporas.

**Ascosporas:** Espora haploide que crece en el interior del asca como resultado de un proceso de reproducción sexual.

**Aseptada:** Sin tabiques.

**Asexual:** Tipo de reproducción que no implica cariogamia y meiosis, también se denomina multiplicación vegetativa.

**Aterciopelado:** da: aplica a las estructuras cuya superficie está cubierta de pelo tupido, corto, fino ya sea brillante u opaco.

**Auxonograma:** literalmente significa diagrama de crecimiento. Se aplica a los cultivos de microorganismos en los cuales se aplica una cierta cantidad de sustancias conocidas con el objeto de ver su efecto de crecimiento del microorganismo sembrado. Si éste es estimulado en torno a la sustancia añadida el auxonograma es positivo y por el contrario si se inhibe el crecimiento es negativo.

## B

**Basidio:** Célula especializada en forma de "palo de golf" de los basidiomicetes en la cual se originan las basidiosporas exógenas.

**Basidiomicetes:** Clase taxonómica de hongos perfectos que se reproducen por basidiosporas de manera sexual.

**Basidiospora:** Espora sexual característica de los basidiomicetes, producido después de la unión de dos núcleos en el basidio.

**Basípeta:** Se refiere a lo que se desarrolla a partir del ápice dirigiéndose hacia la base, lo que quiere decir que el grado de crecimiento es tanto mayor cuanto más alejado se encuentre de la base.

**Basófilo:** Que tiene preferencia por medios o sustratos básicos, o que los corpúsculos y orgánulos celulares tienen preferencia por los colorantes básicos

**Bipartición:** División en dos partes iguales.

**Blastoconidia:** Esporo producido por un proceso de gemación a lo largo del micelio o por un espora único

**Blastomicetes:** Clase de hongos imperfectos que se reproducen principalmente por gemación.

**Botrioso:** En forma de racimo de uvas, racemoso.

## C

**Capa córnea:** Capa más superficial de la epidermis, de espesor variable, formada por células planas, poligonales, anucleadas, que se remueven constantemente.

**Capitado:** Se refiere a una colonia hemisférica.

**Cápsula:** Cubierta gelatinosa y hialina que rodea la parte externa de la pared celular de ciertas levaduras.

**Cariogamia:** Fusión de dos núcleos para formar el núcleo cigoto, corresponde a la segunda fase de la reproducción sexual.

**Catenulado:** Que forma una cadenita o semeja a ella.

**Célula madre:** Generalmente se aplica a las células de levaduras que por

gemación originan uno o varios brotes que son las células hijas.

**Cenocítico:** Aseptado, talo en el que los núcleos se encuentran incluidos en un citoplasma común, continuo, sin estar separados por tabiques o septos transversales.

**Cigomicetes:** Clase de hongos que se reproducen por medio de esporangiosporas inmóviles u ocasionalmente por conidios, y sexualmente por fusión de gametangios para formar cigosporas.

**Cigospora:** Espora de latencia, contenida en el cigosporangio (tipo de esporangio), que resulta de la fusión de dos gametangios.

**Cerebriforme:** Forma similar a la de un cerebro, con pliegues, dobleces y ondulaciones.

**Clamidocondias:** Espora de origen asexual, recubierta por una pared celular recia y de tipo perdurante, que funciona como espora de resistencia o latencia.

**Clavado:** En forma de palo de golf o clava.

**Cleistotecio:** Cuerpo fructífero, generalmente esférico, delimitado por una pared propia que al madurar se rompe para dejar en libertad ascas.

**Colonia:** Conjunto de individuos de la misma especie. Se refiere al conjunto de hifas o células que en gran número crecen, con manifiesta relación entre sí, a partir de un punto, para formar un talo que presenta una morfología característica de la especie.

