

# Guía Teórica-Práctica : MICOLOGÍA

Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia-UNSL



MATERIAL DIDÁCTICO  
PARA ESTUDIANTES  
2024

# SERIE DIDÁCTICA: MATERIAL DIDÁCTICO PARA ESTUDIANTES

Guía Teórico-Práctica:

## **MICOLOGÍA**

Licenciatura en Bioquímica

Autores

Esp. Luis Ernesto GONZÁLEZ CRISTÓFANO

Dra. Alicia Viviana LAPIERRE

Bqca. Verónica Ester AMPUERO

Mg. Ricardo Ariel FLORIDIA

Esp. Roberto Alejandro LOPRESTI

Esp. Germán Darío RONCHI

Lic. Rocío Ayelem CONFORTI



FACULTAD DE QUÍMICA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN LUIS

2024

## RESPONSABLES DE LA PUBLICACIÓN

Decano

*Dra. Sebastián ANDUJAR*

*Secretaria Académica*

*Dra. Mónica OLIVELLA*

*Comisión de la Serie Didáctica:  
Material Didáctico para Estudiantes*

Coordinadora

*Dra. Yamina DÁVILA*

Integrantes

Departamento de Biología

Mg. Karina Ethel MARCHEVSKY

Dra. María Beatriz NÚÑEZ

Departamento de Bioquímica

*Dra. Verónica FILIPPA*

*Dra. Ethelina CARNELUTTI*

Departamento de Farmacia

*Dra. Cecilia PERALTA*

*Dra. Ana VICARIO*

Departamento de Química

*Dr. José A. BOMBASARO*

*Dra. Cinthya A. MAGALLANES NOGUERA*

Edición

*Secretaría de Investigación, Vinculación y Extensión*

## SUMARIO

La publicación periódica Serie Didáctica ha sido creada en el ámbito de la Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de San Luis (Ordenanza N° 008/07-CD) con el fin de proporcionar material de estudio a los estudiantes de las Carreras de grado impartidas en la Facultad.

Actualmente, la SERIE DIDÁCTICA: MATERIAL DIDÁCTICO PARA ESTUDIANTES (Resolución N°269/16) ofrece guías de Trabajos Prácticos de Laboratorio y de campo, guías de resolución de problemas, material teórico, propuestas de estudio dirigidos y comprensión de textos, entre otros materiales, elaborados por el cuerpo docente de las diferentes Áreas de Integración Curricular de la Facultad. Estas producciones didácticas significan un aporte para cubrir necesidades académicas acordes al enfoque de cada asignatura o que no se encuentran habitualmente en bibliografía específica. Las mismas están disponibles en la página de la UNSL (<http://www.fqbf.unsl.edu.ar/mde.html>) lo que facilita la accesibilidad por parte de los estudiantes, docentes y comunidad educativa en general, garantizando la calidad de la visualización y la amplia difusión del material publicado en este sitio. De igual modo, la Serie Didáctica realiza una extensión invitando a docentes y alumnos de diferentes niveles educativos a participar, crear, producir y utilizar este espacio fomentando así el vínculo entre esta Institución y la comunidad.

En nuestra opinión, es de vital importancia producir y compartir el conocimiento con los estudiantes y la sociedad. De este modo, se tiende a facilitar los procesos de enseñanza y de aprendizaje y la transmisión de una idea directriz de conducta humana y científica, fortaleciendo los vínculos entre docentes-alumnos-conocimientos y sociedad.

Dado que la presente SERIE DIDÁCTICA resulta de la participación de numerosos actores, ante los posibles errores humanos y cambios en la ciencia, ni los editores ni cualquier otra persona que haya participado en la preparación del material didáctico garantizan íntegramente que la información sea precisa o completa.

## PRESENTACIÓN DEL CURSO

La presente Guía Teórico-Práctica está dirigida a estudiantes del curso **Micología** de la carrera Licenciatura en Bioquímica de la Universidad Nacional de San Luis, asignatura obligatoria incluida en el ciclo de formación profesional según el Plan de Estudios Ord. CD 11/10. El crédito horario total es de 60 horas cuatrimestrales, una clase teórica de 2 hs y un Trabajo Práctico de Laboratorio y/o Aula de 2 hs por semana.

El propósito fundamental de esta Guía es colaborar al entendimiento del comportamiento de los hongos en su relación con el ser humano. Para lograr este objetivo, se abordarán temas de Micología básica que incluyen: características morfológicas y fisiológicas de los hongos y su clasificación taxonómica, así como el conocimiento de las bases biológicas de la interacción hospedero-parásito, constituyendo la base para entender las diferentes dolencias causadas por estos agentes, su diagnóstico etiológico, las medidas preventivas y su tratamiento.

Las enfermedades producidas por hongos son un problema de todas las sociedades y ocupan un lugar preponderante en la atención de la salud. Son causas de procesos debilitantes, agudos, crónicos y, en ocasiones, mortales, por lo que son de importancia médica, social y económica.

Se capacitará sobre las micosis más comunes producidas en el ser humano y fundamentalmente podrán ser capaces de seguir un protocolo de diagnóstico diferencial de las micosis tratadas en el curso.

Se incluyen contenidos teóricos mínimos necesarios para poder realizar los Trabajos Prácticos y no pretende reemplazar la bibliografía enunciada en el Programa de la asignatura, aconsejando la concurrencia a clases de consulta que se ponen a su disposición y que darán una mejor perspectiva a los temas.

En la asignatura se trata de enriquecer su formación, haciéndolos no solo efectores de técnicas, sino profesionales formados y preparados para ser parte del equipo de salud, dándoles las herramientas que los distinguen como importantes referentes. Asimismo, debe considerarse que debe mantenerse actualizado debido a los constantes cambios que se dan en este campo del conocimiento.

La actual edición de esta Guía presenta una organización temática, en la que se incluyen los Trabajos Prácticos para que se familiaricen con las técnicas más utilizadas por el laboratorio en el diagnóstico de estas patologías, completado con un Trabajo Práctico de Aula referido a la resolución de casos clínicos. Se incluyen referencias bibliográficas de libros, revistas e Internet que contienen información de Micología Médica actualizada.

**Requisitos para cursar:** Deberá tener aprobadas las asignaturas que estipula el plan de estudios, siendo actualmente: Histología, Microbiología General y Química Biológica.

El equipo docente que trabajó en la elaboración de la presente Guía Teórico-Práctica está constituido por:

- Profesor Responsable: **Esp. LUIS ERNESTO GONZÁLEZ CRISTÓFANO**
- Profesora Co-Responsable: **Dra. ALICIA VIVIANA LAPIERRE**
- Jefa de Trabajos Prácticos: **Bqca. VERÓNICA ESTER AMPUERO**
- Jefe de Trabajos Prácticos: **Mg. RICARDO ARIEL FLORIDIA**
- Jefe de Trabajos Prácticos: **Esp. ROBERTO ALEJANDRO LOPRESTI**
- Jefe de Trabajos Prácticos: **Esp. GERMÁN DARÍO RONCHI**
- Auxiliar de Primera: **Lic. ROCÍO AYELEM CONFORTI**

## PLAN DE TRABAJOS PRÁCTICOS

- **Trabajo Práctico N° 1**

**Toma de muestras. Procesamiento de muestras micológicas**

Dinámica del trabajo de laboratorio. Preparación del paciente. Anamnesis. Toma de muestras. Procesamiento de los materiales clínicos. Pasos del análisis micológico. Normas de bioseguridad.

- **Trabajo Práctico N° 2**

**Preparación de materiales, medios de cultivo, soluciones y colorantes utilizados en Micología**

Preparación de los principales medios de cultivo, soluciones y colorantes de uso frecuente en la práctica micológica. Esterilización del material preparado para su posterior utilización.

- **Trabajo Práctico N° 3**

**Técnicas de siembra y aislamiento**

Técnicas de siembra y aislamiento. Microcultivos. Método de las diluciones para recuento de colonias. Siembra de colonia gigante. Siembra espontánea. Técnicas para el procesamiento de muestras clínicas.

- **Trabajo Práctico N° 4**

**Técnicas de observación**

Técnicas de Observación. Montaje con KOH y otros aclarantes. Preparados con tinta china. Identificación preliminar de hongos. Descripción de formas estructurales. Hifas vegetativas. Formas de esporulación.

- **Trabajo Práctico N° 5**

**Micosis superficiales**

Identificación macro y microscópica de los distintos géneros de importancia clínica.

- **Trabajo Práctico N° 6**

**Identificación de levaduras de interés médico**

Identificación de Levaduras de interés médico. Marcha para la identificación de levaduras.

- **Trabajo Práctico N° 7**

**Aspergilosis**

Diferenciación de las distintas secciones causantes de esta micosis.

- **Trabajo Práctico N° 8**

**Técnicas moleculares utilizadas en el diagnóstico micológico**

Análisis de diversas técnicas moleculares que pueden ser utilizadas para la identificación de hongos. Aplicación en la clínica. Trabajo práctico de Aula.

- **Trabajo Práctico N° 9**

**Resolución de casos clínicos**

Resolución de problemas clínicos reales y adaptados. Trabajo práctico de Aula.

- **Trabajo Práctico N° 10**

**Consulta obligatoria previa al Trabajo Práctico Integral**

Revisión de lo observado en los Trabajos Prácticos precedentes.

- **Trabajo Práctico N° 11**

**Trabajo Práctico Integral**

Identificación microscópica y macroscópica de hongos estudiados en muestras clínicas y cultivos.

## ÍNDICE

<b>PRESENTACIÓN DEL CURSO.....</b>	<b>I</b>
<b>INSTRUCTIVO SOBRE HÁBITOS PERSONALES Y PRÁCTICAS OPERATIVAS SEGURAS EN EL LABORATORIO</b>	
Normas de conducta en el laboratorio.....	VI
Normas de procedimiento generales en el laboratorio.....	VII
Normas para el manejo de residuos en el laboratorio.....	VII
<b>TRABAJO PRÁCTICO N° 1. TOMA DE MUESTRAS. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS MICOLÓGICAS</b>	
Objetivos.....	1
Introducción Teórica.....	1
Actividades a desarrollar.....	6
Bibliografía.....	6
<b>TRABAJO PRÁCTICO N° 2. PREPARACIÓN DE MATERIALES, MEDIOS DE CULTIVO, SOLUCIONES Y COLORANTES UTILIZADOS EN MICOLOGÍA</b>	
Objetivos.....	8
Introducción Teórica.....	8
Actividades a desarrollar.....	13
Bibliografía.....	13
<b>TRABAJO PRÁCTICO N° 3. TÉCNICAS DE SIEMBRA Y AISLAMIENTO</b>	
Objetivos.....	15
Introducción Teórica.....	15
Actividades a desarrollar.....	20
Bibliografía.....	21
<b>TRABAJO PRÁCTICO N° 4. TÉCNICAS DE OBSERVACIÓN</b>	
Objetivos.....	22
Introducción Teórica.....	22
Actividades a desarrollar.....	32
Bibliografía.....	32
Año 2024	IV

### **TRABAJO PRÁCTICO N° 5. MICOSIS SUPERFICIALES**

Objetivos.....	33
Introducción Teórica.....	33
Actividades a desarrollar.....	42
Bibliografía.....	42

### **TRABAJO PRÁCTICO N° 6. IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS DE INTERÉS MÉDICO**

Objetivos.....	43
Introducción Teórica.....	43
Actividades a desarrollar.....	52
Bibliografía.....	52

### **TRABAJO PRÁCTICO N° 7. ASPERGILOSIS**

Objetivos.....	54
Introducción Teórica.....	54
Actividades a desarrollar.....	63
Bibliografía.....	64

### **TRABAJO PRÁCTICO N° 8. TÉCNICAS MOLECULARES UTILIZADAS EN EL DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO**

Objetivos.....	65
Introducción Teórica.....	65
Actividades a desarrollar.....	77
Bibliografía.....	77

### **TRABAJO PRÁCTICO N° 9. RESOLUCIÓN DE CASOS CLÍNICOS**

Objetivos.....	79
Actividades a desarrollar: Casos clínicos.....	79-92
Bibliografía.....	93

### **TRABAJO PRÁCTICO N° 10. CONSULTA OBLIGATORIA PREVIA AL TRABAJO PRÁCTICO INTEGRAL**

Objetivos.....	94
Actividades a desarrollar.....	94

### **TRABAJO PRÁCTICO N° 11. TRABAJO PRÁCTICO INTEGRAL**

Objetivos.....	95
Actividades a desarrollar.....	95
Bibliografía.....	95

## **Instructivo Sobre Hábitos Personales y Prácticas Operativas Seguras en el Laboratorio**

Los laboratorios son ámbitos de trabajo con riesgo potencial para las personas, por ello, se requiere especialmente una actitud seria y responsable, y una adecuada preparación previa al momento de ingreso.

Con el objetivo de cuidar la seguridad personal, las instalaciones, equipos y permitir el mayor aprovechamiento de las prácticas de laboratorio, se indican a continuación una serie de acciones.

### **A. Normas de Conducta en el Laboratorio**

1. En todos los casos, deben demostrar sus conocimientos de las actividades a realizar, de la teoría que las sustenta y de los riesgos y medidas de seguridad, tanto previo a la práctica de laboratorio como durante el transcurso de toda la realización de la práctica experimental.
2. No está permitido a los/las estudiantes trabajar fuera de las horas normales previstas.
3. Se recomienda trabajar con orden y método, manteniendo las mesadas libres de elementos innecesarios. Los artículos personales deben dejarse en otro lugar habilitado a tal fin.
4. No está permitido ingresar ni consumir alimentos ni bebidas en el laboratorio.
5. No está permitido fumar en todo el ámbito del laboratorio.
6. Usar el cabello recogido durante las actividades prácticas.
7. No se deben pipetear ni probar sustancias con la boca; para tal fin se debe usar propipetas.
8. No se deben oler las placas con cultivos.
9. Es obligatorio el uso de guardapolvo en el laboratorio y guantes de látex.
10. No está permitido descartar ningún tipo de sustancia líquida o sólida sin consultar previamente a quien esté a cargo del Trabajo Práctico.
11. Ante un accidente, lastimadura, quemadura, rotura de material, etc. avisar inmediatamente al docente a cargo (no ocultar) y no tomar ninguna acción sin consultar. Se sancionará el ocultamiento del hecho.
12. En caso de emergencia, en primer lugar, guardar la calma y luego atender en todo momento las instrucciones de quien esté a cargo del Trabajo Práctico, quien indicará cómo proceder.
13. Lavarse las manos después de finalizar el Trabajo Práctico y luego de toda operación en donde haya habido posible contacto con material irritante, cáustico, tóxico o patógeno.
14. Conectar equipos a la red eléctrica con previa autorización.
15. Al finalizar el Trabajo Práctico, dejar todo el material ordenado, mesadas limpias, mecheros cerrados, microscopios apagados, limpios y cubiertos.

16. Esperar el consentimiento del encargado del Trabajo Práctico para retirarse del laboratorio.

17. Las puertas y ventanas deben permanecer cerradas a fin de evitar corrientes de aire cuando se realicen cultivos.

### **B. Normas de Procedimiento Generales en el Laboratorio**

1. Al usar material de vidrio, comprobar su perfecto estado (no usar material sucio, con roturas o rajaduras).

2. Cuando se calienta un material de vidrio (por ej. al preparar medios o esterilizar), diferenciarlo perfectamente del material frío, dado que presentan ambos el mismo aspecto.

3. Se deben seguir las normas de calentamiento cuando se utiliza fuego directo en tubos de ensayo, vasos, etc., para evitar proyecciones sobre uno mismo u otra persona. De esta forma, se evitan posibles accidentes y quemaduras.

4. Los productos inflamables (alcohol, éter) no deben estar cerca de fuentes de calor. Si se necesita calentar recipientes con estos productos, se hará a baño maría.

5. Si se trabaja con sustancias que emiten vapores tóxicos, se debe trabajar bajo campana de extracción o, en su defecto, en lugares con buena ventilación.

6. Comprobar cuidadosamente los rótulos de los envases antes de utilizarlos; de la misma manera, contribuir al mantenimiento de las etiquetas en buen estado.

7. No volver al frasco de origen los sobrantes de los reactivos utilizados, a menos que sea justificado por el/la Responsable del laboratorio.

8. No dejar envases abiertos.

### **C. Normas para el Manejo de Residuos en el Laboratorio**

1. Pueden desecharse por la cañería los residuos *hidrosolubles*, dejando correr el agua en volumen muy superior al desechado. No arrojar productos no biodegradables.

2. No pueden desecharse por la cañería mezclas o compuestos insolubles que puedan producir bloqueo de las cañerías ni sustancias químicas de alta toxicidad.

3. Los residuos potencialmente patógenos se deben desechar en bolsas rojas colocadas en recipientes provistos para tal fin.

Los principios de BIOSEGURIDAD se pueden resumir en:

**A) Universalidad.** Todo el personal debe seguir las precauciones estándares rutinariamente para prevenir la exposición de la piel y de las membranas mucosas, en todas las situaciones que puedan dar origen a accidentes, estando o no previsto el contacto con sangre o cualquier otro fluido corporal. Estas precauciones deben ser aplicadas para TODAS las MUESTRAS, independientemente de presentar o no patologías.

**B) Uso de Barreras.** Comprende el concepto de evitar la exposición directa a sangre y otros fluidos orgánicos potencialmente contaminantes, mediante la utilización de materiales adecuados que se interpongan al contacto de los mismos. La utilización de barreras (ej. guantes) no evitan los accidentes de exposición a estos fluidos, pero disminuyen las consecuencias de dicho accidente.

**C) Medios de Eliminación de Material Contaminado.** Comprende el conjunto de dispositivos y procedimientos adecuados a través de los cuales los materiales utilizados son depositados y eliminados sin riesgo.

*La seguridad se aprende, es un tema siempre actual para todas las personas y especialmente para aquellas que trabajan o se desempeñan en un laboratorio. Los accidentes ocurren mayormente por el mal comportamiento de las personas debido a la falta de conocimiento y/o a la falta de medidas.*

**TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO Nº 1**  
**TOMA DE MUESTRAS. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS MICOLÓGICAS**

**OBJETIVOS**

- Tomar muestras clínicas aptas para el estudio micológico.
- Acondicionar el material necesario para realizar un correcto diagnóstico.
- Conocer las formas correctas de transportar y procesar el material de estudio.

**INTRODUCCION TEÓRICA**

Para un correcto diagnóstico micológico se deben recolectar las muestras siguiendo adecuadas condiciones que aseguren el éxito. En el presente Trabajo Práctico se explican las formas correctas para realizar una buena toma de muestra.

La veracidad del diagnóstico de las micosis depende de la calidad y cantidad del material recogido del/la paciente, de las condiciones de envío, conservación, transporte, procesamiento y de la pericia del micólogo/a. Las muestras deben ser representativas, abundantes, libres de contaminantes, exógenos o endógenos, y de sustancias que inhiban o alteren la viabilidad de los hongos.

**Toma de Muestra**

Para lograr un buen diagnóstico micológico, es fundamental realizar una adecuada toma de muestra a partir de la lesión, manipularla correctamente, para mantener la viabilidad del agente etiológico y evitar posibles contaminaciones en su transporte y procesamiento. Posteriormente, se debe realizar la siembra de la misma en los medios idóneos e incubar a la temperatura adecuada.

A la hora de valorar un crecimiento fúngico hay que tener siempre presente la necesidad de diferenciar un "aislamiento significativo" de otros que no lo son, ya que *no es lo mismo identificar una especie fúngica que diagnosticar una micosis.*

### **Normas Generales a Seguir para Optimizar la Toma de las Muestras Clínicas**

1. Obtención de material a partir de una lesión activa (del borde de la lesión), para aumentar la posibilidad de observar y recuperar al agente causal.
2. En el caso de micosis profundas, es necesario recoger las muestras asépticamente, utilizando contenedores estériles, remitirlas al laboratorio antes de pasadas las dos horas y sembrarlas lo antes posible, para evitar la pérdida de viabilidad de los hongos presentes y el desarrollo exagerado de bacterias acompañantes.
3. La muestra debe recogerse antes de instaurar el tratamiento. Cuando se sospecha una micosis pulmonar es preferible una muestra respiratoria que un hemocultivo.
4. Las muestras de lesiones cerradas y abscesos suelen presentar un gran rendimiento. Deben aspirarse con jeringa y transferirse a un recipiente estéril con solución salina.
5. El raspado de lesiones de piel y faneras se realiza con bisturí quirúrgico.
6. El recipiente se identificará con los datos del/la paciente (nombre y localización) y debe protegerse para que no se rompa en su transporte al laboratorio.
7. Las muestras deben ir acompañadas obligatoriamente del pedido médico, en el cual, al menos, debe hacerse constar la siguiente información: datos del/la paciente (nombre y apellido, número de historia clínica, fecha de nacimiento y sexo), datos clínicos (orientación diagnóstica, tratamiento antimicrobiano, enfermedad de base y antecedentes de interés), fecha y horario de recolección y datos del médico/a solicitante.
8. Al laboratorio se le debe informar de la probable presencia de hongos peligrosos. También si se sospecha la presencia de hongos con requerimientos especiales (como *Malassezia* spp. por ejemplo), así como de viajes u origen del/la paciente.

Los **envases para la toma de las muestras** pueden variar según el tipo de muestra a recoger y transportar:

- Tubos estériles con tapón de rosca: LCR y otros líquidos biológicos.
- Frascos estériles de boca ancha con tapón de rosca: orinas, esputos, heces, fragmentos de tejidos, etc.
- Torundas o hisopos de algodón estériles: se usan para tomar muestras de superficies y orificios corporales (exudados, secreciones).
- Jeringas estériles: sólo se admiten cuando su volumen no permita transferir la muestra a un medio de transporte adecuado.
- Frascos de hemocultivo para líquidos biológicos.
- Placas de Petri estériles.

## **Micosis Superficiales**

### **Normas Generales para la Preparación del/la Paciente.**

- 1) Suspender toda medicación antifúngica local y general, una semana antes como mínimo.
- 2) Lesiones libres de talcos, cremas o pomadas.
- 3) Cepillado de las lesiones con agua y jabón blanco durante los tres días previos a la extracción de la muestra.
- 4) Baños con agua y sal, y cepillados durante los tres días previos en las lesiones de uñas.
- 5) Cuando la lesión se localiza en los pies, concurrir con medias y calzado cerrado.