**Columela:** Estructura estéril, de soporte, que se localiza en el interior de un esporangio u otra fructificación.

**Conidio, a:** Espora asexual, no móvil, generalmente formada en el ápice o en un lado de una célula esporógena especializada. Nunca se producen dentro de alguna estructura con pared celular rígida o peridio. Los conidios son las esporas asexuales de los deuteromicetes, ascomicetes y basidiomicetes.

**Conidióforo:** Hifa simple o ramificada, que se diferencia morfológica y fisiológicamente de una somática por producir y sustentar conidios.

**Coremio:** Cuerpo con frutos que consiste en un manojito estéril de hifas paralelas y una cabeza terminal de ramas fértiles o que sostienen esporos y cordones enrollados, cada uno compuesto por muchos filamentos, que dan a la colonia el aspecto macroscópico de un cactus.

**Crateriforme:** En forma de vaso más o menos cónico.

**Cuerpo nodular:** Una o más hifas entrelazadas que forman una estructura redonda como un nudo.

**Cuerpos pectinados:** Ramas miceliales vegetativas con proyecciones unilaterales que parecen los dientes de un peine.

**Cuneiforme:** De figura de cuña o parecido a la sección longitudinal de una cuña.

## D

**Deciduo:** Que cae cuando está maduro.

**Dematiáceo:** Oscuro, referido a hongos negros u oscuros.

**Denticulo:** Pequeña proyección parecida a un diente, sobre la que nace una espora.

**Dermatitis:** Inflamación de la piel.

**Dermatofito:** miembro del grupo moniliáceos que se desarrollan sobre la piel, pelo, uñas y otras faneras del hombre y animales superiores. Se clasifican en tres géneros: *Microsporum*, *Trichophyton* y *Epidermophyton*.

**Dermatomicosis:** Estado de la piel, sujetas a la acción de hongos ya sean mohos y/o levaduras.

**Deuteromicetes:** También se les llama Fungi Imperfecti por carecer de reproducción sexual típica.

**Dicarrion:** Que contiene dos núcleos capaces de complementarse genéticamente.

**Dicotómico, ca:** Ramificación en que el punto vegetativo se divide en dos equivalentes, de manera que se forma una horcadura de ramas iguales.

**Dictiospora:** Espora que tiene septos transversales y longitudinales lo que da un aspecto reticulado.

**Didimospora:** espora asexual bicelular.

**Dimórfico:** Se refiere a un hongo que tiene la capacidad de crecer en la forma micelial o en la levadura según las condiciones en las que se encuentre.

**Diseminado:** Dispuesto en áreas diferentes. Se refiere a la diseminación de una infección micótica a dos o más partes del organismo.

## E

**Ectótrix:** Modalidad de invasión por hongos a los pelos, en la que el parásito forma una capa de artrosporas en mosaico por fuera del eje de los pelos.

**Endémico:** Limitado o nativo en una cierta área o región.

**Endoconidios:** Conidio producido en el interior de una célula conidiógena.

**Endógeno:** Cualquier estructura producida o desarrollada en el interior de otra estructura.

**Endótrix:** Modalidad de invasión de los hongos al pelo en la que el parásito forma cadenas paralelas de artrosporas dentro de los ejes de los pelos.

**Equinulado:** tipo de pelo marginal pequeño y débil, que se encuentra en algunos hongos.

**Esclerotio:** Masa compacta de micelio, estadio de reposo de ciertos hongos.

**Escútula:** Lesión como una costra que se ve en el favo.

**Esférula:** Estructura hifal cerrada, de pared gruesa y esférica que encierra endosporos asexuados.

**Especie:** Categoría de clasificación menor que un género o subgénero y por encima de subespecies o variedad, sus miembros poseen ciertas características en común.

**Esporo (a):** Pequeña unidad de propagación, unicelular o pluricelular, sexual, o asexual (conidias) móvil o inmóvil. La morfología y desarrollo de éstas proporcionan los criterios taxonómicos básicos.

**Esporangio:** Estructura de diversas formas, según la especie, que produce esporas de origen asexual (conidios) y endógeno.

**Esporagióforo:** hifa especializada que sostiene uno o varios esporangios.

**Esporangiospora.** Espora producido dentro de un esporangio.

**Esporodoquio:** agregado en forma de almohadilla de conidióforos.

**Estadio perfecto:** Estadio sexual, estadio del ciclo de vida en la cual se forman las esporas después de una fusión nuclear.

**Estado imperfecto:** Estadio asexual, fase del ciclo de vida en el cual no hay reproducción sexual

**Esterigmas:** proyecciones especializadas, cortas o elongadas, a partir de esporóforos en las cuales se desarrollan esporas.

**Estolón:** Hifa vegetativa aérea, no ramificada, que conecta dos grupos o fascículos de rizoides.

**Estriado:** Se aplica a las superficies que presentan surcos o hendiduras.

**Estroma:** Madeja como una almohadilla de células micóticas.

**Eumicota:** División de los hongos verdaderos.

**Exógeno:** Cualquier estructura producida o desarrollada en el exterior de otra estructura.

## F

**Facultativo:** Se aplica a los parásitos que pueden actuar como tales o vivir saprobioicemente.

**Faeohifomicosis:** Un absceso subcutáneo causado por uno de los hongos filamentosos oscuros.

**Falciforme:** En forma mas o menos aplanada y curva como una hoz.

**Fasciculado:** Que se encuentran en forma de haces o manojos.

**Faviforme:** Aspecto cerebriforme o como en panal de abeja.

**Favo:** Tiña de la cabeza contagiosa causada por ciertos dermatofitos (*Trichophyton schoenleinii* y *T. violaceum*).

**Fiálide:** Tipo de célula conidiógena en forma de botella que produce conidios blásticos.

**Fialospora:** Espora de reproducción asexual, formada por abstricción en el ápice de una fiálide.

**Filamento:** Célula larga, cilíndrica y como una cinta.

**Fisión:** División de una célula en dos células por división.

**Fístula:** Úlcera profunda que forma un seno, que comunmente comunica una viscera hueca con la piel o mucosa

**Flocoso:** Flojamente algodonoso o lanoso, o más densamente aglomerado en copos como la franela.

**Fluorescente:** Que presenta fluorescencia, es decir que tiene propiedad de emitir luz en presencia de ciertas radiaciones.

**Fragmentación:** Se dice a la segmentación de un talo en fragmentos, cada uno tiene capacidad de crecer y formar un nuevo individuo.

**Fructificación:** acción y efecto de formar frutos, en sentido metafórico es la formación de aparatos esporíferos o cuerpos fructíferos del hongo. La fructificación es cualquier estructura fúngica que produzca o lleve esporas, ya sean asexuales o sexuales.

**Fumagoide:** En micología tipo de célula redondeada, puede estar aislada o en grupos con pared gruesa pigmentadas de color gris o moreno obscuro.

**Fungicida:** Cualquier sustancia capaz de destruir hongos.

**Fúngico:** propio de los hongos o relativo a ellos.

**Fungistático:** Sustancia que detiene el crecimiento de los hongos.

**Fungoide:** Que parece un hongo por su textura y morfología.

**Fusiforme:** Como un huso, agusado en los extremos.

## G

**Gameta:** Célula sexual o núcleo sexual, que se fusiona con otra complementaria.

**Gametangio:** Órgano sexual que contiene gametas ya sean células o núcleos.

**Gelatinoso:** De consistencia blanda y putrescible, glutinosa.

**Gema o yema:** Brote que se produce por gemación como en las levaduras. Se forman como las clamidoconidias en otros hongos.

**Gemación:** Tipo de multiplicación celular asexual, caracterizado por la formación de pequeñas protuberancias superficiales o evaginaciones en las células genitivas.