### **Examen con Luz UV Previo a la Toma de Muestra.**

Antes de realizar la toma de muestra de una micosis superficial, es aconsejable examinar las lesiones de la piel (sospechosas de Pitiriasis versicolor o eritrasma) y cuero cabelludo (dermatofitosis) en una habitación completamente oscura bajo la luz UV.

La piel normal muestra un color azul, mientras que en infecciones bacterianas como el eritrasma, emite fluorescencia rojo coral. En micosis como la Pitiriasis versicolor, las áreas afectadas emiten una fluorescencia brillante verdosa amarillenta (pudiendo poner de manifiesto lesiones no perceptibles a simple vista).

### **Toma de Muestra en las Diferentes Micosis Superficiales**

<b>Localización de la micosis</b>		<b>Procedimiento</b>	<b>Materiales a emplear</b>
Porción extra folicular de los pelos		Depilación	Pinza de depilar
		Corte de pelo	Tijera
Capa córnea de la piel lampiña		Raspado de la periferia de la lesión	Bisturí o borde de un portaobjetos
		Pegado con cinta adhesiva	Cinta adhesiva transparente
Cuero cabelludo		Depilación y raspado	Pinza de depilar y bisturí
Uña	Onicólisis distal	Raspado del lecho subungueal	Lanceta o bisturí
	Leuconiquia proximal	Perforación de la tabla externa	Pinza curva odontológica
Mucosas o cutáneas húmedas		Hisopado	Hisopo

## **Micosis Subcutáneas**

Para el diagnóstico de estas micosis se emplean de preferencia la escarificación de las lesiones cutáneas, biopsia y punción de quistes o nódulos subcutáneos.

**Escarificación.** Raspado profundo de la lesión con bisturí, previa anestesia y antisepsia local y la remoción mecánica de la costra si la hubiera. Con el material obtenido se

realizan improntas para microscopía y otra parte se coloca en solución fisiológica estéril para cultivo.

**Biopsia.** Debe ser profunda y de la periferia de la lesión para poder evidenciar invasión de tejidos sanos; se divide en dos partes: una en solución fisiológica estéril para microbiología y la otra en formol para histopatología.

**Punción.** Se realiza con aguja y jeringa estériles para obtener por aspiración el material contenido en las lesiones quísticas o nodulares localizadas en el tejido celular subcutáneo.

### ***Micosis Sistémicas o Broncopulmonares Endémicas***

Debido a la diseminación hemática, son varias las muestras que se pueden utilizar:

**Secreciones Respiratorias.** Pueden obtenerse por expectoración espontánea (Esputo), expectoración inducida con solución fisiológica (Esputo Inducido), Lavado bronquial o Lavado broncoalveolar (BAL).

**Hemocultivos.** Se toman dos muestras con un intervalo entre 30 min a 1 hora entre ambas. Tener la precaución de incubarlas no menos de 28 días, realizando repiques si se procesan en forma manual.

**Hemocultivo por Lisis-Centrifugación.** Se agrega 1 ml de solución de saponina estéril al 5% a 9 ml de sangre obtenida con anticoagulante. Se agita suavemente y se deja actuar durante no más de 4 hs. Luego se centrifuga a 3000 rpm y con el pellet se realizan estudios microscópicos y cultivos en medios habituales.

### **Transporte**

Todas las muestras deben enviarse al laboratorio rápidamente, sin conservantes. Las muestras en las cuales se sospeche la presencia de dermatofitos u hongos dimórficos, se conservarán a temperatura ambiente, nunca refrigeradas.

### **Preparación de las Muestras**

Para optimizar tanto la observación microscópica como el cultivo, es necesario preparar la muestra, aunque algunas se pueden inocular directamente sin que sea necesaria su manipulación previa. Todas las muestras deben observarse macroscópicamente y seleccionando la parte más representativa. Se buscan en los tejidos: las zonas con pus, caseificación o necrosis.

**Tejidos.** Deben ser inoculados en pequeños trozos en el medio de cultivo con el fin de facilitar el crecimiento o la penetración de algunos colorantes, como el blanco de calcoflúor. La

utilización de homogeneizadores no está aceptada ya que puede destruir a los hongos no septados. El trozado puede realizarse con tijeras o bisturí, el proceso puede realizarse en una placa de Petri añadiendo unas gotas de agua destilada estéril.

**Espujo y Secreciones Respiratorias.** El espujo y las secreciones respiratorias claramente purulentas, hemáticas o caseificadas pueden sembrarse directamente en los medios de cultivo. Las fluidas deben concentrarse por centrifugación (1500 rpm durante 10 min), desechando el sobrenadante y sembrando el sedimento resuspendido en solución salina. Cuando la muestra sea muy viscosa, habrá que fluidificarla sin diluirla excesivamente, usando un agente mucolítico como N-acetil cisteína al 0,5% o Ditioeritrol (mezclado con igual volumen de la muestra y dejándolo actuar a temperatura ambiente hasta que se consiga la fluidificación); posteriormente, puede concentrarse la muestra por centrifugación.

**Líquidos Orgánicos (LCR, Pleural, Peritoneal, Articular).** Deben concentrarse por centrifugación (1500 – 2500 rpm durante 10 min) o filtración (0,2 µm de poro), siempre que haya suficiente cantidad, sembrando el sedimento. Estas muestras pueden requerir un procesamiento especial o sembrarse directamente en el medio de cultivo.

**Uñas y Lecho Ungueal.** Se obtienen partículas finas mediante raspado con hojas de bisturí estériles preferentemente en el límite entre la región sana y la enferma (borde activo de la lesión).

**Biopsias.** Cortar con bisturí en pequeñas fracciones de 1 mm, sobre todo si no hay sospecha de ningún hongo en concreto o si la sospecha es de un hongo mucoral. En el caso de sospecha de *Histoplasma*, hay que macerar y homogeneizar el tejido y hacer improntas para tinciones.

## Procesamiento de las Muestras

### Observación Microscópica en Fresco

Consiste en colocar una gota del material a estudiar entre porta y cubreobjetos y observarlo al microscopio con objetivos de 10X y 40X. Los materiales córneos (escamas cutáneas, pelos y uñas) deben ser clarificados previamente con el agregado de una gota de KOH 20% y calentados suavemente sobre la llama del mechero; en aquellas muestras ricas en queratina, dejar actuar el KOH por 24 hs en cámara húmeda.

El agregado de una gota de tinta china al LCR permite evidenciar la cápsula de *Cryptococcus sp.* y la diferenciación de este hongo de los elementos celulares en la muestra.

### Microscopía Previa Coloración

Las coloraciones de rutina utilizadas en el laboratorio de Micología incluyen: Giemsa prolongado y Gomori-Grocot. Además, se puede suplementar a las anteriores la tinción de

Kinyoun, Ziehl-Neelsen y coloraciones negativas como la tinta china.

### Cultivos

Luego de la realización de los exámenes directos se procede a sembrar la muestra en medios de cultivos para aislamiento primario. Se utilizan medios sólidos simples o enriquecidos según sea el requerimiento del hongo que se desee recuperar.

Según la velocidad de crecimiento de los hongos, podremos agruparlos en distintos grupos:

Grupo	Velocidad de crecimiento	Ejemplos
Crecimiento rápido	Menos de 5 días	Oportunistas y Levaduras
Crecimiento moderado	Entre 5 y 10 días	Dermatofitos y causantes de micosis subcutáneas
Crecimiento lento	Mayor de 11 días	Causantes de Micosis Sistémicas Endémicas

Luego de que se produce el desarrollo fúngico en el medio de cultivo, para la identificación del hongo se procede a la observación de las características macro y micromorfológicas de las colonias (ver Trabajo Práctico N° 4: *Técnicas de observación*). Los medios de cultivo adecuados para evidenciar las características macro y micromorfológicas de los hongos son:

- 1) Agar Czapek-Dox para las especies de *Aspergillus* y hongos dematiáceos.
- 2) Agar harina de maíz para las Levaduras.
- 3) Agar Lactrimel para los dermatofitos.

### ACTIVIDADES A DESARROLLAR

Se observarán videos descriptivos y se simulará la toma de muestras de lesiones en distintas localizaciones de la piel en hipotéticas lesiones por hongos.

### BIBLIOGRAFÍA

Arenas Guzmán, R. y Torres, E. (2019). *Micología Médica Ilustrada*. Sexta Edición. Mc-Graw Hill Interamericana, ISBN: 978-607-15-1424-0.

Bonifaz, A. (2015). *Micología Médica Básica*. Quinta Edición. Mc-Graw Hill Interamericana, ISBN: 978-607-15-1270-3.

**Página web**

Zurita Macalupú, S.R. y Urcia Ausejo, F.C. (2017). *Manual de procedimientos técnicos para el diagnóstico micológico*. Ministerio de Salud, Perú. ISBN: 978-612-310-094-0. Recuperado el 04 de septiembre de 2023.



[https://antimicrobianos.ins.gob.pe/images/contenido/documentos/nacionales/MANUAL DE PROCEDIMIENTOS MICOLOGICOS INS PERU.pdf](https://antimicrobianos.ins.gob.pe/images/contenido/documentos/nacionales/MANUAL_DE_PROCEDIMIENTOS_MICOLOGICOS_INS_PERU.pdf)

**TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO Nº 2**  
**PREPARACION DE MATERIALES, MEDIOS DE CULTIVO, SOLUCIONES Y**  
**COLORANTES UTILIZADOS EN MICOLOGÍA**

**OBJETIVOS**

- Preparar medios de cultivo, soluciones y colorantes de uso frecuente en la práctica micológica.
- Esterilizar el material preparado para su posterior utilización.

**INTRODUCCION TEÓRICA**

Para un buen estudio micológico deben tenerse en cuenta todas aquellas precauciones de las técnicas microbiológicas, siendo de vital importancia la esterilidad de los materiales y medios de cultivo a ser utilizados. Hay que tener en cuenta que un buen resultado depende en gran medida del sitio de la toma de muestra como también de las condiciones de esterilidad de la misma, para evitar la contaminación con hongos indeseados que lleven a diagnosticar erróneamente al/la paciente.

**Materiales Utilizados en Micología**

**Hisopos.** Para toma de muestra; los mismos deben estar estériles.

**Portaobjetos.** Esterilizados, se utilizan para recolectar muestras.

**Ansas en Aguja y Forma de L.** Para hongos filamentosos.

**Ansas en Anillo.** Para hongos levaduriformes.

**Pinzas y Bisturíes.** Se utilizan para toma de muestra y se esterilizan por acción directa de la llama del mechero, habiendo sido sumergidos previamente en alcohol.

**Jeringas y Agujas.** Sirven para toma y procesamiento de muestras clínicas. Se proveen estériles de forma comercial.

**Pipetas.** Es conveniente disponer de distintos volúmenes de pipetas estériles cuando se necesitan transferir muestras líquidas o medios de cultivo.

**Tubos de Ensayo y Placas de Petri.** Se utilizan para distribución de los distintos medios de cultivo. Las placas suelen ser utilizadas además para recolección de muestras clínicas

(escamas, uñas, pelos). La ventaja de los tubos es que ocupan poco lugar al incubarlos y el potencial de contaminación es menor. En contraste, las placas proporcionan una mayor superficie para evidenciar cultivos mixtos y poder aislar un hongo en cuestión.

### Preparación de Medios de Cultivo

#### 1. Sabouraud Glucosado Agar

Medio utilizado para el aislamiento, identificación y conservación de hongos patógenos y saprófitos. También es útil para el cultivo de levaduras.

Medio deshidratado comercial..... 65 g  
Agua destilada ..... 1000 ml

Fundir en mechero y distribuir 5 ml por tubo. Esterilizar 15 min a 121°C. Solidificar en pico de flauta.

Nota: Mantener en lugar fresco pues la exposición al calor aumenta la hidrólisis de los componentes. Este medio se puede preparar desde sus componentes siguiendo las instrucciones del fabricante que se encuentran en el frasco que lo contiene.

#### 2. Agar Lactrimel

Medio utilizado para facilitar la fructificación de hongos filamentosos. Muy útil para observar la micromorfología de dermatofitos.

Miel de abeja ..... 2 g  
Leche descremada ..... 40 ml  
Harina común ..... 4 g  
CaCO<sub>3</sub>..... 0,5 g  
Agar ..... 4 g  
Agua destilada ..... 200 ml

Mezclar todos los componentes y calentar en mechero hasta una completa homogeneización. Esterilizar en autoclave 15 min a 121°C. Agregar mezcla antibiótica y fraccionar en tubos estériles. Solidificar en pico de flauta.

#### 3. Agar Papa Glucosado

Medio de cultivo adecuado para el aislamiento y recuento de hongos y levaduras en alimentos, productos farmacéuticos y otros materiales de importancia sanitaria. Es un medio utilizado para la estimulación de la formación de conidias y para la producción de pigmentos como en *Trichophyton rubrum* y *Microsporum canis*.

Papa.....	40 g
Glucosa.....	2 g
Agar .....	4 g
Agua destilada .....	200 ml

Pelar y rallar la papa. Disolver la glucosa en el agua y agregar el resto de los componentes. Hervir 20 min y filtrar con algodón. Esterilizar 15 min a 121°C. Agregar mezcla antibiótica y fraccionar en tubos estériles. Solidificar en pico de flauta.

Medio comercial: Disolver 7,8 g del polvo en 200 ml de agua destilada. Dejar reposar 5 min. Calentar hasta ebullición con agitación continua para disolución total. Distribuir en recipientes apropiados. Esterilizar en autoclave 15 min a 121°C. Si se desea ajustar el pH a 3.5, agregar aproximadamente 3 ml de una solución estéril de ácido tartárico al 10%, cuando el agar se encuentra entre 45-50°C. Distribuir en placas de Petri estériles.

#### 4. Agar Czapek-Dox

Medio utilizado para la identificación de especies de *Aspergillus*.

Medio deshidratado comercial.....	9,6 g
Agua destilada .....	200 ml

Calentar hasta ebullición con agitación continua para disolución total. Distribuir en tubos apropiados. Autoclavar 15 min a 121°C. Solidificar en pico de flauta.

Este medio se puede preparar desde sus componentes siguiendo las instrucciones del fabricante que se encuentran en el frasco que lo contiene.

#### 5. Agar Semillas de Girasol

Medio selectivo y diferencial para *Cryptococcus sp*, ya que detecta la actividad de la enzima fenoloxidasa presente en estas levaduras, dando un compuesto de color marrón.

Extracto de semillas de girasol.....	60 ml
Glucosa .....	0,2 g
Agar .....	4 g
Agua destilada .....	140 ml

Suspender los componentes en el agua destilada, esterilizar 15 min a 121°C, agregar mezcla antibiótica (1 ml de ampicilina + 1 ml de gentamicina). Plaquear o fraccionar en tubos de ensayo adecuados. Solidificar en pico de flauta.

#### 6. Extracto de Semillas de Girasol

Moler 70 g de semillas de girasol en molinillo de café, agregar 350 ml de agua destilada. Hervir y filtrar con gasa. Esterilizar a 121°C durante 15 min. Guardar a 4°C

herméticamente.

### 7. Agar Mueller Hinton (MHA) Suplementado con 2% de Glucosa y 0,5 µg/ml de Azul de Metileno

Añadir 100 ml de una solución de azul de metileno (5 mg/l) a 100 ml de la solución madre de glucosa (0,4 g/l). La solución resultante tendrá una concentración de azul de metileno de 5 g/ml, y de glucosa de 0,4 g/ml). Esterilizar por filtración.

Añadir 1 ml a la superficie de las placas de MHA de 9 cm de diámetro. En el caso de utilizar placas de 15 cm de diámetro, se añadirán 2,9 ml. Extender y dejar que se absorba durante toda la noche.

## Preparación de Soluciones y Colorantes

### 1. Solución de KOH al 20%

Solución utilizada para disgregación de muestras clínicas y posterior observación microscópica. El KOH desintegra la queratina y permite visualizar los elementos fúngicos.

KOH .....	2 g
Agua destilada .....	10 ml

Mezclar los componentes y calentar hasta disolución. Guardar en frasco de plástico.

### 2. Lactofenol Azul de Algodón

Utilizada para la observación de los componentes fúngicos y para apreciar fácilmente las estructuras para una adecuada identificación. El fenol inactiva las enzimas líticas de la célula e impide que ésta se rompa. El ácido láctico preserva las estructuras fúngicas al provocar un cambio de gradiente osmótico con relación al interior fúngico, lo que genera una película protectora. El azul de algodón es un colorante ácido que tiñe el citoplasma y la quitina presente en las células fúngicas, mientras que el glicerol mantiene húmeda la preparación.

Azul de algodón .....	0,05 g
Glicerina.....	20 ml
Ácido láctico.....	20 ml
Cristales de fenol.....	20 g
Agua destilada .....	20 ml

Disolver el fenol en agua, agregar el ácido y la glicerina. Calentar a 70°C y adicionar el azul de algodón. Guardar en frasco de vidrio.

Nota: Los cristales de fenol tienden a oxidarse dando como consecuencia un producto rosado que es la felona. En tal caso, lavar los cristales con Etanol 96°, esto produce la

reducción del compuesto apareciendo nuevamente los cristales blancos típicos del fenol.

### **Efectos del Fenol sobre la Salud**

**1. Agudos.** Irritación de la piel, mucosas y garganta. Si el contacto es muy prolongado, pueden producirse quemaduras. Se han descrito casos de sensibilización alérgica por contacto. Corrosivo.

**2. Crónicos.** Alteraciones hepáticas, renales y cardíacas. Dermatitis de contacto y decoloración de la piel.



Pictogramas de fenol cristalizado. Extraído de la Hoja de Seguridad (MSDS) correspondiente. *Fuente:* <https://www.marbequimica.com.ar/wp-content/uploads/2018/09/714.pdf>

**Precauciones durante su Manipulación.** Mantener el fenol en envases cerrados, en un lugar fresco y bien ventilado, al abrigo de la luz y preferentemente alejado del área de trabajo. Manipular el fenol con cuidado en campanas de extracción de vapores debido a la toxicidad de este compuesto. Evitar el contacto directo con piel y mucosas, mediante el uso de guantes resistentes, protección ocular. Las soluciones que contengan fenol, así como todo el material que haya estado en contacto, deberán ser colocados en recipientes herméticos y no pueden ser eliminados a través de los desagües (aun cuando estén diluidas). Luego, deberán ser entregados a una empresa de tratamiento de residuos especiales acreditada para su acondicionamiento y disposición final según la legislación y/o reglamentación local, estatal o nacional vigente (en Argentina, Ley N° 24051: “Residuos Peligrosos”).

### **3. Azul de Metileno al 1% en Solución Acuosa**

Solución utilizada para la observación de *Malassezia* en muestras clínicas.

Azul de metileno ..... 0,1 g  
 Agua destilada ..... 10 ml

## ACTIVIDADES A DESARROLLAR

1) Preparar el siguiente material para su posterior esterilización:

- Placas de Petri
- Pipetas de 1 ml, 2 ml, 5 ml y 10 ml
- Erlenmeyers
- Tubos con tapa a rosca de 5 ml

Envolver adecuadamente con papel madera o similar y esterilizar en estufa de esterilización una hora a 180°C.

2) Preparar los medios de cultivo descritos en el apartado “Introducción teórica” y esterilizar en autoclave 15 min a 121°C.

## BIBLIOGRAFÍA

Arenas Guzmán, R, y Torres, E. (2019). *Micología Médica Ilustrada*. Sexta Edición. Mc-Graw Hill Interamericana, ISBN: 978-607-15-1424-0.

Bava, A.J. (2002). *Introducción a la Micología Médica*. Acta bioquímica Clínica Latinoamericana. Suplemento 4. ISSN 0325-2957.

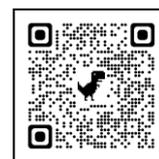
Cuenca Estrella, M., Gadea Gironés, I., Mazuelos, E., Pemán García, J., Pontón, J., Rodríguez Tudela, J. (2006). *Diagnóstico microbiológico de las micosis y estudios de sensibilidad a los antifúngicos en Procedimiento en Microbiología Clínica*. Capítulo 21. ISBN- 84-611-3540-7, pp. 21.

Pemán, J., Martín Mazuelos, E., Rubio Calvo, M.C. (2007). *Guía práctica de identificación y diagnóstico en Micología Clínica*. 2ª edición. Revista Iberoamericana de Micología.

## Páginas Web

Universitat Politècnica de València. *Manejo del fenol, derivados fenólicos y sus residuos*. Recuperado el 04 de septiembre de 2023.

[https://www.spri.upv.es/IOP\\_SQ\\_33.htm](https://www.spri.upv.es/IOP_SQ_33.htm)



CIEMEP, CONICET. *Procedimiento de descarte de fenol y acetona*. Recuperado el 04 de septiembre de 2023.

<https://ciemep.conicet.gov.ar/wp-content/uploads/sites/65/2019/08/PROCEDIMIENTO-DE-DESCARTE->



[FENOL-ACETONA.-CIEMEP.pdf](#)

Ministerio de Salud. Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud “Dr. Carlos G. Malbrán”. *Manual de Seguridad y Bioseguridad*. Sexta Edición. Recuperado el 04 de septiembre de 2023.

[https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/inp\\_-\\_manual\\_bioseguridad\\_inp\\_version\\_2007.pdf](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/inp_-_manual_bioseguridad_inp_version_2007.pdf)



Ley 24.051 de 1992. *Residuos Peligrosos*. 08 de enero de 1992. InfoLEG.

<http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/0-4999/450/texact.htm>



**TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N° 3**  
**TÉCNICAS DE SIEMBRA Y AISLAMIENTO**

**OBJETIVOS**

- Realizar correctamente la siembra de los microorganismos para lograr un cultivo microbiano puro.
- Conocer las diferentes temperaturas de incubación.
- Conocer distintas técnicas de siembra y su aplicación.
- Conocer y aplicar técnicas de aislamiento de microorganismos.
- Adquirir destreza en la generación de microcultivos y conocer su utilidad.