**Género:** División de una familia que contiene especies relacionadas.

**Geniculado:** Se aplica metafóricamente a la parte de una hifa o de un conidióforo que forma codos debido a los cambios de dirección por el crecimiento simpodial del mismo.

**Geofílico:** En micología médica se refiere a un hongo que naturalmente habita en el suelo.

**Glabra:** Desprovisto de pelo o vello.

**Glómérulo:** Masa densa formada por un conjunto de células o esporas aglomeradas.

**Gomatoso:** De la naturaleza de un tumor gomoso blando.

**Granuloma:** Nódulo redondeado que se forma en el espesor de los tejidos durante el curso de algunos procesos inflamatorios subagudos o crónicos. Histiológicamente está formado por la proliferación del tejido conjuntivo, en el cual está contenido y por el que se distribuye una rica red vascular y están presentes numerosos elementos celulares, generalmente pertenecientes al sistema reticuloendotelial.

## H

**Hábitat:** El lugar natural donde crece un organismo.

**Hialino:** Incoloro, transparente.

**Hifa:** Filamento tubular que representa la unidad estructural que representa la unidad estructural de la mayoría de los hongos.

**Hifomicetes:** Clase de hongos imperfectos que no presentan ningún tipo de espora de origen sexual. Producen sus esporas asexuales o conidios en conidióforos que no están contenidos en un cuerpo fructífero.

**Higroscópico:** Que absorbe agua fácilmente del medio ambiente por lo que se vuelve suave y expandible.

**Himenio:** Capa o estrato de conformación sumamente diversa, pero siempre constituida por hifas especializadas para la producción de esporas.

**Hiperplasia:** Incremento de la multiplicación celular.

**Hipertrofia:** Crecimiento del tamaño de las células más de lo normal.

**Heterotrófico:** Que usa compuestos orgánicos como fuentes de energía.

**Hospedero:** Cualquier planta o animal donde vive un parásito.

## I

**Imbricado:** Sobrepuesto, como las escamas de los peces que se imbrican una tras otra.

**Incrustado:** Endurecido por interposición de materias minerales entre las partículas orgánicas.

**Infiltrado:** Invasión de líquidos, polvo o sustancias extrañas en general y a veces también de elementos de la sangre, en el interior de tejido, a nivel de los espacios intercelulares o en el interior de la misma célula.

**Intercalar:** Que está interpuesto entre el ápice y la base. Se refiere a estructuras resistentes o reproductoras, como clamidoconidias, esporangios, etc., cuando confinan por ambos extremos con células vegetativas.

**Internódulos:** Aquellas áreas en el estolón entre los puntos donde hay rizoides subtendidos.

**Intertriginoso:** Afectado con o d la naturaleza de intertrigo, dermatitis que ocurre entre dos pliegues de la piel.

## L

**Lámpara de Wood:** Aparato que produce rayos ultravioletas filtrados.

**Lanoso:** Se refiere a la colonia que son semejantes a las hebras de lana.

**Levadura:** Fermento, organismo capaz de realizar la fermentación.

**Levaduriforme:** Se dice del hongo filamentosos que tiene la apariencia de levadura, tanto en los caracteres macroscópicos como crecimiento colonial como en los microscópicos referentes a la multiplicación por gemación de sus células somáticas.

**Lobado:** Dividido en gajos o en lobos, es decir, en porciones no muy profundas o más o menos redondeadas tanto si se trata de órganos laminares como de más voluminosos. Cuando los lobos son más pequeños se dice lobulado.

**Lobulado:** Ver lobado.

**Lumen:** Espacio libre comprendido entre las membranas y paredes celulares de una célula o una hifa.

**Lunular:** En forma de media luna o de creciente lunar, como algunos macroconidios.

## M

**Macroconidio:** Conidio o espora de reproducción asexual que se distingue por su gran tamaño y su pluricelularidad.

**Madre:** En micología y en general en botánica se emplea a menudo con el

significado de causa, raíz u origen de donde proviene una cosa.

**Meiosis:** Serie de dos divisiones nucleares que pueden ser consecutivas o no, pero siempre sucesivas, en la que el número de cromosomas se divide a la mitad, corresponde a la última fase de la reproducción sexual, despues de la plasmogamia y de la cariogamia.

**Métulas:** Ramas secundarias de conidióforos de *Penicillium* que sostiene a las fiálides.

**Micelio:** Madejas de hifas entrelazadas y ramificadas.

**Micetismo:** Intoxicación provocada por la ingestión de ciertos hongos.

**Micetoma:** Literalmente significa tumor fúngico o tumor de hongos y corresponde a un tipo de lesiones ocasionadas por Actinomicetes o por mohos en los tejidos subcutáneos del hombre y los animales superiores.

**Micobacteriosis:** Infección causada por microorganismos del género *Micobacterium* o por el parasitismo concomitante, aunque no necesariamente simbiótico, de bacterias y hongos.

**Micobiota:** Vida fúngica, conjunto de hongos indígenas de un lugar o hábitat.

**Micología:** Ciencia que trata del estudio de los hongos.

**Micorriza:** Órgano compuesto por la asociación simbiótica de las hifas de algunos hongos y las raíces de plantas vasculares.

**Micosis:** Amplia gama de infecciones, del hombre y de los animales superiores, ocasionadas por diversas especies de hongos, basándose en el grado de profundidad anatómica de las micosis, éstas se clasifican en: superficiales, cutáneas, subcutáneas y sistémicas.

**Micostático:** Compuesto que detiene o inhibe el crecimiento de los hongos.

**Micótico:** Perteneciente o relativo a la micosis; causado por hongos.

**Micotoxicosis:** Intoxicación provocada por la ingestión de alimentos contaminados por las toxinas producidas por diversas especies de mohos.

**Microconidio:** Se refiere a un conidio pequeño, generalmente unicelular.

**Moho:** Se dice de cualquier micromicete principalmente de los mucoráceos y de los moniliáceos.

**Mucilaginoso:** Pegagoso, viscoso o mucoso cuando está húmedo, debido a su composición química (ácido místico, pentosas y hexosas).

**Muriforme:** término aplicado a conidias multicelulares divididas por tabiques verticales y horizontales.

**N**

**Necrosis:** Detención de los procesos vitales en un tejido orgánico o en una parte entera del organismo.

**Nigricante:** Que se pone o se vuelve negro como algunos esporangios maduros.

**Nítido:** Liso, claro u oscuro pero brillante o satinado.

**Nodal:** término comúnmente usado para indicar la derivación de esporangióforos adyacentes a los rizoides en especies de *Rhizopus*.

## O

**Oblongo:** Literalmente muy largo, más largo que ancho, alargado, con los lados casi paralelos y los extremos más o menos aplanados.

**Onicomiosis:** Infección micótica de las uñas producida por uno o varios tipos de hongos.

**Oniquia:** Ulceración de la matriz de una uña.

**Oospora:** Espora sexual producida por fusión de dos gametangios diferentes.

**Otomiosis:** Enfermedad del oído externo causada por diversos hongos.

**Osmofílico:** Se aplica a los hongos que pueden vivir en sustratos con elevada presión osmótica.

**Ósmosis:** Fenómeno concerniente a la difusión que ocurre a través de una membrana semipermeable que separa dos soluciones con diferente concentración de soluto, la ósmosis tiende a igualar las concentraciones de ambos lados de la membrana.

**Ovado:** Se dice de los órganos u estructuras laminares de figura de huevo, colocado de tal manera que su parte más ancha corresponde a la

inferior de la estructura de que se trata. Si en lugar de laminar es un cuerpo macizo, es mejor emplear ovoide.