**INTRODUCCIÓN TEÓRICA**

**Siembra**

Sembrar o inocular es introducir artificialmente una porción de muestra (inóculo) en un medio adecuado con el fin de iniciar un cultivo microbiano. Luego de sembrado, el medio de cultivo se incuba a una temperatura adecuada para el crecimiento. Todos los cultivos para hongos se incuban a temperatura ambiente o preferentemente a 28°C y se mantienen durante 30 días antes de descartarlos como negativos. Algunos hongos requieren incubación a 35-37°C para mostrar sus formas de levaduras.

La siembra puede realizarse en medio líquido, sólido o semisólido, utilizando ansa en punta, ansa en anillo, hisopo o pipeta estéril según la naturaleza de la muestra.

**Siembra en Medio Líquido**

Habitualmente se realiza en tubos o en matraces. El crecimiento se puede manifestar por enturbiamiento, por formación de velo o película, o por sedimento.

**Siembra en Medio Sólido**

Puede ser en tubos o placas:

***Tubos con Agar Inclinado.*** Para sembrarlos, se mueve el ansa o la punta suavemente sobre

la superficie del agar con un movimiento en zigzag desde el fondo hasta la parte superior, cuidando de no dañar el agar, haciendo unos toques en la superficie, o solamente haciendo una estría. En el caso de dermatofitosis, se siembra con ansa en L realizando tres repiques en el agar inclinado por tubo.

**Siembra en Placas.** Puede ser en superficie o incorporada.

**En Superficie.** Se colocan 0,1 ml de la dilución de la muestra con pipeta estéril en el centro de la placa y se distribuye; también se puede sembrar con ansa o con hisopo estéril.

**Incorporada.** Se coloca 1 ml de la muestra en una placa estéril vacía, en el centro de la misma. Sobre ella se agregan 20 ml de medio de cultivo sólido fundido y termostatzado a 45°C; luego se agita la placa para que la muestra se mezcle con el agar y se deja solidificar.

En medio sólido cada célula viable dará origen a una colonia y por lo tanto la siembra en placas se puede utilizar, no solo para cultivar microorganismos, sino además para contar y aislar.

## Aislamiento

Aislar es separar un microorganismo desde una población que lo contiene y en donde se encuentran varios tipos. En hábitats naturales raramente encontramos a los microorganismos en cultivo puro (un solo tipo de microorganismo), por lo tanto, es necesario hacer algún procedimiento de aislamiento para separar los distintos tipos de microorganismos presentes para luego así poder identificarlos.

El aislamiento se puede lograr directamente a partir de una muestra cuando el o los microorganismos están en una proporción adecuada. Para aislar se utiliza alguno de los siguientes procedimientos:

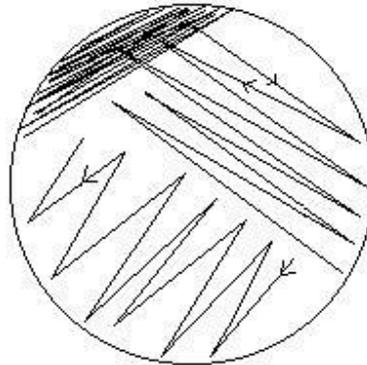
### Aislamiento por Siembra Espontánea

Permite obtener la flora micológica del aire de una localidad o ambiente. Se colocan placas abiertas con medio de cultivo Sabouraud-glucosa en los lugares de interés. Al cabo de un intervalo de tiempo variable (5-15-30 min), se cierran las cajas y se incuban a 28°C durante una semana. Aparecerán en la superficie colonias de hongos que se encontraban en el aire, a partir de las cuales se pueden realizar repiques de las colonias que nos interesen para trabajar con un hongo determinado.

### Aislamiento por Agotamiento en Superficie

El objetivo es obtener colonias aisladas. Una de las técnicas que existen consiste en cargar el ansa con la muestra y hacer estrías paralelas en la cuarta parte de la superficie de la placa; se quema el ansa, se enfría, se gira la placa 90° y se vuelve a estriar tocando 3 o 4

veces el área sembrada inicialmente y cubriendo otro cuarto de placa. Por último, sin quemar el ansa, se estría el resto de la superficie sin sembrar (Figura 1). La placa también se puede dividir en cuadrantes sembrando en cada uno de ellos sin volver a cargar el ansa.



**Figura 1.** Esquema representativo del aislamiento por agotamiento en superficie.

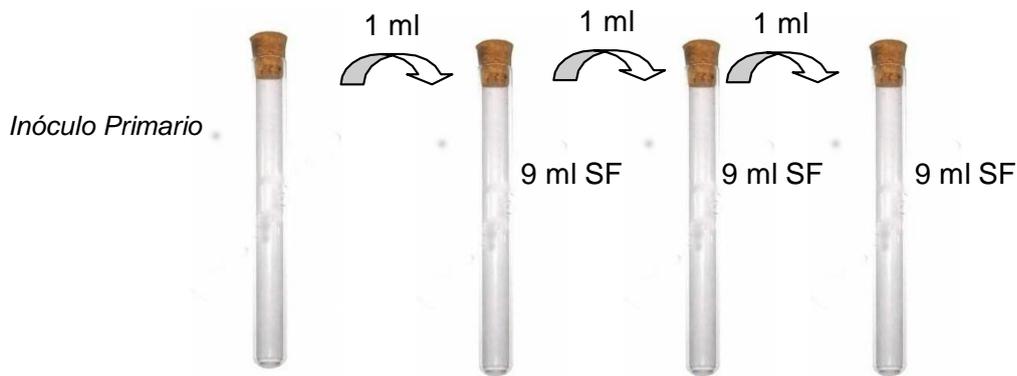
### **Aislamiento por Diluciones Sucesivas en Agar**

Se aprovecha la propiedad que tienen los medios de cultivo con agar (medios sólidos) de permanecer líquidos a temperatura relativamente baja, lo que permite la incorporación de la mezcla microbiana. Una serie de 4 a 6 tubos de cultivo, cada uno conteniendo 9 ml de un medio de agar adecuado, se calienta en baño de agua para fundir el agar. Luego, se enfría el contenido de los tubos a 45°C; se añade al primero de ellos 1 ml del material que contiene la levadura agitando cuidadosamente (dilución 1/10). A continuación, se lleva 1 ml de esta dilución a un segundo tubo (dilución 1/100) y el resto se vierte asépticamente en una placa de Petri; se agita el segundo tubo y se separa 1 ml para el tercero (dilución 1/1000), vertiendo el resto en otra placa de Petri. Se continúa del mismo modo hasta obtener entre 4 a 6 diluciones, y como el cultivo se va diluyendo de una a otra, en alguna de ellas habrá ya un cultivo puro con los microorganismos inmovilizados y separados uno de otro, originando colonias que se pueden contar.

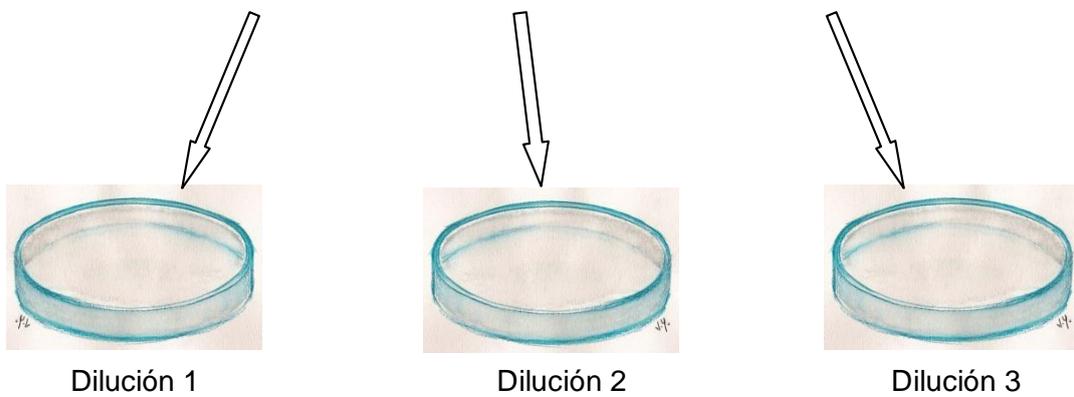
### **Método de las Diluciones para el Recuento de Colonias**

Se trabaja de forma similar al método de aislamiento por diluciones sucesivas en agar realizando las diluciones en Solución Fisiológica estéril y luego vertiendo las diluciones obtenidas en placas de Petri estériles a las que a continuación se les agrega el agar fundido y enfriado a 45–50°C; estas se homogenizan, se dejan solidificar y se incuban a la temperatura adecuada (Figura 2).

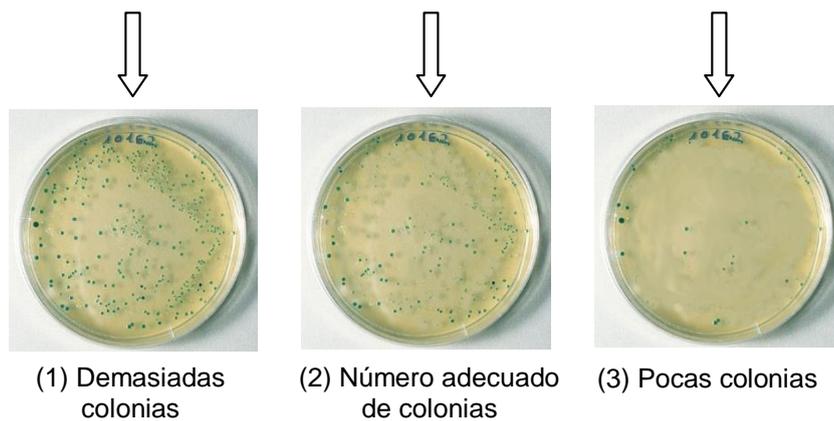
Tubos con Solución Fisiológica



Verter en Placas de Petri luego de mezclar



Agregar a cada una de las placas el agar previamente fundido y enfriado a 45-50°C, dejar solidificar e incubar.



**Figura 2.** Esquema representativo del aislamiento por diluciones sucesivas en agar (recuento de colonias).

### **Métodos Especiales de Aislamiento**

Se recurre a las propiedades biológicas del hongo. Por ejemplo, el anzuelo queratínico permite el aislamiento de aquellos hongos capaces de desarrollar con queratina como única fuente de nutrición. Se investiga en tierra la existencia de hongos geofílicos, para ello se coloca una porción de ésta en una caja de Petri estéril, sobre ella se colocan pelos (humanos o de caballo) estériles y se humecta. Se incuba a 28°C durante 15 a 30 días, trasladando luego los pelos con los hongos queratinofílicos a un medio de cultivo adecuado.

### **Microcultivo**

Permite la observación microscópica del micelio fúngico y sus elementos de reproducción en forma intacta.

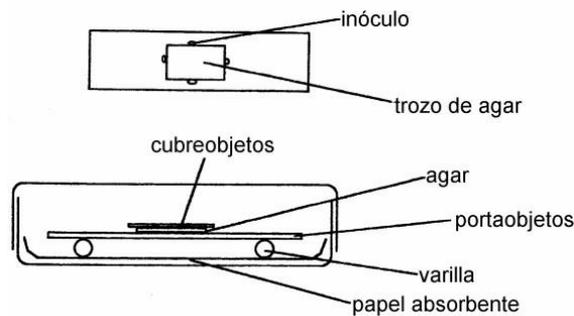
**Cultivos de Adhesión.** El preparado de microcultivos (también conocido como cultivo en portaobjeto) se realiza de la siguiente manera:

En la superficie de una caja de Petri, se coloca un pedazo de papel de filtro o un trozo de algodón y dos varillas de vidrio, cortadas de un tamaño adecuado. Se coloca un portaobjeto sobre las varillas y se esteriliza. Se corta un pequeño bloque de agar Sabouraud o similar previamente vertido en una placa de Petri hasta una profundidad de 4 mm. Esto puede hacerse usando una hoja de bisturí estéril o un tubo de ensayo recto estéril sin bordes. Con el mismo bisturí estéril se coloca el bloque de agar sobre la superficie del portaobjeto. Con un ansa aguja estéril se remueven porciones pequeñas de la colonia de hongos que se desea estudiar y se inocula en los cuatros cuadrantes del bloque de agar. Luego de la inoculación, se coloca un cubreobjeto estéril sobre la superficie del agar. Se humedece el papel o el trozo de algodón y se incuba. La colonia crecerá por debajo de la superficie del cubreobjeto. Se examina el montaje periódicamente a simple vista para determinar si la colonia ha madurado y está lista para su observación microscópica. Cuando es evidente el crecimiento, se retira cuidadosamente el cubreobjeto con pinzas estériles y se coloca en un portaobjeto que contiene una gota de lactofenol azul de algodón. Si se desea un montaje permanente, se limpia la superficie del portaobjeto inmediatamente adyacente al borde del cubreobjeto y se aplica esmalte para uñas transparente (Figura 3).

### **Cultivo en Lámina Gelosada**

En una placa de Petri estéril, colocar los soportes y un portaobjeto previamente flameado. Depositar sobre el mismo agar Sabouraud-Glucosa (previamente fundido, enfriado a 50°C y sembrado con esporas del hongo a estudiar), obteniendo una lámina de medio bien delgada. Dejar solidificar. Humectar el fondo de la placa de Petri con agua destilada estéril, incubar a 28°C. Para su observación, depositar sobre el desarrollo fúngico un cubreobjeto y

colocar el porta así preparado en el microscopio.



**Figura 3.** Microcultivo. Fuente: [http://www.microbiota.com.ar/sites/default/files/5%20cultivos\\_0.pdf](http://www.microbiota.com.ar/sites/default/files/5%20cultivos_0.pdf)

### Siembra de Colonia Gigante

Sembrar con ansa aguja en el centro de botellas utilizadas en los hemocultivos o Placas de Petri que contengan un sustrato de por lo menos 3-4 mm de espesor; en este caso, el hongo desarrollará libremente en todas direcciones. Incubar. Son útiles para describir los caracteres macroscópicos de las colonias (diámetro, elevación, aspecto óptico, textura, bordes, color, etc.), haciendo las observaciones a los 3 o 4 días y luego cada semana, durante un mes.

### ACTIVIDADES A DESARROLLAR

- 1) Con las muestras de hongos suministradas, se realizará lo siguiente:
  - Siembra por estrías en placa de Petri y tubos pico de flauta.
  - Método de las diluciones para recuento de colonias (trabajar con hongos levaduriformes).
  - Siembra espontánea en algún ambiente cercano al laboratorio (por ej. baños, aulas, etc.).
  - Siembra de colonia gigante (trabajar con hongos filamentosos).
- 2) Observación del siguiente video descriptivo para la posterior preparación y siembra de microcultivos: [https://www.youtube.com/watch?v=FHdsMH8p-IE&ab\\_channel=UniversidadMiguelHern%C3%A1ndezdeElche](https://www.youtube.com/watch?v=FHdsMH8p-IE&ab_channel=UniversidadMiguelHern%C3%A1ndezdeElche)



*Debemos tener la precaución de trabajar correctamente con el ansa y con las pipetas para evitar posibles contaminaciones de los medios de cultivo y de todo el personal presente.*

## BIBLIOGRAFÍA

- Arenas, Guzmán R. y Torres, E. (2019). *Micología Médica Ilustrada*. Sexta Edición. Mc-Graw Hill Interamericana, ISBN: 978-607-15-1424-0.
- De Hoog, G.S., Guarro, J., Gené, J., Ahmed, S., Al-Hatmi, A.M.S., Figueras, M.J., Vitale, R.G. (2020). *Atlas of Clinical Fungi*. Cuarta edición. Hilversum.
- Pemán, J., Martín Mazuelos, E., Rubio Calvo, M.C. (2007). *Guía práctica de identificación y diagnóstico en Micología Clínica*. Segunda edición. Revista Iberoamericana de Micología.

## TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N° 4

### TÉCNICAS DE OBSERVACIÓN

#### OBJETIVOS

- Observar la morfología de colonias.
- Describir las características del crecimiento en distintos medios.
- Observar la micromorfología en preparados en fresco y coloreados.

#### INTRODUCCIÓN TEÓRICA

La Micología es esencialmente descriptiva. El estudio y clasificación de los hongos se hace en base a:

##### **Caracteres Macroscópicos**

Permiten conocer la morfología del cuerpo del hongo o el aspecto de la colonia. Para ello, se toman todos los datos de los caracteres que se observan a simple vista: forma, aspecto, color, consistencia, tamaño, estructura, reverso, tipo de crecimiento, superficie, zonas de desarrollo, etc.

La macromorfología de un mismo organismo puede variar enormemente según el medio de cultivo. Por ello, al realizar el estudio macroscópico de una colonia, se debe indicar en que medios de cultivos se sembró, pues si se varían las condiciones de los mismos, no existe constancia en el desarrollo, aún de hongos de la misma especie, por ejemplo, *Mucor rouxii* desarrollado en iguales condiciones y tiempo (4 días) en medio Agar glucosado desarrolla una colonia dos veces más grande y algodonosa que en Agar Sabouraud miel.

##### **Caracteres Microscópicos**

Se estudian empleando todas las técnicas de observación, desde el uso de la simple lupa hasta el microscopio electrónico. Un microscopio con diferentes aumentos es suficiente para los trabajos de rutina en Micología.

- **Observaciones con Lupa.** Permiten la observación de hongos de grandes dimensiones,

sin necesidad de recurrir a técnicas más complejas.

- **Observaciones Microscópicas Directas.** Se efectúan con material entre porta y cubreobjeto, tomando una pequeña cantidad que se deposita sobre el portaobjeto. Se puede usar una gota de líquido de montar (ver más adelante), solución fisiológica, agua destilada, o solución acuosa de glicerina al 30%. También puede usarse una gota de colorantes vitales (rojo neutro, azul de metileno, etc.) que permiten ver al hongo.

Las preparaciones para las observaciones microscópicas directas pueden realizarse por:

**a) Disociación**

Se realizan cuando el hongo es filamentoso. Se coloca en un portaobjeto una gota de cualquiera de los líquidos arriba mencionados y con un ansa en gancho se toma una pequeña porción en desarrollo. Se deposita sobre la gota y se disgrega cuidadosamente con agujas de disección. Una vez que el material está más o menos homogeneizado, se coloca un cubreobjetos y se observa. Se deben usar los objetivos secos de menor y mayor aumento.

**b) Impresión**

Son especialmente usadas para montar o disgregar materiales clínicos donde se visualizará al hongo luego de una coloración. Consiste en colocar una pequeña cantidad de material a observar, por ejemplo, esputo o trozos de órganos, entre dos portaobjetos colocados transversalmente (en cruz) y hacer una ligera presión de uno sobre el otro hasta disgregar el material. Cuando se utiliza esta técnica para hacer preparaciones coloreadas de escamas de piel, se debe colocar este material entre portaobjetos en los que previamente se haya extendido una película de suero que servirá para adherir las escamas a los mismos. Se presiona igual que en el caso anterior. Para efectuar la coloración, se deja secar previamente a temperatura ambiente y recién se colorea.

**Tener en cuenta:**

- Los *hongos levaduriformes* producen colonias mantecosas, pastosas, con una superficie lisa que simula colonias bacterianas.
- Los *hongos filamentosos* producen colonias vellosas, algodonosas o acordonadas por el crecimiento de hifas aéreas.

### Usos de Líquidos de Montar

Se utilizan para observaciones de hongos tomados de medios de cultivo. Los más usados son:

### 1) Líquido de Montar de Patterson

Se usa para observaciones en fresco, útil para aquellos casos en los que se necesite aclarar la preparación sin modificar la morfología ni el color de los elementos. Evita la formación de burbujas.

Sol. de acetato de K al 2% .....	50 ml
Glicerina.....	20 ml
Alcohol .....	30 ml
CuSO <sub>4</sub> .....	c.s.p.

Preparar la solución y luego colorear.

### 2) Colorante de Gueguén

Ácido láctico .....	100 ml
Sudan III.....	0,1 g
Azul de algodón.....	0,1 g
Solución yodo alcohólica.....	10 a 30 gotas

Se disuelve el Sudán III en el ácido láctico por trituración en un mortero. Luego se calienta suavemente hasta color rojizo. Enfriar y dejar reposar 24 h. Filtrar y agregar el Azul de algodón y la solución de yodo.

Algunos elementos del hongo aparecen muy bien diferenciados y coloreados. Las grasas aparecerán en color rosa o rojo por el Sudan III, el glucógeno en caoba y el almidón en azul por el yodo. El azul de algodón da el fondo y es tomado por el protoplasma joven y por la pared celular. El ácido láctico es aclarante y fijador.

### 3) Azul de Lactofenol

Agua destilada.....	20 ml
Ácido láctico.....	20 ml
Cristales de fenol.....	20 g
Azul de anilina (azul algodón).....	0,05 g
Glicerol.....	40 ml

Disolver el fenol en ácido láctico, glicerol y agua, calentando suavemente. Luego agregar el azul de anilina.

Se utiliza para preparados húmedos cuando se remueve una pequeña cantidad de agar con el cultivo.

### Criterio a Usar en Muestras Clínicas

Es importante que un hongo sea reconocido tempranamente, ya que a menudo el

tratamiento de las micosis es riguroso, puede tener complicaciones y no debe administrarse tentativamente hasta haber hecho un diagnóstico definitivo.

Las siguientes son pautas para hacer una evaluación potencial de una especie de hongos obtenida de muestras clínicas:

1. Los hongos saprobios habitualmente tienen un crecimiento rápido y producen colonias en 1 a 5 días.
2. Los hongos patógenos dimórficos crecen lentamente, entre 10 a 45 días, sin embargo, *Coccidioides posadasii* e *Histoplasma capsulatum* pueden producir colonias maduras antes de los 10 días.
3. Los hongos saprobios no pueden convertirse en levaduras o esférulas por incubación a 37°C, mientras que sí pueden hacerlo los dimórficos patógenos. A su vez, estos tienen una contraparte saprobia que también desarrolla a 25-30°C.
4. Debido a que los hongos saprobios son inhibidos en medios de cultivo con cicloheximida, es necesario usar medios de aislamiento con inhibidor y sin inhibidor.

Recordar: la mayoría de los hongos dimórficos son capaces de crecer en presencia de este agente antimicótico.