**Ovoide:** Ver ovado.

## P

**Paranoquia:** Inflamación o ulceración del tejido alrededor de la uña.

**Parasitismo:** Relación biológica entre dos poblaciones u organismos en la cual uno de ellos resulta perjudicado por la acción de otro.

**Parásito:** Organismo generalmente heterótrofo que se nutre a expensas de organismos vivos, tanto como plantas como animales, a los que frecuentemente invade y ocasiona alguna enfermedad, en este último caso se le denomina parásito patógeno.

**Patógeno:** Organismo capaz de causar enfermedad, no necesariamente como parásito.

**Pedicelo:** Pequeño tallo o sustentáculo de esporas, esporangios, cistitis, ascas, etc.

**Pelculado:** En forma de película o costra, como la capa himenal de algunos basidiomicetes.

**Penicilado:** De forma de pincel.

**Penicilio:** Esporóforo asexual en forma de pincel característico del género *Penicillium* y de otros géneros de Moniliales relacionados; constituido de un conidióforo o pedicelo que soporta un racimo de células conidiógenas (fiálides).

**Peritecio:** Cuerpo fructífero (ascocarpo) que puede confundirse con un cleistotecio pero a diferencia de éste es más alargado, (en forma de botella) y las ascas constituyen un himenio.

**Picnidio:** Cuerpo fructífero asexual, de forma esférica o de botella, hueco, forrado internamente con conidióforos.

**Piloso:** Cubierto de filamentos largos y suaves, semejantes a pelos.

**Piriforme:** De forma parecida a la de una pera.

**Plasmogamia:** Primera fase de la reproducción sexual en la que se fusionan dos protoplastos y se yuxtaponen los núcleos formando un dicarion; esta fase antecede al cariogamia y a la meiosis.

**Pleomorfismo:** Cambio degenerativo en un hongo que convierte a la colonia en una totalmente estéril. Las esporas características y diagnósticas se pierden y no pueden recuperarse, habitualmente el pleomorfismo es irreversible.

**Pleurógeno:** Que nace en los lados de un conidióforo o hifa.

**Poros:** Pequeña abertura en la pared celular de una espora por donde germina ésta.

**Proliferación:** Acción y efecto de proliferar, desarrollo sucesivo de partes nuevas.

**Pulvonado:** Se refiere a una colonia evidentemente convexa.

## Q

**Queratolítico:** En micología se refiere a un hongo que tiene la capacidad de descomponer la queratina y de asimilarla para crecer.

**Querion:** Enfermedad pustular del cuero cabelludo.

## R

**Radiado,da:** Que se expande o que se dispone en derredor de un centro común.

**Raqueteado:** Con apariencia de raqueta o con segmentos de tal forma.

**Receptáculo:** Estructura que porta uno o más órganos reproductores.

**Reticulado:** En forma de retículo; con venas, líneas o bordes que se entrecruzan formando una red.

**Rizoide:** Fascículo de hifas ramificadas, superficialmente parecidas a las raíces de las plantas.

**Rugoso:** Arrugado o plegado.

## S

**Sacaromicetes:** Nombre designado a las levaduras que son capaces de fermentar azúcares.

**Sarciniforme:** En forma de racimo.

**Septado:** Con septos o particiones.

**Septo:** Pared transversal en una célula o en una hifa. Se forman por el

**crecimiento centripeto** de la pared celular.

**Sésil:** Adherido directamente por la base, sin un pedículo.

**Seudohifa:** Hifa no verdadera, habitualmente se refiere a blastoconidias elongadas formadas por levaduras con brotes.

**Seudomicelio:** Grupos catenulados laxamente unidos de células formadas por gemación apical que, cuando son elongadas, parecen hifas miceliales.

**Sexual:** Tipo de reproducción que involucra la plasmogamia, cariogamia y la meiosis.

**Simbiosis:** Organismos diferentes que viven juntos con beneficio mutuo.

**Simple:** No ramificado.

**Simpodial:** Tipo de ramificación en el que un eje semeja un tallo simple, pero esta formado de las bases de varios ejes originados sucesivamente como ramas una de la otra, tomando una forma de zig-zag.

**Sinemata:** Racimo bien cementado de conidióforos elongados.

**Soma:** Cuerpo de un organismo, que se distingue de sus órganos reproductivos, además de su morfología, por su fisiología pues lleva acabo funciones de asimilación y crecimiento.

**Subcutáneo:** Situado o que ocurre por debajo de la piel.

**Suspensor:** Rama hifal especial en la que se sostiene el cigosporangio en los Zygomycetes.

## T

**Tabicado:** dividido por paredes transversales.

**Tálico:** Se refiere a uno de los dos modos principales de desarrollo conidial en los hongos imperfectos.

**Talo:** Cuerpo vegetativo o soma de un hongo.

**Talospora:** Espora producida directamente por el talo o micelio, ya sea de manera intercalar o terminalmente, a partir de una célula preexistente, como las artrosporas y clamidosporas.

**Teleomorfo:** Estado sexual o perfecto de un hongo.

**Terminal:** Ubicación de un espora en la punta de un segmento hifal.

**Textura:** Se dice del tipo de tejido de hifas. Sirve como bases taxonómicas.

**Tiña:** Término usado para designar diversos tipos de infecciones micóticas superficiales.

**Trombosis:** Coagulación intravascular de la sangre por la formación de un trombo (formación sólida derivada de la sangre).

**Truncado:** Se aplica a las estructuras que rematan en un borde o plano transversal como si se hubieran cortado.

**Tuberculado:** Cubierto con excrescencias como protuberancias.

**Tubo germinal:** Hifa corta que surge del poro o hendidura de una espora

durante la germinación y que al continuar su desarrollo en condiciones óptimas forma una hifa de mayor tamaño, incluso un micelio.

**Túbulo:** Se dice del cuello o rostro de muchos peritecios, así como de cualquier estructura cilíndrica, hueca y pequeña.

## U

**Umbilicado:** Que tiene un centro deprimido.

**Unicelular:** De una sola célula.

**Uniseriada:** Dispuesto en una serie, como la cabeza conidial de algunas especies de *Aspergillus*.

## V

**Vegetativo:** Que vegeta o es capaz de vegetar, es decir, que realiza varias funciones vitales, pero no las reproductivas sexuales.

**Velloso:** Se dice de las estructuras que tienen vello o pelo, no siendo éste demasiado fino, ni muy corto y tupido o ásperos y rígidos.

**Vesícula:** Recipiente o bolsa en forma de vejiga o ampolla.

**Verrugoso:** Cubierto con proyecciones como verrugas.

**Versicolor:** Que tiene varios colores.

**Vesícula:** Ampolla o estructura como una vejiga.

**Virulencia:** Grado de patogenicidad.

## Z

**Zimograma:** Literalmente significa diagrama de enzimas y su actividad. Es un método de laboratorio para diferenciar a las diferentes especies de un género en base a la fermentación de algunos sustratos, si el zimograma es positivo existe fermentación (el organismo contiene la enzima) si es negativo no hay fermentación.

**Zimología:** Ciencia que trata del estudio de las levaduras.

**Zimosis:** Fermentación.

**Zoofílico:** Término aplicado a hongos que infectan a animales.

**Zygospora (cigospora):** Espora sexual de pared gruesa producida por fusión de dos gametangios similares, hallado en los Zygomycetes. (12,13)