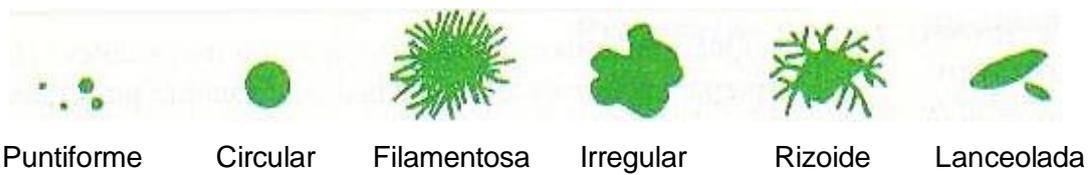
5. El cultivo de los hongos dimórficos presenta colonias de aspecto sedoso brillante, debido a que sus hifas son más estrechas que las de los hongos saprofitos y tienden a ubicarse paralelas dando un aspecto como de cuerda; en cambio los hongos saprofitos sus colonias tienen un aspecto lanoso, velloso, algodonoso, yesoso.

### Morfología Macroscópica

Sobre medios de cultivo generales se deberá tener en cuenta la descripción del aspecto de las colonias. Las colonias se pueden describir teniendo en cuenta el tamaño, color, superficie, etc.

- **Tamaño.** Grande, mediana, pequeña.
- **Color.** Ver en superficie, reverso o difusión al medio.
  - Los hongos dematiáceos dan color marrón o negro en el anverso y negro en el reverso.
  - Los dermatofitos presentan diversa gama de colores en el anverso y reverso de la colonia.
- **Superficie.** Brillante, lisa, granular, rugosa, aterciopelada, terrosa, algodonosa.
- **Consistencia.** Viscosa, mantecosa, friable (se disgrega al tocarla), dura.
- **Densidad (con luz a través de la colonia).** Opaca, Transparente, Traslúcida.

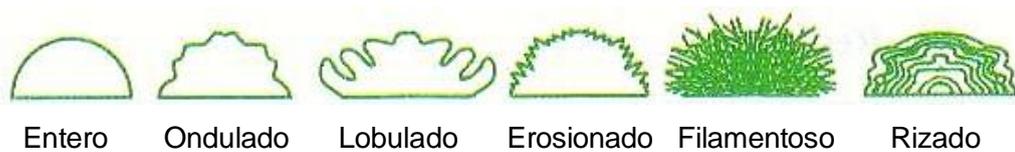
- **Forma**



- **Elevación**



- **Margen**



Fuente: <https://1.bp.blogspot.com/-IzqeVfS0sg/UMUWf9AGjYI/AAAAAAAAAH8/EQUaXhIUO-k/s1600/morfologiacolonial.png>

### Morfología Microscópica

Pueden usarse diversos métodos para el examen microscópico directo de hongos:

**Método de Montaje con KOH.** El hidróxido de potasio se utiliza para aclarar y ablandar muestras como piel, raspado de uñas y pelos infectados o muestras de esputos. Se coloca una gota de KOH al 10% que contiene glicerina en un portaobjeto y se mezcla con una pequeña cantidad de material a examinar (piel, pelo, escamas, etc.). Se pasa suavemente el portaobjeto a través de la llama baja de un mechero Bunsen para facilitar el aclaramiento (no hervir). Se coloca un cubreobjeto sobre la gota y se deja reposar a temperatura ambiente durante 30 min. Se examina en el microscopio buscando las hifas de los hongos.

**Método de Montaje Húmedo.** El procedimiento se lleva a cabo con el ansa de gancho o con una aguja montada sobre un trozo de varilla. Se procede tomando una pequeña porción de la colonia a estudiar (a veces es necesario ayudarse con otra ansa). La muestra debe tomarse de un sitio intermedio entre el centro y la periferia de la colonia. Este pequeño fragmento de colonia se transfiere a una gota de lactofenol azul de algodón en un portaobjeto y se cubre con un cubreobjetos. Se presiona suavemente directamente sobre el fragmento de la colonia para deprimir las hifas y otras estructuras y permitir un mejor examen microscópico.

**Método de Montaje con Cinta Adhesiva.** Se aconseja usar cinta adhesiva de alta transparencia. Se hace un dobléz de una tira de 4 cm, con el lado adhesivo hacia afuera, y se

sostiene entre los dedos pulgar e índice. El lado adhesivo se presiona firmemente contra la superficie de la colonia del hongo. El micelio aéreo se adhiere a la superficie y puede separarse del resto. Las tiras de cinta inoculadas se colocan en una gotita de lactofenol azul de algodón en un portaobjeto.

### Hifas

1. **Tabicadas.** Hialinas o dematiáceas.
2. **No Tabicadas**

### Micelio Vegetativo

- **Hifas en Raqueta**
- **Hifas en Espiral**
- **Hifas en Peine**
- **Candelabros Fávicos**

### Esporulación Aérea

- **Esporangios**
- **Microconidias**
- **Macroconidias**
- **Ascosporas Dentro de Ascas**
- **Basidiosporas sobre Básides**

### Esporulación Vegetativa

- **Artrosporas** (Ej. *Coccidioides posadasii*)
- **Blastosporas** (Ej. levaduras)
- **Clamidosporas** (Ej. Complejo *Candida albicans*)

## Identificación Preliminar de Cultivos de Hongos

El examen de los cultivos debe hacerse diariamente, por lo menos durante la primera y segunda semana de incubación. Las observaciones macroscópicas deben realizarse con lupa. En general, es posible determinar, por el examen visual, si una colonia de hongos es filamentosa o levaduriforme. Las colonias de hongos filamentosos tienen un aspecto vellosos o acordonado, mientras que las levaduras producen colonias mantecosas con superficies lisas.

Para la identificación de un moho se precisa una descripción completa del organismo.

Para estudiar sus características, se prefiere el medio de Czapek que es un medio satisfactorio y da muy buenos resultados con fines comparativos para *Penicillium* y *Aspergillus*. Las colonias individuales desarrolladas en el medio Czapek se pueden estudiar a simple vista, con la lupa y al microscopio con poco aumento. Podemos así deducir lo siguiente: velocidad y forma de crecimiento, tamaño y color de los cuerpos fructíferos e hifas, elevación y densidad de las distintas partes de la colonia, presencia o ausencia de peritecios (frutos de reproducción sexual), variaciones en la forma y tamaño de los núcleos de mohos. Debe observarse la consistencia de la superficie de la colonia, el plegamiento, la nitidez del borde y la presencia de pigmentos en la superficie o el reverso o su difusión hacia el medio circundante

Invirtiendo la placa de Petri puede observarse el color del fondo de la colonia, así como cualquier coloración producida en el medio.

Estas observaciones son suficientes para indicar la clase u orden a que pertenece el hongo, pero para identificar el género y la especie es preciso el estudio al microscopio.

Sobre las esporas, es necesario efectuar las siguientes observaciones: forma, tamaño, color y características.

LEVADURAS	
Formadoras de hifas en Agar Harina de Maíz	No formadoras de hifas en Agar Harina de Maíz
Pseudohifas: <i>Candida sp.</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i> <i>Saccharomyces sp.</i>
Artrosporas: <i>Geotrichum sp.</i> <i>Trichosporon sp.</i>	<i>Rhodotorula sp.</i> Complejo <i>Candida glabrata</i>

En las hifas fértiles se examinan: ramificaciones, tabiques, anchura, color, características y naturaleza de las paredes (lisas, picadas o rugosas). A partir de las observaciones así adquiridas y complementadas con las técnicas de coloraciones conocidas, puede intentarse la identificación del moho conociendo la descripción de los géneros.

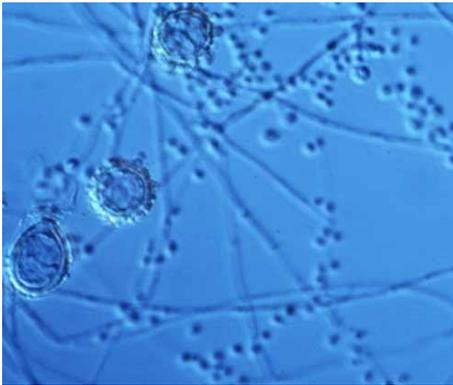
HONGOS FILAMENTOSOS O MOHOS				
Hifas no tabicadas	Hifas tabicadas			
	Dematiáceos	Hialinos		
Phycomycetes:	Conidias Multicelulares Tabiques transversales y longitudinales:	Dimórficos:	Dermatofitos:	Conidióforos con vesícula dilatada:
* <i>Rhizopus sp.</i>	* <i>Alternaria sp.</i>	* <i>Histoplasma capsulatum</i>	* <i>Microsporum sp.</i>	* <i>Aspergillus sp.</i>
* <i>Mucor sp.</i>	* <i>Curvularia sp.</i>	* <i>Coccidioides immitis</i>	* <i>Trichophyton sp.</i>	
* <i>Absidia sp.</i>		* <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	* <i>Epidermophyton sp.</i>	Conidióforos que se ramifican:
	Conidias unicelulares:	* <i>Sporothrix schenckii</i>		* <i>Penicillium sp.</i>
	* <i>Cladosporium sp.</i>			Conidióforos que forman racimos:
	* <i>Nigrospora sp.</i>			* <i>Fusarium sp.</i>
	De crecimiento lento:			
	* <i>Phialophora sp.</i>			
	* <i>Fonsecaea sp.</i>			



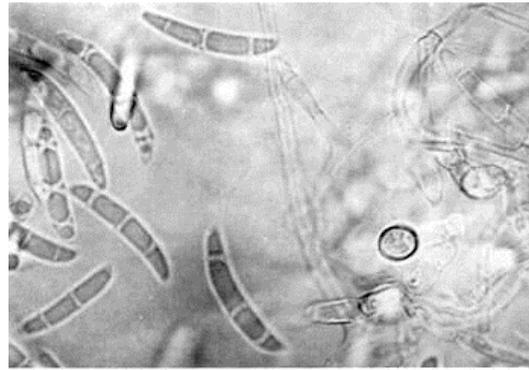
Blastosporas y Clamidosporas del complejo *Candida albicans*.

Fuente: <https://biologia.laquia2000.com/hongos/candida-albicans>

Macro y Microconidias

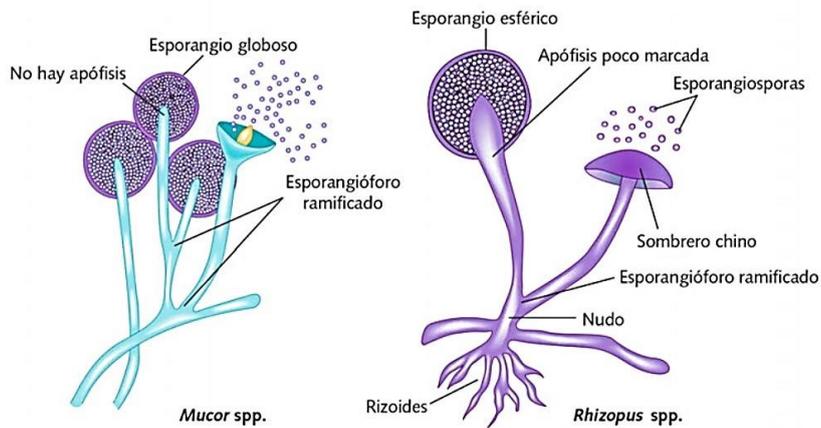


Microconidias y Clamidosporas



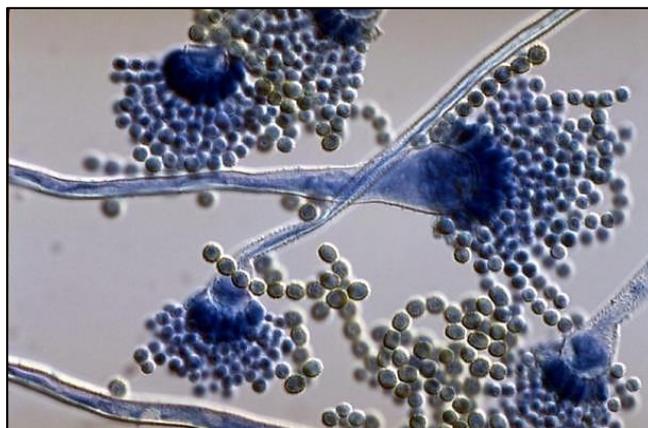
Ejemplos de macroconidias, microconidias y clamidosporas. Fuente:

<http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/6286/T19473%20GONZALEZ%20MORALES%2C%20SUSANA%20%20TESIS%20.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.



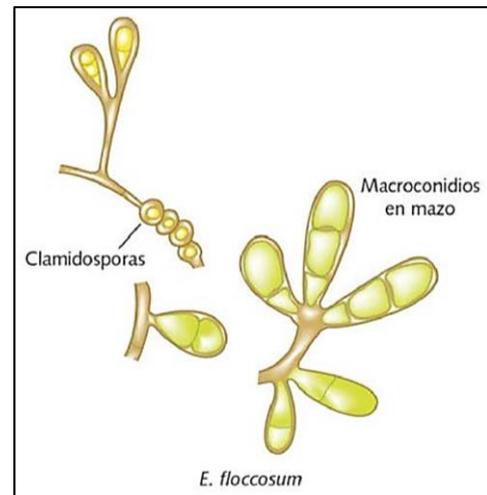
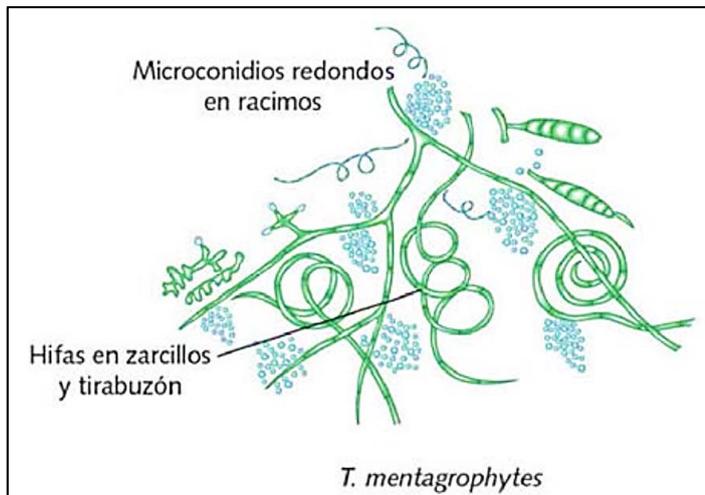
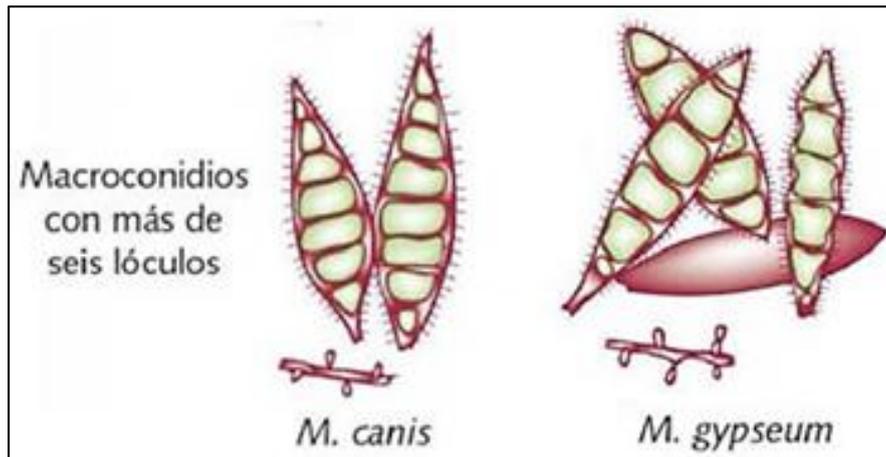
Esquema representativo de estructuras típicas de los géneros *Mucor spp.* y *Rhizopus spp.*

Extraída de: Arenas y Torres (2019).

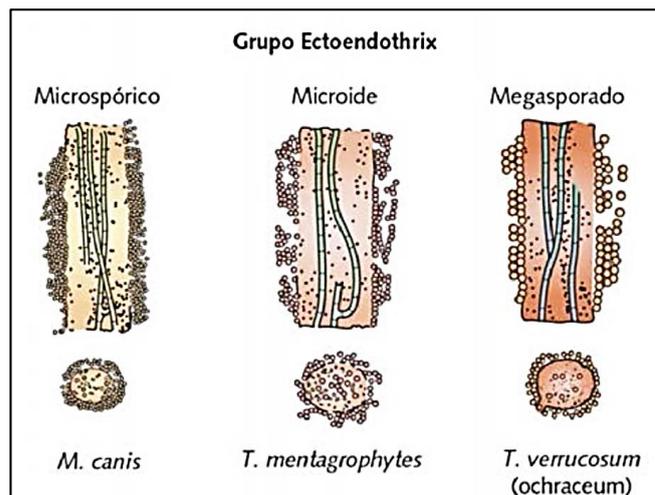
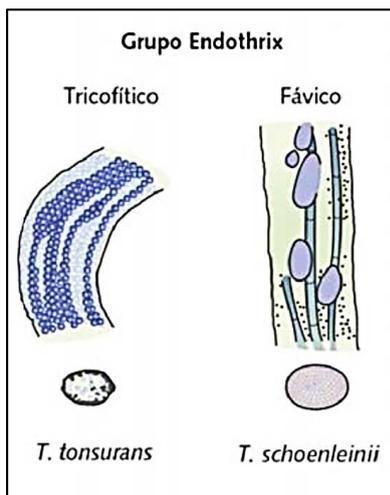


*Aspergillus sp.*

Fuente: <https://www.geyseco.es/seicat2013/comunicaciones-online/hdocs/principal.php?seccion=posters&idcomunicacion=15198>



Esquema de las diferentes macroconidias y microconidias en dermatofitos. *M. gypseum* es en la actualidad *Nannizzia gypsea*. Extraídas y modificadas de: Arenas y Torres (2019).



Patrones de invasión fúngica endothrix o ectoendothrix según la especie responsable de la infección. Extraídas de: Arenas y Torres (2019).

## ACTIVIDADES A DESARROLLAR

- Observación de materiales clínicos.
- Observación macroscópica de los cultivos realizados en los TP anteriores.
- Observación microscópica de los desarrollos y realización de distintas técnicas.
- Observación del desarrollo en microcultivo.

## BIBLIOGRAFÍA

Arenas Guzmán, R. y Torres, E. (2019). *Micología Médica Ilustrada*. Sexta Edición. Mc-Graw Hill Interamericana, ISBN: 978-607-15-1424-0.

Bonifaz, A. (2015). *Micología Médica Básica*. Quinta Edición. Mc-Graw Hill Interamericana, ISBN: 978-607-15-1270-3.

De Hoog, G.S., Guarro, J., Gené, J., Ahmed, S., Al-Hatmi, A.M.S., Figueras, M.J., Vitale, R.G. (2020). *Atlas of Clinical Fungi*. Cuarta edición. Hilversum.

Pemán, J., Martín Mazuelos, E., Rubio Calvo, M.C. (2007). *Guía práctica de identificación y diagnóstico en Micología Clínica*. Segunda edición. Revista Iberoamericana de Micología.

### Página web

Zurita Macalupú, S.R. y Urcia Ausejo, F.C. (2017). *Atlas para el diagnóstico micológico*. Ministerio de Salud, Perú. ISBN: 978-612-310-116-9.

[https://antimicrobianos.ins.gob.pe/images/contenido/documentos/nacionales/ATLAS\\_PARA\\_DX\\_MICOLOGICO\\_INS\\_PERU.pdf](https://antimicrobianos.ins.gob.pe/images/contenido/documentos/nacionales/ATLAS_PARA_DX_MICOLOGICO_INS_PERU.pdf)



**TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO Nº 5**  
**MICOSIS SUPERFICIALES**

**OBJETIVOS**

- Reconocer los principales hongos responsables de micosis superficiales.
- Obtener buenas prácticas para la toma y transporte de muestras micológicas.
- Diferenciar los agentes causales a partir de características macro y microscópicas.
- Conocer las particularidades de la Pitiriasis versicolor, así como también toma y transporte de muestras.

**INTRODUCCIÓN TEÓRICA**

Dentro de las micosis superficiales podemos encontrar las *dermatofitosis*, que causan las llamadas tiñas y las *dermatomycosis*, dentro de las cuales la Pitiriasis versicolor es la infección más relevante.

**Dermatofitosis**

Las dermatofitosis son producidas por un grupo de hongos queratófilos llamados dermatofitos. Dentro de estos microorganismos se incluyen tres géneros de hongos anamorfos: *Microsporum*, *Trichophyton* y *Epidermophyton*, los cuales se distinguen entre sí por sus conidias, especialmente por las Macroconidias específicas de cada género.

*Microsporum* y *Trichophyton* son patógenos humanos y animales, mientras que *Epidermophyton* es solo patógeno humano. La queratinofilia explica la forma de propagación de estos hongos sobre la piel, los pelos y las uñas.

Según la fuente de infección, las especies se agrupan en:

- **Zoofilicos.** Se encuentran principalmente en animales, pero pueden transmitirse a humanos. Por ejemplo, *M. canis*, *T. mentagrophytes*, etc.
- **Antropofilicos.** Se encuentran principalmente en humanos y, muy rara vez, se transmiten a animales. Por ejemplo *E. floccosum*, *T. rubrum*, entre otros.
- **Geofilicos.** Se encuentran principalmente en el suelo donde se asocian con pelo, plumas

y pezuñas en descomposición, así como otras fuentes de queratina. Infectan tanto a humanos como a animales. Aquí podemos encontrar a *Nannizzia gypsea* (*M. gypseum*). La infección usualmente comienza en un pelo incipiente o en el estrato córneo de la piel. En general, los dermatofitos no invaden el resto del pelo puesto que los nutrientes esenciales que necesitan para el crecimiento están ausentes o son limitados. Las hifas se propagan por el pelo y la piel queratinizada para culminar en el desarrollo de artrosporas infecciosas.

Los dermatofitos generan diversas formas clínicas superficiales:

- **Tiña Capitis.** Cuero cabelludo, cejas, pestañas.
- **Tiña Corporis.** Piel lampiña del tronco, cuello, brazos, piernas, dorso de las manos y pies.
- **Tiña Cruris.** Ingle, perineo, región perianal.
- **Tiña Ungium.** Uñas de pies y manos.
- **Tiña Pedis.** Planta del pie, dedos y región interdigital.
- **Tiña Barbae.** Barba y bigote.
- **Tiña Manum.** Región interdigital y palmas de las manos.

### **Dermatomicosis**

Una micosis superficial de gran frecuencia es la **Pitiriasis versicolor**, que cursa con lesiones maculosas hiper o hipopigmentadas, afectando preferentemente tronco y raíces de las extremidades, provocada por levaduras del género *Malassezia*. Dentro del género *Malassezia* se incluyen hasta siete especies lipófilas, las más frecuentes son *Malassezia globosa*, seguida de *Malassezia sympodialis* y *Malassezia furfur*. Estas levaduras sólo invaden las zonas más superficiales de la capa córnea y el infundíbulo folicular, provocando muy poca respuesta inflamatoria. *Malassezia* spp. vive normalmente como saprófito en la piel y la patología aparece cuando la levadura adquiere su forma micelial. Las temperaturas elevadas, la humedad, la piel grasa, la inmunodeficiencia, la sudoración excesiva, la mala nutrición, el embarazo y la administración de corticoides son factores que favorecen el desarrollo de la enfermedad.

Otras micosis superficiales son las piedras, que afectan el cabello, existiendo dos variedades: la **piedra negra** causada por *Piedraia hortae* y la **piedra blanca** por especies de *Trichosporon*. Estas afecciones son benignas.

## Toma de Muestra

Para optimizar la toma de muestras es necesario:

- Disponer de un protocolo de toma de muestra escrito y actualizado periódicamente.
- Tomar las muestras asépticamente, utilizando contenedores estériles, remitirlas al laboratorio antes de las 2 hs y sembrarlas lo antes posible.
- La muestra debe recogerse antes de iniciar el tratamiento y siempre de los bordes externos, activos de la lesión.
- En el caso de heridas, drenajes o lesiones superficiales, debe limpiarse la zona previamente para evitar contaminaciones.
- En situaciones que requieran un estudio epidemiológico, debe establecerse la necesidad de toma de muestra ambiental, familiar o en animales.

### Preparación Previa del/la Paciente

Es importante una buena explicación de las condiciones en las cuales debe asistir al laboratorio el/la paciente y las indicaciones dependerán de la localización de la lesión, las cuales es preferible brindárselas al/la paciente por escrito:

1. **Muestra de Uña.** No se deben cortar las uñas en los días previos. Cepillarlas y lavarlas con agua y jabón blanco todos los días durante los 3 días anteriores a la cita. Una hora antes del análisis, sumergir las uñas en agua con sal por 10 min y concurrir sin esmalte en las uñas. Si se tratara de uñas de los pies, después del lavado se colocan medias de algodón y calzado cerrado. Evitar el uso de talco.
2. **Muestra de Cuero Cabelludo.** Suspender los fármacos antifúngicos durante 10 días antes, lavar la cabeza con shampoo común o jabón blanco y no colocar ningún tipo de loción o crema durante los 2 o 3 días previos.
3. **Muestra de Piel.** Evitar el uso de lociones, cremas, talcos y cosméticos al menos 3 días antes del examen. Suspender 7 días previos al examen los antifúngicos orales que pudieran estar tomando. En el caso de los pliegues axilares no utilizar desodorante 3 días antes.

Previamente a realizar la toma de muestra, la piel, pelos o uñas deben limpiarse con etanol 70% para eliminar la flora bacteriana o exudación.

### Recolección del Material

#### **Escamas**

En las lesiones descamativas, deben recogerse las escamas de las zonas afectadas raspando su borde activo con una hoja de bisturí estéril, ya que dicho borde es el que más

probablemente contenga elementos fúngicos viables. El material obtenido se recoge entre dos portaobjetos estériles.

### ***Pelos***

Dependiendo del tipo de lesión observada, los pelos deben recogerse de la siguiente manera:

**Piedra Blanca o Piedra Negra.** Ambas están confinadas a la vaina del pelo, por lo que debe cortarse la porción suprafolicular de los pelos afectados.

**Tiñas del Cuero Cabelludo o de la Barba.** Es importante tomar los pelos parasitados arrancándolos con la raíz intacta. En muchas ocasiones los pelos parasitados se reconocen porque están rotos, friables o se desprenden fácilmente con el raspado.

**Tiñas Microspóricas.** Se reconocen por presentar una placa escamosa blanquecina con escasa o nula inflamación que puede alcanzar varios centímetros de diámetro, y en la cual se observan pelos rotos a 5-10 mm de la superficie cutánea. Estos pelos parasitados son friables y se arrancan con facilidad al raspar con el bisturí.

**Querion de Celso.** Es la forma supurativa de la tiña capitis y es común en los/las niños/as. Se presentan como lesiones elevadas, hemisféricas, de consistencia blanda, exhiben muchas pústulas foliculares y, al ser apretadas, manan pus por múltiples puntos. El diagnóstico se realiza por el examen microscópico de los cabellos (que se arrancan con gran facilidad).

**Tiñas Tricofíticas Antropofílicas.** Forman pequeñas placas escamosas con pelos de poca longitud, en forma de W o Z, situados en el espesor de la escama o bien rotos al nivel de la superficie, dando un aspecto de “puntos negros” casi siempre en ausencia de inflamación. Estos “puntos negros” son los que deben extraerse con la punta del bisturí o mediante pinzas. Los pelos situados en la placa tienen una longitud variable pudiéndose extraer con facilidad sin causar dolor al/la paciente.

**Tiña Favosa.** Presenta costras amarillentas, cóncavas y centradas por un pelo, denominadas cazoletas fávicas. Están formadas por un conglomerado de hifas que originan una foliculitis y con el tiempo, alopecia cicatricial por destrucción de la matriz. La muestra de estas lesiones debe ser tomada con ansa.

### ***Uñas***

**Onicomycosis Distal y Lateral Subungueal.** La lesión comienza por el borde libre de la uña y va extendiéndose hacia la matriz, la sustancia de la uña se sustituye por un material amarillento y friable mientras que la lámina exterior puede estar infectada o destruida. En estos casos aparecen uñas hiperqueratósicas, siendo los alicates especiales los elementos apropiados para recoger el material subungueal y cortar trozos de la parte proximal de la uña

ya que, aunque sea la menos accesible, es la que menos se contamina y presenta elementos fúngicos más jóvenes y viables.

**Onicomicosis Proximal Subungueal.** Causada por *Candida spp*, *Fusarium spp* o por recidivas de una *tiña unguium* tratada. Se observa de forma característica en pacientes con SIDA. En estos casos, se debe recoger el material blanquecino de la porción más profunda de la tabla ungueal.

**Onicomicosis Blanca Superficial.** Se manifiesta como una mancha blanca lechosa en un punto cualquiera de la superficie de la uña que se va extendiendo progresivamente. Es debida a dermatofitos (*T. mentagrophytes*, *T. rubrum*) u otros hongos miceliales (*Acremonium spp.*, *Fusarium spp.*, *Aspergillus spp.*). Sólo en este caso, se raspa la uña en la superficie afectada.

**Onicomicosis Distal y Lateral con Paroniquia Crónica.** Comienza con una inflamación del borde periungueal y termina con la afectación lateral de la lámina que aparece doblada. Aunque casi siempre es causada por *Candida spp.*, en ocasiones excepcionales algún hongo no dermatofito también puede ser el responsable. En estos casos, se recoge el material ungueal más cercano a la cutícula, raspando con el bisturí en la profundidad del surco periungueal. Con hisopo o ansa estéril se obtiene el pus de la paroniquia acompañante tras incisión con lanceta o compresión de la porción lateral del dedo.

**Onicomicosis Distrófica Total.** Corresponde al estadio final de cualquier onicomicosis. En estos casos, se debe raspar preferentemente el material subungueal.

### ***Pitiriasis Versicolor***

Se realiza por raspado de las lesiones de piel con bisturí estéril, recolectando entre 2 portaobjetos o en placa de Petri. También se puede utilizar un trozo de cinta adhesiva transparente (*Scotch tape test*). Se aplica la cara engomada sobre la lesión, se retira la cinta con la impronta y se coloca sobre un portaobjetos.

### **Transporte de Muestras Superficiales**

Las muestras de Pitiriasis versicolor y dermatofitosis deben ser transportadas entre dos portaobjetos estériles envueltos en papel o en contenedor seco estéril (placa de Petri pequeña). Se pueden almacenar a temperatura ambiente.

## Metodología Práctica

### 1) Examen Directo

#### ***Dermatofitos***

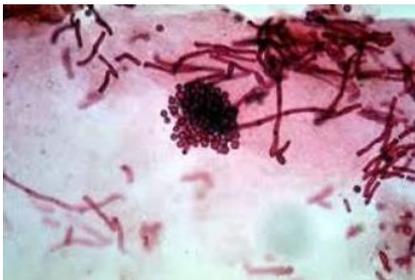
Para escamas y pelos:

- Preparar KOH 40% (40mg de KOH + 100 ml de agua destilada).
- Sobre un portaobjeto colocar la escama o el pelo y una gota de KOH.
- Colocar un portaobjeto y calentar suavemente.
- Presionar suavemente y observar a 10X y 40X.
- Reconocer las formas parasitarias en el material proporcionado (de piel y faneras).
- Observación de preparados permanentes.

#### ***Pitiriasis Versicolor***

Para el caso de muestras tomadas con cinta adhesiva, colocar una gota de colorante en el portaobjeto y dejar que pase por capilaridad.

Colorante a utilizar: Azul de metileno al 1% o tinción de Gram.



Fuente: <https://fundacionio.com/salud-io/enfermedades/malassezia-spp/>

Se observarán cúmulos o racimos de esporas gemantes ovaladas o redondeadas de 4 a 8  $\mu\text{m}$  y filamentos cortos, sinuosos en forma de "S" de 2 a 4  $\mu\text{m}$ , en ocasiones son largos y ramificados.

Reconocer en el examen microscópico directo de escamas la forma parasitaria del agente etiológico de la Pitiriasis.

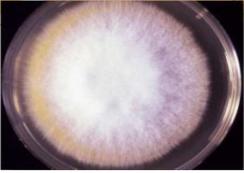
### 2) Cultivos

Medios de cultivo para hongos: Sabouraud, Agar papa dextrosa, Lactrimel, fraccionados en tubos en pico de flauta con el agregado de antibióticos, por ejemplo, la mezcla antibiótica que se preparó en el TP N° 2.

En 2 o 3 tubos con medio de cultivo sembrar las escamas con un ansa en gancho. Se esteriliza a la llama y se enfría en el fondo del tubo para que el medio de cultivo sirva de adherencia, se toman las escamas y se siembran haciendo pequeños toques en el agar. Incubar a 25-28°C en estufa durante 10 a 15 días. Si se sospecha de *Trichophyton verrucosum*, se colocan 2 tubos más a 37°C.

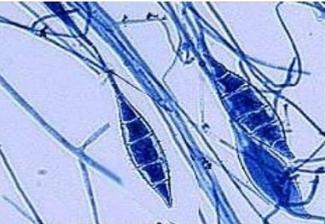
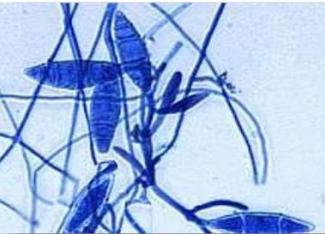
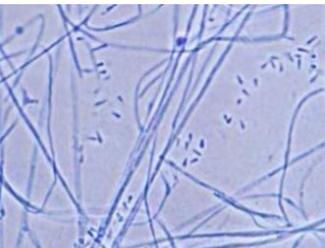
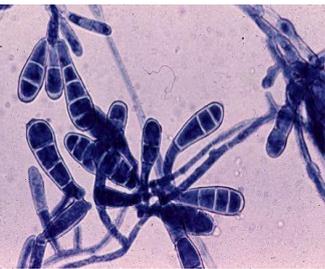
### Interpretación de Resultados

**Observación Macroscópica.** Conocer las características macromorfológicas típicas (aspecto, color, superficie, etc.).

Agar Sabouraud	<i>Descripción de la colonia</i>
	<p><b><i>Microsporium canis</i></b>: Colonias con micelio aéreo algodonoso que va del color crema a carne con coloración amarillenta en los bordes.  <u>Reverso</u>: Anaranjado                      Fuente: <a href="https://photos1.blogger.com/blogger/5595/1485/1600/colonia%20micresporum1.jpg">https://photos1.blogger.com/blogger/5595/1485/1600/colonia%20micresporum1.jpg</a></p>
	<p><b><i>Nannizzia gypsea</i> (M. gypseum)</b>: Colonia granulosa de color marrón canela y de aspecto estrellado, bordes blanquecinos.  <u>Reverso</u>: Marrón                      Fuente: <a href="https://atlas.sund.ku.dk/microatlas/veterinary/fungus/Microsporium_gypseum/">https://atlas.sund.ku.dk/microatlas/veterinary/fungus/Microsporium_gypseum/</a></p>
	<p><b><i>Trichophyton mentagrophytes</i></b>: Colonia granulosa poco prominente, de color amarillo pálido y bordes blanquecinos.  <u>Reverso</u>: En ocasiones puede producir pigmentos rojo- anaranjados.                      Fuente: <a href="https://colombia.inaturalist.org/photos/35012158">https://colombia.inaturalist.org/photos/35012158</a></p>
	<p><b><i>Trichophyton rubrum</i></b>: Colonias vellosas, prominentes, abundantes, de color blanquecino, con bordes más claros. <u>Reverso</u>: Pigmento rojo vinoso oscuro característico de esta especie.                      Fuente: <a href="https://archiv.ub.uni-marburg.de/diss/z2008/0862/pdf/duw.pdf">https://archiv.ub.uni-marburg.de/diss/z2008/0862/pdf/duw.pdf</a></p>
	<p><b><i>Malassezia furfur</i></b>: Colonias cremosas, pequeñas de color beige (Agar Sabouraud con antibióticos Cloranfenicol-Actidione).                      Fuente: <a href="https://fundacionio.com/salud-io/enfermedades/malassezia-spp/">https://fundacionio.com/salud-io/enfermedades/malassezia-spp/</a></p>

### Observación Microscópica

- Colocar una gota de azul de lactofenol en un portaobjeto.
- Con ayuda de un ansa estéril depositar la muestra y colocar un cubreobjetos.
- Observar a 10X y 40X y describir micromorfológicamente.

Microscopía	Características
	<p><b>Microsporum canis:</b> Macroconidias fusiformes, divididas delgadas de pared gruesa y rugosa, extremos puntiagudos ligeramente curvados hacia un lado.</p> <p>Fuente: <a href="https://co.pinterest.com/pin/32580797288567733/">https://co.pinterest.com/pin/32580797288567733/</a></p>
	<p><b>Nannizzia gypsea (M. gypseum):</b> Macroconidias fusiformes, de pared delgada y rugosa y extremo redondeado.</p> <p>Fuente: <a href="https://fauzanhertrisnof.wordpress.com/2012/01/14/jamur-pada-kulit-dermatofit-dan-non-dermatofit/microsporum-gypseum/">https://fauzanhertrisnof.wordpress.com/2012/01/14/jamur-pada-kulit-dermatofit-dan-non-dermatofit/microsporum-gypseum/</a></p>
	<p><b>Trichophyton mentagrophytes:</b> Escasas macroconidas alargadas en forma de lápiz, con paredes lisas. Microconidas redondas u ovals, frecuentemente en grupos, algunas hifas en forma de espiral.</p> <p>Fuente: The Geraldine Kaminski Medical Mycology Library. Ellis D. and Hermanis R. Copyright © 2003 Doctorfungus Corporation.</p>
	<p><b>Trichophyton rubrum:</b> Microconidas en forma de lágrima ubicadas lateralmente a las hifas.</p> <p>Fuente: The Geraldine Kaminski Medical Mycology Library. Ellis D. and Hermanis R. Copyright © 2003 Doctorfungus Corporation.</p>
	<p><b>Epidermophyton floccosum:</b> Macroconidias de paredes delgadas, en forma de mazo o clava con un extremo redondeado. No hay microconidias.</p> <p>Fuente: <a href="https://botit.botany.wisc.edu/toms_fungi/images/eflocco.jpg">https://botit.botany.wisc.edu/toms_fungi/images/eflocco.jpg</a></p>

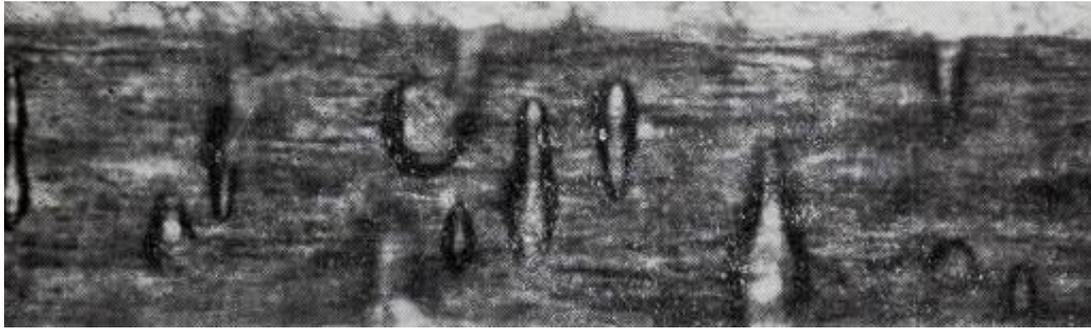
## Otras Pruebas para Dermatofitos

### 1) Producción de Órganos Perforadores

**Preparación.** Se colocan cabellos de 1 cm de longitud en una placa de Petri y se esterilizan por autoclave (121°C, 10 min). Se agregan 25 ml de agua destilada estéril y de 2 a 3 gotas de extracto de levadura al 10% estéril.

Se inoculan las placas con el medio de cultivo que contiene al dermatofito y se observa la presencia de órganos perforadores con ayuda de un microscopio y por colorear con azul de

lactofenol, entibiando ligeramente entre porta y cubre. Se realiza con intervalos de 4 semanas.



Fuente: <https://revista.svderma.org/index.php/ojs/article/download/1283/1259>

### Interpretación de Resultados.

**Positivo.** *T. interdigitale*, *E. floccusum*, *Microsporum* spp.

**Negativo.** *T. rubrum*, *T. verrucosum*, *T. schoenleinii*, *T. tonsurans*.

## 2) Medio de Agar Urea de Christensen

### Preparación del Medio.

- Agregar Peptona 1 g, Glucosa 1 g, NaCl 5 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g, Rojo de Fenol 12 g, Agar 20 g y agua destilada 900 ml. Se calienta hasta disolución total.
- Esterilizar en autoclave 121°C durante 15 min.
- Enfriar a 50°C y agregar 100 ml de Urea al 20 % en agua destilada y esterilizada por filtración.
- Alicuotar en tubos de hemólisis estériles inclinados.

### Interpretación de Resultados.

**Ureasa positiva.** *T. interdigitale*, *T. mentagrophytes*, *Microsporum* spp.

**Ureasa negativo.** *T. rubrum*, *T. verrucosum*

**Ureasa variable.** *T. schoenleinii*, *T. tonsurans*

#### En resumen:

El diagnóstico micológico correcto de las micosis superficiales exige:

- ✓ Obtención adecuada de la muestra
- ✓ Transporte apropiado
- ✓ Rigor en la interpretación del examen directo
- ✓ Elección de medios de cultivo adecuados
- ✓ Identificación de la especie fúngica
- ✓ Valoración/interpretación correcta de los cultivos positivos

## ACTIVIDADES A DESARROLLAR

- Observación de materiales clínicos.
- Observación macroscópica de los cultivos.
- Observación microscópica de los cultivos, con particular atención en las diferentes macroconidias y microconidias según el género.

## BIBLIOGRAFIA

Arenas Guzmán, R. y Torres, E. (2019). *Micología Médica Ilustrada*. Sexta Edición. Mc-Graw Hill Interamericana, ISBN: 978-607-15-1424-0.

De Hoog, G.S., Dukik, K., Monod, M., Packeu, A., Stubbe, D., Hendrickx, M., Kupsch, C., Stielow, J.B., Freeke, J., Göker, M., Rezaei-Matehkolaei, A., Mirhendi, H., Gräser, Y. (2017). *Toward a novel multilocus phylogenetic taxonomy for the dermatophytes*. *Mycopathologia*, 182, 5-31.

Perrone, M.C. (2008). *Manual de toma, transporte y conservación de muestras*. Red de Micología.

Sandoval, N.J. y Arenas, R. (2012). *Diagnóstico y Tratamiento de Dermatofitos y Pitiriasis Versicolor*. Revisión Bibliográfica. Revista Médica HONDUR, Vol. 80, N°2.

### Página web

Zurita Macalupú, S.R. y Urcia Ausejo, F.C. (2017). *Atlas para el diagnóstico micológico*. Ministerio de Salud, Perú. ISBN: 978-612-310-116-9.

[https://antimicrobianos.ins.gob.pe/images/contenido/documentos/nacionales/ATLAS PARA DX MICOLOGICO INS PERU.pdf](https://antimicrobianos.ins.gob.pe/images/contenido/documentos/nacionales/ATLAS_PARA_DX_MICOLOGICO_INS_PERU.pdf)



## TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO Nº 6 IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS DE INTERÉS MÉDICO

### OBJETIVOS

- Adquirir el criterio adecuado para la confección de esquemas mínimos de identificación de levaduras de interés médico.
- Describir las características observadas del crecimiento de las levaduras en medios líquidos.

### INTRODUCCIÓN TEÓRICA

Cuando se observa el desarrollo de una colonia sobre cualquiera de los tubos del primocultivo, se procede a identificar el aislamiento. La identificación de las levaduras puede variar desde unos pocos test simples, para identificación presuntiva del complejo *Candida albicans* (*C. albicans sensu stricto*/*C. dubliniensis*) y de *Cryptococcus neoformans/gattii*, a una gran variedad de pruebas necesarias para identificar a todas las levaduras comúnmente aisladas en los laboratorios de Micología. El primer paso en el estudio de una cepa es la obtención de un cultivo puro a partir del cual se puedan iniciar los estudios sistemáticos de sus características morfológicas, fisiológicas y sexuales bajo condiciones estandarizadas. Si no se ha comprobado la pureza de una cepa y los estudios morfológicos, fisiológicos y sexuales no se han realizado en condiciones debidamente estandarizadas, es imposible identificarla o describirla con certeza. A continuación, se enumeran las principales pruebas diferenciales para la identificación de levaduras por el método de referencia. Se subrayan aquellas que se consideran posibles de realizar en todo laboratorio hospitalario a fin de arribar a la identificación presuntiva del complejo *C. albicans* y de *Cryptococcus neoformans/gattii*. Las pruebas sin subrayar requieren mayor infraestructura, son onerosas, y se centralizan en laboratorios de referencia. Estos test pueden ser subdivididos en dos categorías: los usados para identificación presuntiva y los confirmatorios.