## BIBLIOGRAFIA:

- 1.- Koneman E., Roberts G., 1996, "Micología Práctica de Laboratorio", 3ª edición, Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina, pp: 39-45, 82-89, 201-217.
- 2.- Bernard J., 1998, "Diagnóstico y tratamiento clínico por el laboratorio", 9ª edición, Ed. MASSON, España, pp: 873-903, 1129-1192.
- 3.- Jawetz E., Melnick J, Adelberg E., 1992, "Microbiología Médica" 14ª edición, Ed. El Manual moderno, S.A. de C.V., México D.F., pp: 111-118, 128-130.
- 4.- Bonifaz A, "Micología médica básica" 1ª edición 1998, Ed. MENDEZ EDITORES, México D.F., pp: 31-410, 443-450.
- 5.- Myrvik Q, Weiser R, 1991, "Bacteriología y Micología Médicas", 2ª edición, Ed. Interamericana Mc Graw-Hill, México D.F., pp: 607-609.
- 6.- Arenas R., 1993, "Micología Médica", Ed. Interamericana Mc Graw-Hill, México D.F., pp: 43-54, 198, 345-357.
- 7.- Segretain D, 1966, "Diagnóstico de laboratorio en micología médica", 1ª Edición, México, pp: 98-110.
- 8.- Zapater R, 1965, "Atlas de diagnóstico micológico", 2ª edición, Ed. El Ateneo, Argentina, pp: 28-37, 239-246, 138, 140, 150, 153, 209.
- 9.- Beneke S, "Medical Mycology Manual" 3ª Edición, Ed, Burgess Publishing Company, Estados Unidos de America, pp: 49-51.
- 10.- Conant, 1954, "Manual of Clinical Micology", 2ª edición, Ed. WB Saunders Company, Estados Unidos de America, pp: 413- 431.
- 11.- Anthony N., 1980, "Tratado de dermatología" 2ª edición, Ed. Salvat, Barcelona España, pp: 87-89, 349-350.
- 12.- Joklik W; et al, 1995, "Zinsser Microbiología", 20ª edición, Ed. Médica panamericana, pp: 220-228, 240-245, 247-248.
- 13.- Pelczar M, et al, 1991, "Microbiología", 2ª Edición, Ed. Mc Graw-Hill, pp: 58-61.
- 14.- Koneman E, 1994, "Diagnóstico microbiológico", Ed. Médica panamericana, Buenos Aires Argentina, pp: 124-134.
- 15.- Bailey S, 1991, "Diagnóstico Microbiológico", 7ª edición, Ed. Médica panamericana, San José de Buenos aires, Argentina, pp: 113, 793.

- 16.- William J, et al, 1983, "Hematología", 2ª edición, Ed. Salvat, Tomo II, Barcelona España, pp:
- 17.- Krupp M, et al, 1986, "Manual de diagnóstico Clínico y de Laboratorio" 8ª edición, Ed. El manual moderno, pp:37-40, 105-107, 307-316.
- 18.- Thomas D, Madigan M, 1991, "Microbiología", 6ª edición, Ed. Prentice Hall Hispanoamericana S.A., México D.F., pp: 478-486.
- 19.- Fischbach F, 1989, "Manual de pruebas diagnósticas", 3ª edición. Ed. Interamericana Mc Graw-Hill, pp: 589-651
- 20.- Merck, "Culture Media Handbook", 1987, (Catálogo) pp: 59, 63, 71,135,136,141,178.
- 21.- "Enciclopedia de tecnología química", Ed. Unión tipográfica editorial hispanoamericana, México D.F. 1966, Tomo I, pag. 972, Tomo II pp: 343, 459.
- 22.- Lehninger A, 1994, "Bioquímica", 2ª edición, Ed. OMEGA, Barcelona España, pp: 958-959.
- 23.- BBL, Division of BioQuest, 1969, "BBL Manual of Products and Laboratory Procedures", 5<sup>th</sup> Edition, U.S.A., pp:93, 162.
- 24.- Ulloa M., 1991, "Diccionario ilustrado de micología", Ed. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., pp19-273.
- 25.- Encyclopaedia Britannica, 1982, "Hombre, Medicina y Salud" Enciclopedia Médica, Ed. SARPE, Madrid España, pp: Tomo I (243), Tomo II (438, 542), Tomo III (1122).