1. Prueba de formación de tubo germinativo por el complejo *Candida albicans*.
2. Prueba de formación de Clamidosporas por el complejo *Candida albicans*.
3. Agar semillas de girasol para diferenciación de *C. neoformans/gattii*.

4. Prueba de la producción de ureasa para el género *Cryptococcus*.
5. Crecimiento a 28°C y 37°C.
6. Crecimiento en extracto de malta o agar leche para estudio micromorfológico.
7. Cultivo en lámina en agar morfología (Difco) para estudio micromorfológico.
8. Crecimiento en agar morfología (Difco) para macromorfología.
9. Ensayo de asimilación de Glucosa, Galactosa, L-Sorbosa, Celobiosa, Trehalosa, Sacarosa, Maltosa, Lactosa, Melibiosa, Rafinosa, Melezitosa, D- Xilosa, L-arabinosa, D-ribosa, D-manitol, ácido cítrico, eritritol y m-Inositol.
10. Ensayo de asimilación de nitrato de potasio y peptona.
11. Ensayo de fermentación de Glucosa, Sacarosa, Galactosa, Maltosa, Trehalosa y Lactosa.
12. Crecimiento en medio libre de vitaminas.
13. Producción de ascosporas.
14. Tinta China para revelar la cápsula de *Cryptococcus neoformans/gattii*.

### **Producción de Tubo Germinativo**

Esta prueba es considerada hasta el presente como la más confiable para identificar presuntivamente al complejo *C. albicans*, tiene una exactitud del 95%-100% cuando se compara con la identificación definitiva.

**Procedimiento.** Hacer una suspensión ligera (100.000 a 1.000.000 de células/ml) de un cultivo de 24 hs de la cepa en estudio en 0,5 ml de suero humano. La suspensión puede hacerse tocando la superficie de una colonia con la punta de una pipeta Pasteur estéril y luego emulsionando suavemente las células adheridas a la pipeta en el suero.

Incubar a 37°C y observar microscópicamente cada media hora, hasta las tres horas. Es necesario inocular simultáneamente un testigo positivo (alguna especie del complejo *C. albicans*) y uno negativo [como *Meyerozyma guilliermondii* (*C. guilliermondii*) u otro].

**Interpretación.** El tubo germinativo se ve como una proyección filamentosa delgada que no presenta constricción en el punto de origen. Esto es característico del complejo *C. albicans*, lo que lo diferencia de otras levaduras que también forman tubo germinativo, pero presentan constricción.



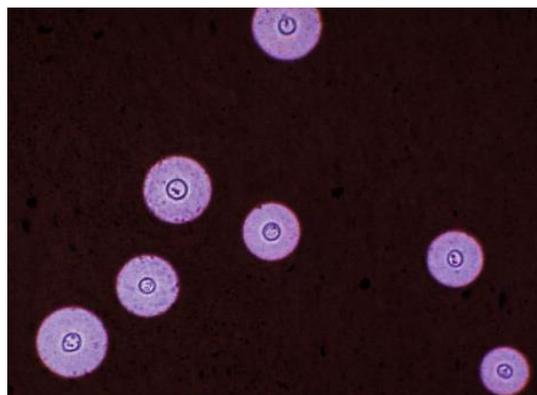
Tubo germinativo positivo. Fuente: <https://www.mundoecologia.com.br/natureza/o-que-e-um-tubo-germinativo-como-e-sua-formacao/>

### Coloración con Tinta China

Se realiza para detectar *C. neoformans/gattii* en las muestras de LCR y fluidos corporales. También es útil para estudiar cepas recuperadas de muestras clínicas cuando se sospecha *C. neoformans*.

**Procedimiento.** Colocar una gota del LCR u otro fluido corporal sobre un portaobjetos limpio. Agregar sobre la muestra una gota de tinta china diluida con agua destilada estéril 1:1, homogeneizar (si es necesario), y colocar un cubreobjetos. Observar rápidamente al microscopio con objetivos de bajo y mediano aumento (10X y 40X).

**Interpretación.** El ensayo es positivo si se observan levaduras de 4-20 micrones, rodeadas por un halo claro entre la levadura y la tinta china (cápsula).



Extraída y modificada de: <https://drfungus.org/knowledge-base/cryptococcosis/>

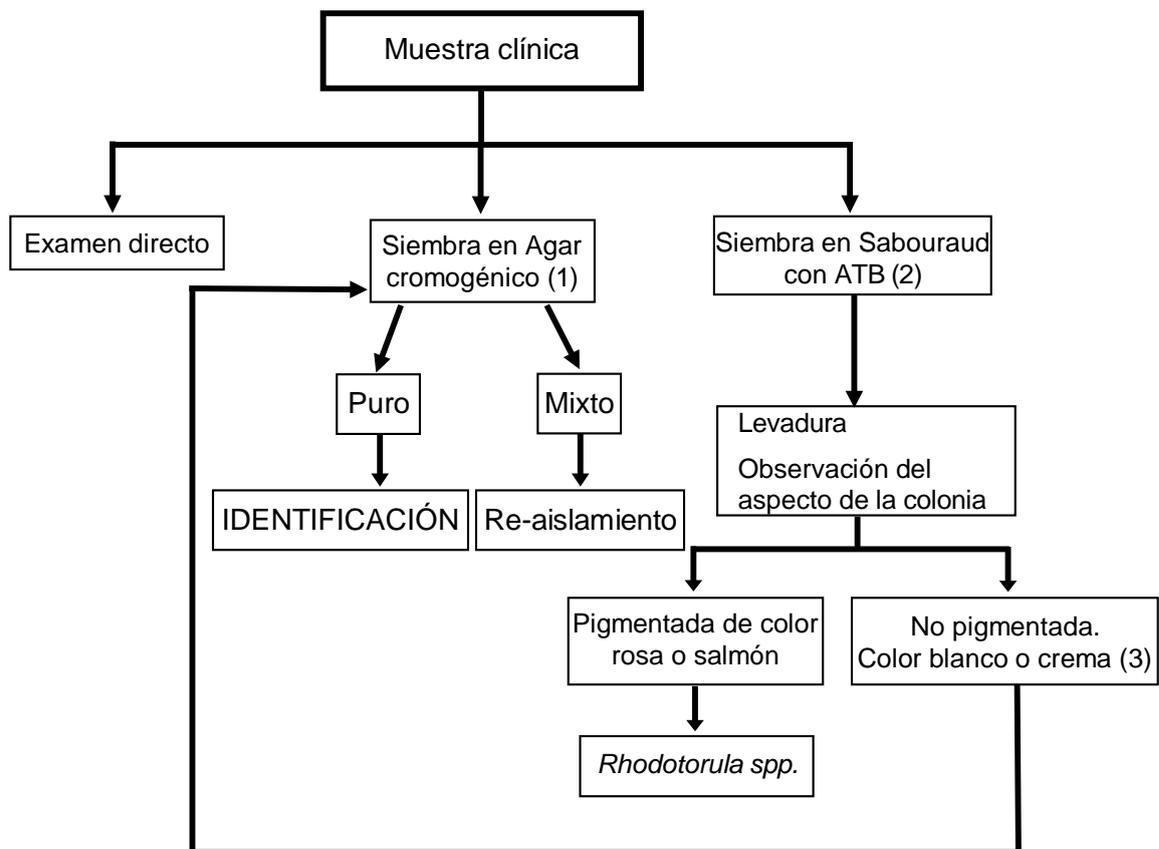
A raíz de la dificultad que presenta la identificación de levaduras diferentes del complejo *C. albicans* y *C. neoformans/gattii* en los laboratorios de microbiología general de los centros de salud, se propone un algoritmo de identificación presuntiva con la intención de brindar ayuda al momento de arribar a la identificación fenotípica. Las metodologías propuestas sólo permitirán una identificación presuntiva de los aislamientos, por lo tanto, es

Año 2024 45

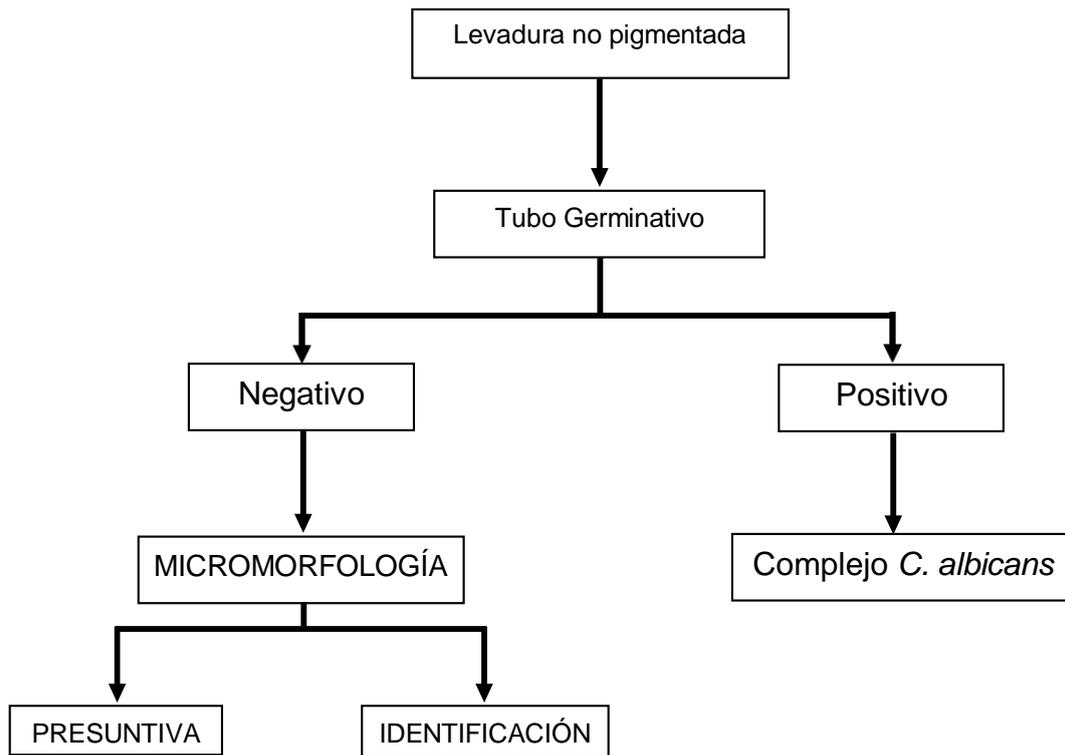
necesario completar el esquema de identificación mediante la realización de metodología estándar, o bien derivando a los Centros de Referencia.

A continuación, se adjuntan el algoritmo de identificación presuntiva y las características micromorfológicas más importantes de las especies de levaduras de aislamiento más frecuente en los laboratorios de rutina. Se adjuntan, además, los procedimientos de laboratorio y los medios de cultivo que sugerimos que se utilicen para realizar la identificación presuntiva de los aislamientos de levaduras.

### Algoritmo de Identificación Presuntiva de Levaduras



- (1) Siembra del primocultivo en un agar cromogénico (con antibiótico) que permite en 24 hs la visualización de las colonias puras, la detección de una infección mixta de levaduras y la identificación presuntiva del complejo *C. albicans* ( $\beta$ -hexosaminidasa), *Pichia kudriavzevii* (*C. krusei*) (fosfatasa alcalina) y *C. tropicalis* (ambas enzimas).
- (2) Es conveniente realizar una observación de las colonias obtenidas para asegurarse que el cultivo esté libre de bacterias.
- (3) Colonias de aspecto y consistencia mucoide sugiere la formación de cápsula y puede ser indicio de *Cryptococcus*.



### Micromorfología

Esta observación se debe realizar siempre, ya sea para la identificación presuntiva como para la identificación definitiva.

- Se puede realizar en extracto de malta líquido, donde observará fundamentalmente las principales estructuras que caracterizan a la reproducción vegetativa: blastoconidias, artroconidias, pseudomicelio y el tipo de brotación: monopolar, multipolar o fisión.
- Se puede realizar en agar harina de maíz (AHM), que permite la observación de la disposición de las estructuras y, en el caso del complejo *C. albicans*, se puede ver la formación de clamidoconidias.

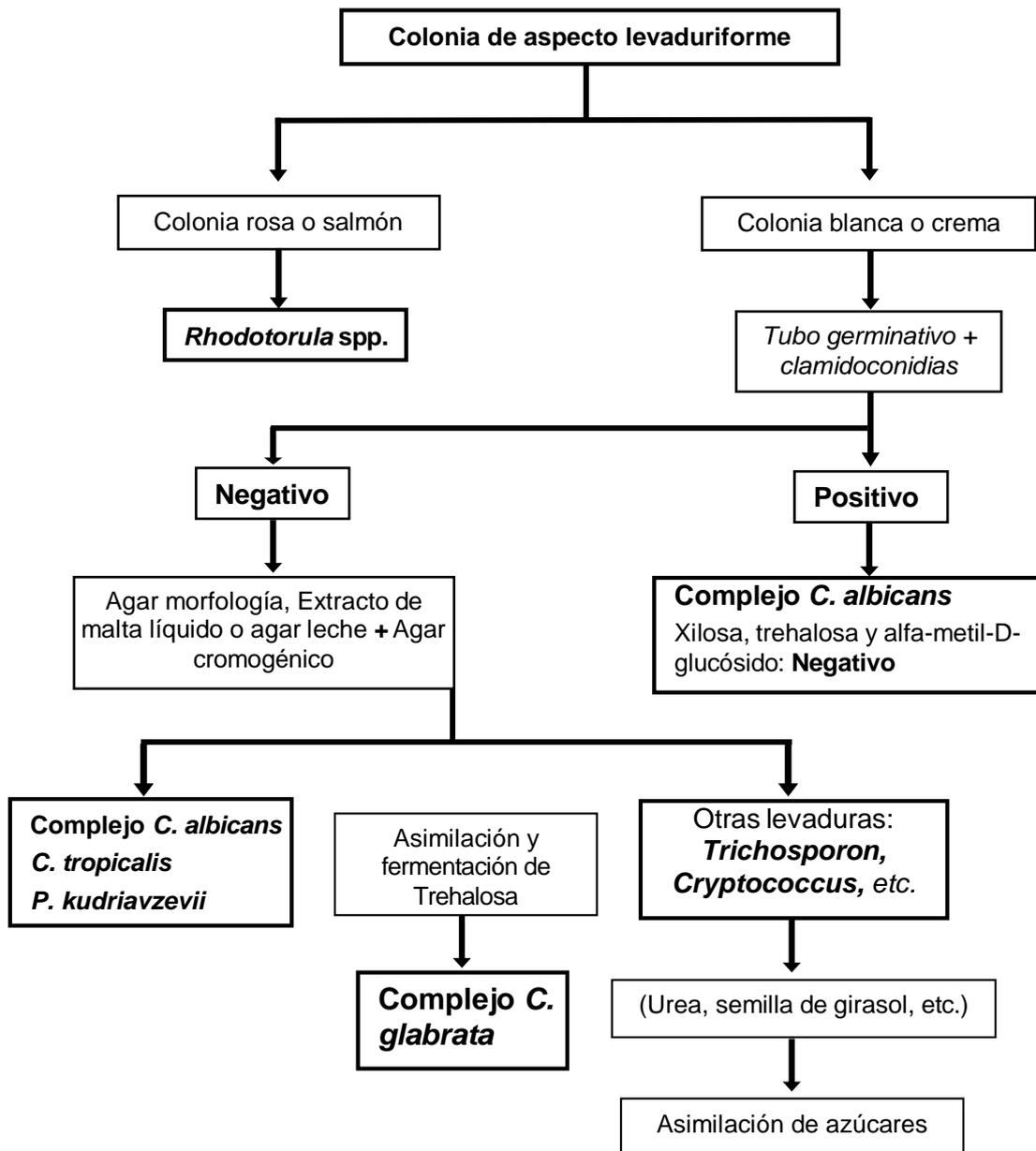
### Identificación Presuntiva

Además de las características macro y micromorfológicas, para la identificación presuntiva pueden realizarse otras pruebas:

- Siembra en agar cromogénico, especialmente CHROMagar™ Candida, que permite identificar: complejo *C. albicans*, *C. tropicalis* y *P. kudriavzevii* (*C. krusei*).
- Prueba de ureasa: Se deben incluir un control positivo (*C. neoformans/gattii*) y uno negativo (complejo *C. albicans*).
- Agar semillas de girasol: Detección de la actividad de la enzima fenoloxidasas presente en el género *Cryptococcus*, generando un compuesto de color marrón.
- Asimilación de trehalosa.

- Disco de fluconazol de 25 µg.
- Medio canavanina-glicina-azul de bromotimol (medio CGB): Diferenciación entre *C. neoformans* y *C. gattii*. Fundamento: *C. gattii* es resistente a la L-canavanina, con lo que al degradarlo libera amonio. Este compuesto eleva el pH de 5,8 a 7 (o más) virando el color del medio de amarillo verdoso a azul de cobalto por la presencia de azul de bromotimol. Con respecto a *C. neoformans*, es incapaz de asimilar la glicina presente en el medio y la L-canavanina inhibe su crecimiento, con lo que no se observan cambios en el color del medio de cultivo.

Levadura	Micromorfología	CHROMagar™	Trehalosa	Urea	Fluconazol
<b>Complejo <i>C. albicans</i></b>	Pseudomicelio con blastoconidias agrupadas, clamidoconidias	Verde	Negativo	Negativo	----
<b><i>C. tropicalis</i></b>	Pseudomicelio largo y ramificado, blastoconidias dispuestas a lo largo	Azul	Positivo (+ de 3 hs)	Negativo	----
<b>Complejo <i>C. parapsilosis</i></b>	Pseudomicelio corto, ramificado, blastoconidias ovoides	Crema (ND)	Negativo	Negativo	----
<b><i>P. kudriavzevii</i> (<i>C. krusei</i>)</b>	Células alargadas (en forma de habano) con blastoconidias terminales	Rosa seca	Negativo	Positivo (débil)	Confirma con halo < 14 mm
<b>Complejo <i>C. glabrata</i></b>	Blastoconidias muy pequeñas sin pseudomicelio	Rosa, crema (ND)	Positivo (a partir de las 2 hs)	Negativo	----
<b><i>Meyerozyma guilliermondii</i> (<i>C. guilliermondii</i>)</b>	Blastoconidias muy pequeñas con pseudomicelio rudimentario (escaso)	(ND)	Negativo	Negativo	----
<b><i>Cryptococcus neoformans/gattii</i></b>	Levaduras redondas brotantes	(ND)	Negativo	Positivo	----
<b><i>Trichosporon beigelii</i></b>	Blastoartroconidias, Clamidoconidias intercalares	Azul violáceo	Negativo	Positivo	----
*ND: No se distingue por color.					



## Identificación Definitiva de Levaduras

### Métodos Comerciales

La laboriosidad y el alto costo que representa realizar el método convencional de identificación de levaduras han llevado a la elaboración de métodos comerciales cada vez más eficaces y rápidos, los cuales permiten identificar un elevado porcentaje de las levaduras de interés en infecciones hospitalarias. Esta metodología permite que la mayoría de los hospitales especializados puedan tener acceso a la identificación de levaduras al nivel de especie, obteniéndose un resultado altamente confiable en la mayoría de los casos. Los métodos que existen actualmente en el mercado son los siguientes:

- ID 32C (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France)

- API 20C Aux system (bioMérieux Vitek Inc., Hazelwood, Mo.)
- VITEK YBC system (bioMérieux-Vitek)
- VITEK 2 System
- Fungichrom® I
- AuxaColor 2
- RapID Yeast Plus system
- MALDI-TOF MS

**ID 32C (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France).** El equipo consiste en una tira de plástico descartable con 32 pocillos, los cuales contienen 29 sustratos deshidratados para pruebas de asimilación (carbohidratos, ácidos orgánicos y aminoácidos), una prueba de sensibilidad a cicloheximida, una prueba colorimétrica para determinar hidrólisis de la esculina y un control negativo. El procedimiento se realiza según las indicaciones del fabricante, pudiéndose obtener resultados a las 48 hs de incubación a 30°C. La lectura se realiza visualmente y el crecimiento se determina por presencia de turbidez en el pocillo correspondiente. Los resultados se convierten en un biocódigo numérico de 8 dígitos que permite la identificación a través de un manual de códigos (ID 32C, índice analítico de perfiles). La identificación requiere de la observación micromorfológica. Este método es el más comúnmente utilizado por los países europeos. Permite identificar el 92% de los aislamientos comunes y el 85 % de los aislamientos menos frecuentes. Entre las especies que no pudieron ser identificadas se encuentran: *C. albicans*, *Meyerozyma guilliermondii* (*C. guilliermondii*), *C. neoformans/gattii*, *Rhodotorula spp.* y *Saccharomyces cerevisiae*. Este sistema permite una mejor identificación de cepas atípicas.

**API 20C Aux system (bioMérieux Vitek Inc., Hazelwood, Mo.).** El equipo consiste en una tira de plástico descartable con 20 pocillos, los cuales contienen 20 sustratos deshidratados para pruebas de asimilación. El procedimiento se realiza según las indicaciones del fabricante pudiéndose obtener resultados a las 72 hs de incubación a 30°C. La lectura se realiza visualmente y el crecimiento se determina por presencia de turbidez en el pocillo correspondiente. Los resultados se convierten en un biocódigo numérico de 7 dígitos, el cual permite la identificación a través de un manual de códigos (API 20C, índice analítico de perfiles). La identificación requiere la observación micromorfológica y, a veces, pruebas suplementarias como utilización de KNO<sub>3</sub>, crecimiento a 42°C y producción de ureasa. Este es el sistema más utilizado en EE.UU. y permite identificar el 97% de los aislamientos comunes y un 88% de los menos comunes. Entre las especies que no pueden ser identificadas se encuentran: *C. albicans*, *Meyerozyma guilliermondii* (*C. guilliermondii*) y *P. kudriavzevii* (*C. krusei*).

**VITEK YBC system (bioMérieux-Vitek).** El equipo consiste en una tira de plástico descartable con 30 pocillos, los cuales contienen 26 sustratos deshidratados para pruebas de asimilación y 4 controles negativos. El procedimiento se realiza según indicaciones del fabricante, pudiéndose obtener resultados a las 24-48 hs de incubación a 30°C. La lectura se realiza a través de un sistema computarizado. La identificación requiere la observación micromorfológica. Este sistema permite identificar alrededor del 89% de los aislamientos, sin embargo, este porcentaje varía según las especies estudiadas. Entre las especies cuya identificación puede ser errónea o pueden no ser identificadas, se encuentran: *C. tropicalis*, *P. kudriavzevii* (*C. krusei*), *C. rugosa*, *C. zeylanoides*, *C. neoformans/gattii*, entre otras. Este método posee la ventaja de que puede identificar presuntivamente *C. dubliniensis*, especie morfológicamente similar a *C. albicans* que presenta dificultades al momento de diferenciarlas.

**VITEK 2 YST-ID System (Sistema Automatizado para Identificación y Sensibilidad a Antifúngicos).** Puede identificar especies de levaduras luego de las 15 hs a través de una técnica muy sensible basada en fluorescencia. YST-ID comprende 47 reacciones bioquímicas e incluye nuevas especies descritas. El método permite identificar el 92% de las cepas probadas, sin embargo, el 6,2% no puede ser identificado [*C. inconspicua*, *C. glabrata*, *P. kudriavzevii* (*C. krusei*), *C. norvegensis*, *C. parapsilosis*] y el 1,7% es erróneamente identificada [*C. kefir*, *P. kudriavzevii* (*C. krusei*), *S. cerevisiae*].

**FUNGICHROM® I.** Es un equipo que basa la identificación de levaduras en la presencia o ausencia de ciertas enzimas, que se visualiza mediante reacciones colorimétricas. La actividad enzimática se revela con 3 tipos de reacciones:

1. Hidrólisis de sustratos cromogénicos.
2. Asimilación de sustratos naturales: utilización de GAL; SAC, TRE, MAL, CEL, RAF, LAC; resistencia a la cicloheximida e hidrólisis de urea.
3. Oxidación de sustratos sintéticos (fenoloxidasas).

El equipo consiste en una tira de plástico descartable con 16 pocillos, los cuales contienen los sustratos. Se prepara un inóculo a partir de un cultivo de 24 hs y se siembran dos gotas en cada una de las celdas, se incuba 24 o 48 hs a 30°C y, simultáneamente, se debe realizar el examen macro y microscópico de las colonias con lo que la sensibilidad aumenta a 91%.

**AuxaColor 2 (Bio-Rad).** Prueba colorimétrica de asimilación de azúcares para la identificación de las 33 especies de levaduras que se aíslan con mayor frecuencia en la clínica. El crecimiento de las levaduras se visualiza mediante el cambio de color de un indicador de pH. Este kit también incluye tres pruebas enzimáticas, una de las cuales indica la actividad fenoloxidasas del género *Cryptococcus*.

**RapID Yeast Plus system (Thermo Scientific™).** Es un sistema compuesto por un panel de 18 pocillos impregnados. Cada panel contiene un sustrato convencional o

cromogénico que detecta la asimilación de carbohidratos, ácidos orgánicos o aminoácidos, así como la hidrólisis de urea y ácidos grasos. Permite identificar hasta 43 especies de levaduras. Se obtienen resultados luego de 4 hs de incubación, donde se examina cada cavidad para conocer la reactividad anotando la aparición de color. El patrón resultante de las puntuaciones positivas y negativas se utiliza para la identificación de la cepa aislada mediante la comparación de los resultados con patrones de reactividad conocidos.

**MALDI-TOF MS.** La técnica de MALDI-TOF MS (del inglés, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry*) es una técnica de espectrometría de masas que permite la identificación definitiva a través de la generación de perfiles de masa molecular que se usan como una huella digital. Estas masas moleculares específicas son constituidas principalmente por proteínas ribosomales, pero pueden utilizarse otros componentes fúngicos. Permite la identificación a nivel de especie de hongos levaduriformes como complejo *C. albicans*, complejo *C. parapsilosis*, complejo *C. glabrata*, entre otros.

## ACTIVIDADES A DESARROLLAR

- Prueba de formación de tubo germinativo y coloración con Tinta China.
- Observación macroscópica de diversas levaduras. Diferenciación por CHROMagar™ *Candida*.
- Observación microscópica de cultivos levaduriformes.
- Observación e interpretación de resultados de los diversos métodos comerciales.

## BIBLIOGRAFÍA

- Arenas Guzmán, R. y Torres, E. (2019). *Micología Médica Ilustrada*. Sexta Edición. Mc-Graw Hill Interamericana, ISBN: 978-607-15-1424-0.
- Coleman, D., Rinaldi, M., Haynes, K., Rex, J., Summerbell, R., Anaissie, E., Li, A., Sullivan, D. (1998). *Importance of Candida species other than Candida albicans as opportunistic pathogens*. *Med Mycol* 36: 156-165.
- De Hoog, G.S., Guarro, J., Gené, J., Ahmed, S., Al-Hatmi, A.M.S., Figueras, M.J., Vitale, R.G. (2020). *Atlas of Clinical Fungi*. Cuarta edición. Hilversum.
- Mendoza, M. (2005). *Importancia de la identificación de levaduras*. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 25: 103-117.

- Panizo, M., Reviákina, V., Dolande, M., Maldonado, B. (2002). *Aislamiento de levaduras en muestras clínicas*. Rev Soc Ven Microbiol, 22: 57-63.
- Pemán, J., Martín Mazuelos, E., Rubio Calvo, M.C. (2007). *Guía práctica de identificación y diagnóstico en Micología Clínica*. 2ª edición. Revista Iberoamericana de Micología.
- Pérez, C., Hernández, Y., Colella, M. T., Roselló, A., Hartung de Capriles, C., Olaizola, C., Magaldi, S., Mata-Essayag, S. (2003). *Identificación de Cryptococcus neoformans var. gattii mediante el uso del medio canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB)*. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 23(2), 158-162.

### Páginas web

- Riera, F., Celi, A.P., Thompson, L., Rabagliati, R. (2020). *Infecciones fúngicas sistémicas*. 3era edición. Asociación Panamericana de Infectología. Recuperado el 04 de septiembre de 2023.



[http://circulomedicocba.org/wp-content/uploads/2020/02/Manual-de-Micologia-3ra-edicion\\_final.pdf](http://circulomedicocba.org/wp-content/uploads/2020/02/Manual-de-Micologia-3ra-edicion_final.pdf)

- Zurita Macalupú, S.R. y Urcia Ausejo, F.C. (2017). *Manual de procedimientos técnicos para el diagnóstico micológico*. Ministerio de Salud, Perú. ISBN: 978-612-310-094-0. Recuperado el 04 de septiembre de 2023.



[https://antimicrobianos.ins.gob.pe/images/contenido/documentos/nacionales/MANUAL\\_DE\\_PROCEDIMIENTOS\\_MICOLOGICOS\\_INS\\_PERU.pdf](https://antimicrobianos.ins.gob.pe/images/contenido/documentos/nacionales/MANUAL_DE_PROCEDIMIENTOS_MICOLOGICOS_INS_PERU.pdf)

## TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO Nº 7

### ASPERGILOSIS

#### OBJETIVOS

- Describir la macromorfología de colonias observando preparados coloreados y en fresco.
- Observar la micromorfología y poder diferenciar diferentes especies de *Aspergillus* de interés clínico.

#### INTRODUCCIÓN TEÓRICA

Entre los hongos considerados oportunistas se encuentran las especies del género *Aspergillus*, que crecen en importancia desde 1729 cuando fue descrita la primera patología humana. Presentan una gran versatilidad metabólica y una gran capacidad para dispersar sus conidias dado que su cabeza conidial puede producir más de 500.000 conidias.

Al género *Aspergillus* pertenecen aproximadamente 900 especies, cuyos conidias son inhaladas en forma permanente por el ser humano. Este es uno de los hongos más frecuentemente hallados en el ambiente, pudiendo aislarlo de cualquier sustrato que contenga materia orgánica y humedad, como suelo y vegetales en descomposición, por lo tanto, puede afectar nuestro bienestar de diferentes formas:

- Patógeno humano y animal
- Producción de micotoxinas
- Contaminación de cultivos
- Disminución del valor comercial de productos alimenticios, cueros y tejidos

A pesar de su ubicuidad, sólo unas pocas especies están relacionadas con patologías en el ser humano, independientemente del sexo, género, edad, etc.:

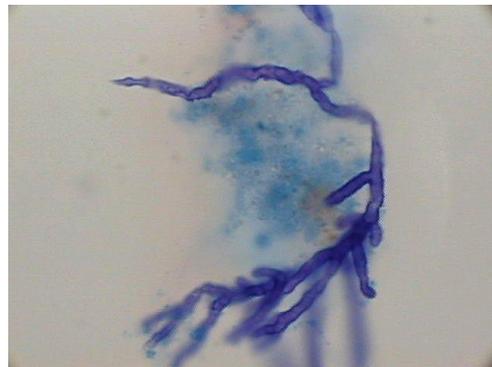
*Aspergillus* sección *Fumigati*, *Aspergillus* sección *Flavi*, *Aspergillus* sección *Nigri*, *Aspergillus* sección *Nidulantes*, *Aspergillus* sección *Terrei*.

## Diagnóstico de Laboratorio

### Examen Directo y Cultivos Micológicos

El análisis de los distintos materiales obtenidos de las zonas afectadas es de gran importancia para el diagnóstico de este amplio espectro de patologías.

El estudio de esputos, lavado broncoalveolar (BAL), biopsia pulmonar o renal, raspados oftálmicos, secreciones óticas, lavados de los senos nasales y en muestras oculares y de piel, revelan en el examen directo con KOH al 10% o con azul de lactofenol la presencia de *hifas anchas tabicadas* y con *ramificaciones dicotómicas en ángulo de 45°*, de aproximadamente 2,5 a 4,5  $\mu\text{m}$  de ancho (Figura 1). El uso de la técnica de Calcoflúor puede facilitar la observación de las formas fúngicas. Coloraciones como las de Gram Nicolle, Hematoxilina Eosina y Gomori-Grocott (Figura 2) permiten una buena visualización de las hifas características.



**Figura 1.** Examen directo de material rinosinusal con Azul de lactofenol: se observan hifas anchas tabicadas y con ramificaciones dicotómicas. *Fuente:*

[https://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/132502/mod\\_resource/content/5/Apunte%20Aspergilosis%202020.pdf](https://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/132502/mod_resource/content/5/Apunte%20Aspergilosis%202020.pdf)



**Figura 2.** Extendido de absceso cerebral coloreado con Gomori-Grocott: se observan hifas anchas tabicadas y con ramificaciones dicotómicas. *Fuente:*

[https://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/132502/mod\\_resource/content/5/Apunte%20Aspergilosis%202020.pdf](https://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/132502/mod_resource/content/5/Apunte%20Aspergilosis%202020.pdf)

En esputos, la presencia de hifas y, en raros casos, la de elementos de fructificación,  
Año 2024

puede orientar a que la masa fúngica se encuentra alojada en una zona de aireación constante.

Los medios de cultivos más utilizados son Sabouraud Glucosa y Czapek-Dox (crecen bien en estos medios generales), a los que podemos agregar antibióticos. Algunas cepas del género *Aspergillus* son sensibles a la cicloheximida por lo que no se recomienda el uso de medios de cultivo con este antibiótico (como Mycosel). Otro de los factores que influye en el desarrollo es la temperatura, pero podemos considerar que la temperatura óptima es de aproximadamente 28°C. La mayoría de los *Aspergillus* patógenos pueden desarrollar a 37°C, inhibiendo así a la flora saprófita acompañante. Un caso particular es *A. sección Fumigati*, la cual es considerada termotolerante porque puede desarrollar a temperaturas cercanas a 45°C.

Debido a la ubicuidad del género, el diagnóstico micológico se ve dificultado, por lo tanto, su hallazgo en muestras como esputo, secreciones óticas e hisopados no tienen significado clínico, por lo que se recomienda para estos materiales el envío de MUESTRAS SERIADAS para su procesamiento, en las que debe hallarse crecimiento de igual género y especie del hongo en la mayoría de los medios de cultivo sembrados con el material. En piezas obtenidas por métodos quirúrgicos o por punciones (sitios estériles), la observación de las hifas características y desarrollo de hongos pertenecientes al género *Aspergillus*, tienen valor diagnóstico. En el tracto respiratorio, el hallazgo de un resultado positivo tiene valor diagnóstico si va acompañado de síntomas y signos característicos de infección pulmonar o sinusal. Las muestras de lavado broncoalveolar (BAL) tienen baja sensibilidad, pero el aislamiento de *Aspergillus* es indicador de infección y, respecto a los hemocultivos, son generalmente negativos para la Aspergilosis (para mejorar los aislamientos, se deben tomar varias muestras en el episodio febril).

La frecuencia relativa de las especies asociadas con Aspergilosis Invasiva (AI) es la siguiente:

*Aspergillus sección Fumigati* (85-90%); *A. sección Flavi* (10%); *A. sección Nigri* (3-7%); *A. sección Nidulantes*, *A. sección Terrei* (1%). La identificación de estas y otras especies se realiza a través de estudios macro y micromorfológicos.

### **Caracterización Taxonómica del Género *Aspergillus***

Para identificar una especie, se deben analizar los constituyentes de su estructura reproductiva: cabeza conidial, conidióforo, vesícula, fiálide, conidios, células de Hülle, cleistotecio y esclerotes (Figura 3).

**Cabeza Conidial.** Está caracterizada por su color, tamaño y forma. El primero está determinado por el color de los conidios; el segundo depende del tamaño de la vesícula y del

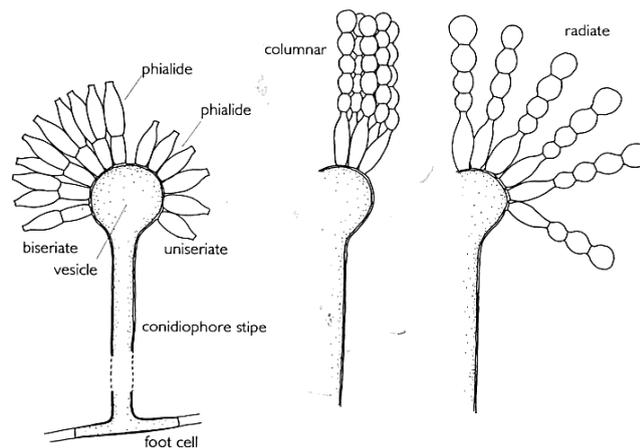
largo de las cadenas de conidios. La forma varía desde columnares a radiadas y globosas, teniendo una relación directa con la forma en que se implantan las fiálides.

**Conidióforo.** Está compuesto por: célula de pie, el conidióforo propiamente dicho y la vesícula. Habitualmente no son ramificados ni tabicados, pero sus paredes pueden ser lisas o rugosas.

**Vesícula.** Se presenta como un extremo dilatado del conidióforo que puede adoptar formas variadas: globosa, elíptica, clavada, semiesférica, y cuyo tamaño varía de 10 a 65  $\mu\text{m}$ .

**Fiálide.** Es la célula conidiógena que da origen a los elementos de reproducción asexual denominados conidias. Se desarrollan sobre el área fértil de la vesícula y se pueden disponer en una sola hilera (uniseriada) o en doble hilera (biseriada) llamando a la primera hilera, esterigmas o métulas.

**Conidias.** Son propágulos asexuados unicelulares que pueden ser uni o multinucleares y que se pueden presentar de formas y colores diversos y que se disponen en cadenas. Sus superficies pueden ser lisas o rugosas.



**Figura 3.** Estructuras reproductivas de especies del género *Aspergillus*. Fuente: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/7167/ELOISA%20G%C3%93MEZ%20MACIAS.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

**Células de Hülle (o en avellana).** Son estructuras especializadas que se pueden observar en diferentes especies fúngicas. Presentan paredes gruesas y se disponen en forma terminal o intercalar en la hifa y son de formas variadas: globosa, subglobosa, elongada o arremolinadas.

**Esclerotes.** Algunas cepas fúngicas, como *A. sección Flavi*, producen masas fuertes, de formas, tamaños y colores diferentes, con células de paredes gruesas que semejan un parénquima. La producción de estas estructuras depende de las condiciones del cultivo y su presencia o ausencia no es relevante para la taxonomía.

**Cleistotecios.** Son ascocarpos cerrados que incluyen elementos de la reproducción sexuada: esporas. Al género *Aspergillus* taxonómicamente se lo puede ubicar dentro de los hongos filializados que poseen células de pie, pero estos elementos micromorfológicos son insuficientes para identificarlos ya que existen otros hongos como *Penicillium* que también los poseen. Se propone que la presencia de células de pie es característica del género *Aspergillus*, pero su ausencia no lo descarta. Actualmente ha habido sucesivas reuniones científicas en las que se abordó exclusivamente la problemática relacionada a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. En ellas se revisó la nomenclatura siguiendo las normas del Código Internacional de Nomenclatura Botánica (ICBN). Gams et al. reclasificaron el género y lo dividieron en 6 subgéneros, los que pueden dividirse en una o más secciones. Con el fin de proteger a los nombres en uso, la Comisión Internacional de *Penicillium* y *Aspergillus* elaboró una lista con 186 especies de *Aspergillus* y 72 teleomorfos (Tabla 1, Figura 4).

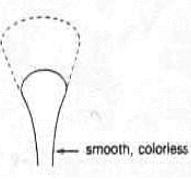
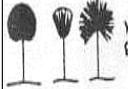
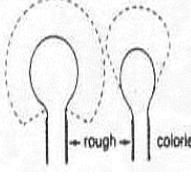
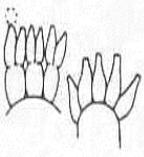
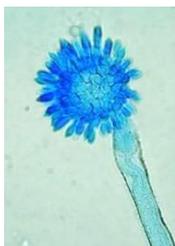
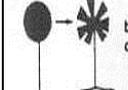
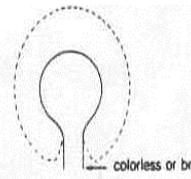
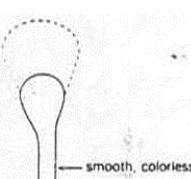
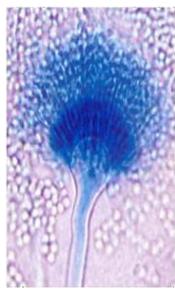
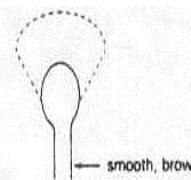
**Tabla 1.** Características macro y micromorfológicas de las especies de *Aspergillus* asociadas con patologías en humanos.

	<b>Características</b>	<b><i>A. s. Fumigati</i></b>	<b><i>A. s. Flavi</i></b>	<b><i>A. s. Nigri</i></b>	<b><i>A. s. Terrei</i></b>	<b><i>A. s. Nidulantes</i></b>
<b>Colonia</b>	<b>Aspecto</b>	Plano, aterciopelado, algodonoso	Pulverulento	Punteado negro	Aterciopelado, flocoso	Plano, aterciopelado
	<b>Anverso</b>	Verde botella, blanco-grisáceo	Verde amarillento	Blanco amarillento	Marrón amarillento	Verde amarillento
	<b>Reverso</b>	Incoloro, Rojo amarillento	Incoloro, café amarillento	Incoloro, amarillento	Incoloro, beige	Rojo púrpura
<b>Reproducción</b>	<b>Conidióforo</b>	Corto, liso, incoloro,	Regular, pared rugosa	Largo, 1,5 - 3 mm	Regular, hialino liso	Muy corto, liso, café (marrón),
	<b>Vesícula</b>	Mazo o domo	Esférica	Globosa	Subesférica	Hemisférica
	<b>Fiálides</b>	Uniseriado, paralelas	Uniseriado o biseriado, radiadas	Biseriado, radiadas	Biseriado, ligeramente columnar	Biseriado, paralelas
	<b>Conidias</b>	Globosos, equinulados, verdes	Piriformes, globosos, verde amarillento	Globosos, negros	Globosos, estriados, amarronados	Globosos, equinulados, verdes

(Continúa en la hoja siguiente)

(Viene de la hoja anterior. Continuación de la Tabla 1)

<b>Reproducción sexual</b>	<b>Cleistotecios</b>	Globosos, amarillos	---	---	---	Globosos, café (marrón)
	<b>Ascosporas</b>	Globosos con crestas ecuatoriales	---	---	---	Rojizas
	<b>Células en avellana</b>	---	---	---	---	20 µm
	<b>Esclerotes</b>	---	Blanco o negro	---	---	---
<b>Otros</b>	<b>Temperatura de desarrollo óptimo</b>	37 a 50°C	37°C	37°C	37°C	30 a 37°C

Sección	Cabeza conidial	Vesícula y conidióforo	Esterigma	Conidias	Ejemplo
<i>A. s. Fumigati</i>	 greenish blue, blue-gray	 smooth, colorless		green 2-3.5 $\mu$ 	
<i>A. s. Flavi</i>	 yellowish green	 rough → colorless		yellow-green 3-6 $\mu$ 	
<i>A. s. Nigri</i>	 black to dark brown	 colorless or brown		dark brown 4-5 $\mu$ 	
<i>A. s. Terrei</i>	 tan	 smooth, colorless		pale yellow 2-2.5 $\mu$ 	
<i>A. s. Nidulantes</i>	 dark green	 smooth, brown		green 3-3.5 $\mu$ 	

**Figura 4.** Características micromorfológicas de especies de *Aspergillus*. Imágenes modificadas de: [https://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/132502/mod\\_resource/content/5/Apunte%20Aspergillus%202020.pdf](https://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/132502/mod_resource/content/5/Apunte%20Aspergillus%202020.pdf)

### Diagnóstico Serológico

La búsqueda de anticuerpos circulantes es una de las técnicas más frecuentemente utilizadas para el diagnóstico. La inmunodifusión (ID) es un ensayo inmunológico frecuentemente realizado en el laboratorio de Micología, que permite obtener entre 1 a 18 bandas cuando enfrentamos el suero problema con extractos metabólicos purificados de las diferentes especies del género *Aspergillus*. La presencia de Ac circulantes se observa entre el 75 al 100% de los casos de aspergiloma y entre el 66-100% de los casos con Aspergilosis Broncopulmonar Alérgica, en los que también se ha reportado la presencia de IgE e IgG. Sin embargo, los pacientes con AI pueden presentar 1 o ninguna banda de precipitación, por lo que se ha intentado avanzar en nuevas técnicas de serodiagnóstico.

La prueba de ID aún es útil y se pueden correlacionar los patrones de bandas con patologías de la siguiente manera: 1 banda débil se presenta en asmáticos, 4 o más bandas en Aspergilosis Broncopulmonar Alérgica con colonización, hasta 18 bandas en aspergilomas y en AI si es crónico se pueden detectar algunas bandas más.

Dado que existe variabilidad antigénica entre las cepas de la misma especie, es recomendable preparar los extractos de antígenos con diferentes cepas. Existe una gran variabilidad entre los lotes de antígenos, teniendo en cuenta que una de las diferencias puede plantearse en la forma de preparación del antígeno, o no ser representativas del área geográfica donde se va a utilizar. También debe considerarse la reactividad cruzada con otras especies de este u otros géneros fúngicos con los que pueden compartir epitopes que reaccionarían con anticuerpos de tipo universales. Las fracciones antigénicas pueden resultar afectadas por la liberación de enzimas proteolíticas al medio de cultivo, causando interferencias posteriores. Por esto es que se necesitan antígenos debidamente purificados con técnicas de producción de antígenos estandarizadas.

Puesto que los procedimientos microbiológicos tradicionales para establecer el diagnóstico de la AI son tardíos y de poca rentabilidad, se han desarrollado una serie de marcadores de enfermedad invasora por *Aspergillus spp.* que permiten realizar un diagnóstico de forma precoz que conlleva la posibilidad de establecer un tratamiento anticipado.

### Diagnóstico de AI mediante Detección de Galactomanano

Desde hace 20 años se conoce la presencia de más de 100 componentes antigénicos en el suero de enfermos con AI, siendo el marcador de mayor utilidad diagnóstica el **galactomanano**. El galactomanano (GM) es un componente de la pared celular del género *Aspergillus*, el cual es el principal exoantígeno liberado durante la angioinvasión. En enfermos con AI, el GM puede ser detectado en suero, orina, líquido cefalorraquídeo, líquido

pericárdico/pleural y BAL. Las concentraciones de GM en suero son fluctuantes, y aunque no se conoce con exactitud su cinética, se sabe que en su aclaración intervienen las células de Kupffer. Actualmente se utiliza un ELISA doble sándwich que emplea un anticuerpo monoclonal de rata EBA-2 dirigido contra el GM de *Aspergillus* que es utilizado como captor y detector del antígeno. Esta prueba está comercialmente disponible como *Platelia Aspergillus*® (Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, Francia). Es una técnica sencilla, reproducible y rápida (aproximadamente 4 hs) cuyo punto crítico radica en el tratamiento del suero con calor en presencia de EDTA, para disociar los inmunocomplejos y precipitar las proteínas séricas que podrían interferir con el ELISA. El límite de detección es de 0,5-1 ng/ml. Otro de los métodos comerciales es *Aspergillus Galactomannan Lateral Flow Assay* (IMMY, Oklahoma, Estados Unidos), el cual detecta de manera cualitativa GM en muestras de suero y BAL. Este método posee alta sensibilidad y especificidad, con un formato fácil de usar y un tiempo de prueba rápido de 30 min.

**Definición de GM positivo.** Se considera que la prueba es positiva cuando se obtienen al menos dos determinaciones consecutivas positivas, siendo el punto de corte inicialmente recomendado en suero de  $\geq 1,5$  ng/ml, aunque actualmente en Europa se ha fijado el punto de corte en 1 ng/ml, mientras que en EE.UU. se recomienda utilizar 0,5 ng/ml. El GM es de gran utilidad diagnóstica en pacientes neutropénicos adultos ( $<100$  N/mm<sup>3</sup>  $>3$  semanas o  $<500$  N/mm<sup>3</sup>  $>5$  semanas) catalogados como de alto riesgo de desarrollar una AI. El GM es de dudosa utilidad diagnóstica en población pediátrica, receptores de trasplante de órgano sólido, SIDA, enfermedad granulomatosa crónica, neoplasias de órgano sólido y grandes quemados.

En la práctica clínica la positividad de dos GMs en población de alto riesgo obliga a la instauración de tratamiento antifúngico (terapia anticipada), puesto que este dato sería indicativo de infección. La evolución clínica, radiológica, antigénica, en conjunto con los datos proporcionados por la biología molecular (PCR) permitirían probar la AI. El éxito en el diagnóstico de AI, utilizando las técnicas de detección de Ag depende principalmente del correcto monitoreo de las muestras. Así el análisis de muestras seriadas aumenta la posibilidad de obtener resultados satisfactorios. Cuando el/la paciente recibe terapia antifúngica, el clearance de Ag se ve favorecido, y consecuentemente las pruebas resultarán negativas.

### **Diagnóstico de AI mediante Detección de (1-3)- $\beta$ -D-Glucano**

El glucano es un componente de la pared celular fúngica formado por monómeros de glucosa unidos con enlaces (1-3)- $\beta$  y (1-6)- $\beta$ . El (1-3)- $\beta$ -D-glucano (BG) se libera durante la infección y puede detectarse en el plasma de pacientes con varias micosis (candidiasis, aspergilosis y neumocistosis, pero no criptococosis y mucormicosis) ya que el ser humano

carece de glucanasas para digerirlo y su eliminación es lenta. Por lo tanto, una prueba positiva puede utilizarse como marcador de infección fúngica, pero no permite identificar la especie. Las pruebas tradicionales para detectar BG pueden presentar falsos positivos en pacientes sometidos a hemodiálisis con aparatos que tengan membranas de acetato de celulosa, o en tratamiento con albúmina, inmunoglobulinas, algunos agentes anticancerosos y sulfamidas. Un estudio realizado por Pazos y col. (2005) sugiere que la detección de BG (Fungitell, Asoc. Cape Code, EU) es una herramienta diagnóstica de la AI, con una S del 87,5%, una E de 89,6 % y que la positivización en el tiempo del BG era más temprana que con GM en relación a la aparición de fiebre, signos clínicos e imágenes radiológicas (tomografía computada). Según estos autores, la detección conjunta de ambos marcadores realizadas en suero bisemanalmente, permite: 1) aumentar la E y el valor predictivo (+) a un 100 %; 2) predecir la evolución en los enfermos con AI y 3) detectar los falsos positivos para ambos tests.

### **Diagnóstico de AI mediante Biología Molecular**

La Biología molecular ha realizado grandes aportes para el diagnóstico de las aspergilosis, tanto para muestras clínicas como en los estudios taxonómicos de cepas. Mediante PCR, los principales genes utilizados para la identificación son: ADNr,  $\beta$ -tubulina, actina, calmodulina, hidrofobina y RPB2. Los métodos basados en la PCR tienen una mayor sensibilidad que el cultivo y una especificidad comparable a éste. Esta técnica puede dar resultados falsos positivos debido a la ubicuidad del *Aspergillus*, por la contaminación del ambiente de trabajo, buffers y muestras. El uso de filtros de aire en el área de trabajo puede contribuir a evitar este riesgo. El mayor problema es que por el momento ninguna prueba ha sido ampliamente evaluada como para que sea utilizada universalmente. La estandarización de los métodos de extracción y de detección del ADN permitirá introducir estos métodos al laboratorio micológico de rutina.

Diferentes formatos de PCR se puede aplicar en el diagnóstico de AI, pero lo más recomendable es la *qPCR* (o PCR en tiempo real) ya que minimiza el riesgo de contaminación y, por lo tanto, de falsos positivos. Además, permite la identificación a nivel de especie mediante el uso de sondas específicas y la diferenciación entre colonización e infección (ya que permite cuantificar la carga fúngica).

### **ACTIVIDADES A DESARROLLAR**

- Observación macroscópica de cultivos.
- Observación microscópica de diferentes especies del género *Aspergillus*.

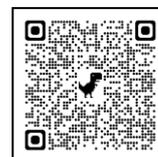
## BIBLIOGRAFÍA

- Arenas Guzmán, R. y Torres, E. (2019). *Micología Médica Ilustrada*. Sexta Edición. Mc-Graw Hill Interamericana, ISBN: 978-607-15-1424-0.
- Bonifaz, A. (2015). *Micología Médica Básica*. Quinta Edición. Mc-Graw Hill Interamericana, ISBN: 978-607-15-1270-3.
- De Hoog, G.S., Guarro, J., Gené, J., Ahmed, S., Al-Hatmi, A.M.S., Figueras, M.J., Vitale, R.G. (2020). *Atlas of Clinical Fungi*. Cuarta edición. Hilversum.
- Pazos, C., Pontón, J., del Palacio, A. (2005). *Contribution of (1-3) beta-D glucan chromogenic assay to diagnosis and therapeutic monitoring of invasive aspergilosis in neutropenic adult patients: a comparison with serial screening for circulating galactomannan*. J Clin Microbiol; 43: 299-305.
- Pemán, J., Martín Mazuelos, E., Rubio Calvo, M.C. (2007). *Guía práctica de identificación y diagnóstico en Micología Clínica*. Segunda edición. Revista Iberoamericana de Micología.
- Rippon, J.W. (1990). *Micología Medica: hongos y actinomicetos patógenos*. Tercera edición. México: Editorial Interamericana.

### Página web

Universidad Nacional de Rosario. (2020). *Aspergilosis*. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Recuperado el 04 de septiembre de 2023.

[https://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/132502/mod\\_resource/content/5/Apunte%20Aspergilosis%202020.pdf](https://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/132502/mod_resource/content/5/Apunte%20Aspergilosis%202020.pdf)



## TRABAJO PRÁCTICO DE AULA Nº 8

### TÉCNICAS MOLECULARES UTILIZADAS EN EL DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO

#### OBJETIVOS

- Adquirir conocimiento integral sobre las tecnologías moleculares que se utilizan actualmente en Micología.
- Comprender los fundamentos teóricos de estas técnicas y su utilidad en la identificación de distintos hongos.

#### INTRODUCCION TEÓRICA

En la actualidad, las infecciones causadas por especies patógenas de hongos representan un problema para la salud humana. Se estima que provocan entre 1,3 y 1,5 millones de muertes por año, lo que se compara a los fallecimientos producidos por otras enfermedades como la tuberculosis y la malaria. Se ha observado el constante incremento de las infecciones fúngicas, en particular por el aumento de la población de pacientes inmunocomprometidos/as, y se estima que más de mil millones de personas en el mundo sufren una infección fúngica grave, en donde los géneros *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Pneumocystis* e *Histoplasma* son la principal causa.

Los datos clínicos, epidemiológicos y terapéuticos orientan sobre una posible infección fúngica. La presencia de enfermedades subyacentes como diabetes mellitus, neoplasias hematológicas, fibrosis pulmonar e infección por VIH, el uso de agentes inmunosupresores, quimioterapéuticos y antibióticos de amplio espectro, la ocupación, la procedencia y la historia de viajes recientes a alguna zona endémica de enfermedades micóticas constituyen los principales factores de riesgo. Es por eso que el diagnóstico adecuado y oportuno es de gran relevancia para poder instaurar un tratamiento eficaz que logre disminuir la morbilidad y mortalidad asociada a estas micosis.

Uno de los problemas más frecuentes es el elevado porcentaje de resultados negativos cuando se analizan las muestras. Esto puede estar debido a factores como la inapropiada preparación del/la paciente, la inadecuada extracción del material que proviene de las lesiones, errores durante el transporte, la falta de experiencia del personal que realiza el examen micológico y/o la interpretación de los mismos. Surge entonces la necesidad de

establecer apropiados protocolos institucionales y capacitación del personal de salud para el correcto diagnóstico micológico.

### **Diagnóstico por Técnicas Convencionales de las Infecciones Fúngicas**

La identificación del agente causal de la infección fúngica es de fundamental importancia desde el punto de vista terapéutico, epidemiológico y ecológico, dado que las rutas de infección, los tratamientos necesarios y la susceptibilidad pueden variar entre las diferentes especies.

Los métodos de diagnóstico tradicionales que hemos desarrollado en los TP anteriores, como la observación al microscopio de las estructuras fúngicas en muestras clínicas, el cultivo en medios artificiales y la identificación de los hongos aislados mediante diversas técnicas, continúan siendo el estándar de referencia para el diagnóstico micológico, a pesar de su limitada sensibilidad y especificidad, y al tiempo requerido para obtener resultados que permitan instaurar un tratamiento eficaz. También hay que tener en cuenta que, en algunos casos, no es sencillo observar las estructuras fúngicas debido a la dificultad para lograr la esporulación del hongo. El correcto aislamiento en cultivo puede verse afectado por factores como el crecimiento lento, los requerimientos nutricionales, la termotolerancia, etc. Además, mediante los métodos convencionales, usualmente podremos realizar la identificación a nivel de género ya que no siempre las estructuras fúngicas poseen características tan específicas que permitan la identificación a nivel de la especie concreta que esté provocando las lesiones. Otro aspecto a tener en cuenta es que suele existir estrecha similitud morfológica, incluso entre géneros, que hace difícil su identificación. Un ejemplo es *Histoplasma capsulatum* que comparte características macroscópicas y microscópicas con hongos ambientales que, además de ser contaminantes, pueden ser patógenos (como *Chrysosporium spp.* y *Sepedonium spp.*). Es por ello que disponer de pruebas diagnósticas que sean específicas, sensibles, rápidas y confiables es una preocupación permanente en el campo de la micología clínica.

Actualmente existe una tendencia al desarrollo y aplicación de métodos no invasivos y cultivo-independientes que permitan realizar un diagnóstico oportuno y preciso, entre los que se incluyen las pruebas inmunológicas (detección de antígenos y anticuerpos) y la detección de material génico fúngico por técnicas de Biología Molecular. Además, a partir de estas técnicas se puede obtener información adicional valiosa, como evaluar la resistencia a fármacos antifúngicos, factores de virulencia y obtener datos epidemiológicos que mejoren la comprensión de una determinada patología.

## Pruebas Inmunológicas

Las técnicas serológicas se emplean por ser sencillas, rápidas y confiables. Estas permiten la detección de antígenos fúngicos o la evaluación de la respuesta de anticuerpos que se produce durante el desarrollo de las micosis, motivo por el cual se han incluido en la batería de pruebas para el diagnóstico de infecciones fúngicas.

### DetECCIÓN DE ANTÍGENOS

La detección y cuantificación de moléculas fúngicas que sirven como *biomarcadores* está disponible para la mayoría de las micosis invasivas y ha demostrado utilidad en la criptococosis, la aspergilosis, la histoplasmosis y la candidiasis invasiva, y en otros patógenos como *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides posadasii* y *Coccidioides immitis*. La detección de los componentes fúngicos en muestras de sangre, suero, BAL o LCR se utiliza en la actualidad como una técnica de rutina en varios laboratorios ya que permite (en la mayoría de los casos) arribar al diagnóstico de la micosis más rápidamente que el binomio convencional cultivo-identificación. A diferencia de la detección de anticuerpos, no está influenciada por el estado inmunológico del/la paciente y, por ende, no necesita el tiempo de inducción de la respuesta inmune. La sensibilidad y especificidad de estas pruebas son variables ya que algunas presentan falsos positivos y requieren determinaciones seriadas.

#### a. Diagnóstico de Criptococosis

La detección de glucuronoxilomanano (GXM, polisacárido de la cápsula) del complejo *C. neoformans/C. gattii* es una prueba ampliamente utilizada para el diagnóstico de la criptococosis debido a su rapidez (10-15 min), sensibilidad y especificidad, especialmente en muestras de LCR y suero (>90%), en secreciones respiratorias y orina. Permite diagnosticar el 99% de las meningitis criptocócicas y el 67% de las formas diseminadas. Durante los últimos 30 años, se utilizaron técnicas basadas en la aglutinación de partículas de látex sensibilizadas con gamma-globulina de conejo anti-GXM. Estas técnicas generaban falsos positivos en pacientes con artritis reumatoidea, durante las infecciones con otros hongos (como *Trichosporon* spp.) y en pacientes con septicemias o neoplasias. Además, las principales causas de falsos negativos se relacionaban con la presencia de levaduras escasas, con poca o ninguna cápsula y al fenómeno prozona. Luego se desarrolló una técnica que logró ser una importante contribución para el diagnóstico de la criptococosis: el *Cryptococcal Antigen Lateral Flow assay (CrAg® LFA, IMMY, Oklahoma, Estados Unidos)*, el cual se basa en técnicas inmunocromatográficas y está diseñado para la detección cualitativa y semicuantitativa de GXM en suero, plasma, orina y LCR. Es sencilla, permite la obtención

de resultados en 10 min, no requiere personal especializado, laboratorios con infraestructura avanzada ni pre-tratamiento de las muestras.

### **b. Diagnóstico de Candidiasis**

El manano es un polisacárido localizado en la pared celular de la mayoría de las especies del género *Candida* y su principal utilidad es su detección en LCR para el diagnóstico de las meningitis causadas por este género. Sin embargo, cada especie presenta un contenido variable de manano y en algunos/as pacientes la mananemia es de corta duración, resultando poco sensible. Para mejorar este parámetro, se recomienda el estudio de muestras seriadas. La detección puede realizarse mediante un kit disponible comercialmente: *Platelia™ Candida Ag Plus* (Bio-Rad, Francia), el cual se trata de una técnica inmunoenzimática tipo sándwich realizada sobre microplaca que permite detectar residuos de manosa unidos por enlaces  $\alpha$  ( $\alpha$ -Man). Esta prueba en combinación con *Platelia™ Candida Ab Plus* (que detecta anticuerpos anti-manano), contribuye a mejorar la sensibilidad del diagnóstico. Entre las limitaciones más importantes se encuentran la falta de reproducibilidad y el gran número de resultados indeterminados.

### **c. Diagnóstico de Aspergilosis**

El galactomanano (GM) es un componente de la pared celular del género *Aspergillus*, que se puede detectar mediante ELISA con el anticuerpo monoclonal de rata EBA-2 (*Platelia™ Aspergillus Ag/EIA*, Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, Francia) en suero, BAL, orina, LCR, líquido pericárdico y pleural de los/las pacientes enfermos/as con AI (ver TP N° 7). Hace algunos años, se desarrollaron otras dos técnicas para detectar *Aspergillus* en muestras de suero y BAL: *Aspergillus-specific lateral flow device* (LFD; *OLM Diagnostics, Newcastle, Inglaterra*) y, más recientemente, *Aspergillus Galactomannan Lateral Flow Assay* (LFA; *IMMY, Oklahoma, Estados Unidos*). El kit *LFD* utiliza un anticuerpo monoclonal que detecta manoproteínas antigénicas extracelulares secretadas durante el crecimiento activo de especies de *Aspergillus*. El kit *LFA* es una técnica basada en inmunocromatografía capaz de detectar GM mediante anticuerpos específicos conjugados con oro coloidal. Si se produce la unión, el complejo Ag-Ac migrará por la tira hacia arriba por flujo capilar, generando dos líneas en los resultados positivos y una línea en los resultados negativos. En ambos casos, la línea control siempre deberá estar presente para no invalidar el ensayo. Al *LFA* se le atribuye un alto valor diagnóstico, principalmente en los/las pacientes inmunocomprometidos/as con riesgo de desarrollar AI. Además, se considera una técnica sencilla, de fácil manejo en el laboratorio de rutina, que no requiere personal especializado y con la que se obtienen resultados rápidos. En un trabajo reciente (Autier y col. 2022), utilizaron el *LFA* con lector automatizado para el diagnóstico de aspergilosis pulmonar asociada a COVID-19 (CAPA), mostrando buenos

resultados en muestras respiratorias, mientras que la sensibilidad en suero fue limitada, vinculada a una invasividad débil durante la CAPA.

#### **d. Diagnóstico de Histoplasmosis**

El *gold standard* para el diagnóstico es el aislamiento de *H. capsulatum* a partir de muestras clínicas. Sin embargo, aunque la especificidad del cultivo es del 100%, la sensibilidad depende de la carga fúngica, la presentación clínica y de una toma de muestra adecuada. Otro método utilizado es la detección antigénica que se realiza principalmente en orina, aunque también se puede hacer en suero o BAL. En este sentido, IMMY (Oklahoma, Estados Unidos) desarrolló la primera prueba comercial para detectar antígenos de *Histoplasma*: el *IMMY Alpha Histoplasma EIA Test Kit*, un ensayo inmunoenzimático tipo sándwich que utilizaba anticuerpos policlonales; sin embargo, producía reacciones cruzadas con otros hongos como *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides* spp., *Paracoccidioides brasiliensis* y *Aspergillus* spp. Posteriormente, esta misma empresa lanzó el *CLARUS Histoplasma Galactomannan EIA*, una prueba inmunoenzimática basada en anticuerpos monoclonales para la detección de GM de *Histoplasma* en muestras de orina, la cual mostró una sensibilidad mejorada (91,3%) en comparación con el kit IMMY ALPHA (67,3%) (Martínez-Gamboa y col. 2021).

#### **Detección de Componentes No Antigénicos**

La detección de componentes no antigénicos liberados por los hongos durante la infección es otra opción para el diagnóstico de las micosis; entre ellos destacan el **D-arabinitol** y el **1,3-β-D-glucano (BG)**. El D-arabinitol es un metabolito producido por el género *Candida* que se detecta por cromatografía gas-líquido en suero y orina de pacientes. *Candida* produce D-arabinitol y el ser humano L-arabinitol por lo que la proporción de ambos en orina resulta un marcador temprano de candidiasis invasiva. No obstante, la técnica resulta poco práctica debido a su complejidad. El BG es un polisacárido presente en la pared celular de la mayoría de las especies fúngicas, excepto en *Cryptococcus* spp. y en los mucorales, comportándose como un biomarcador panfúngico (no es específico de una micosis invasora concreta). Su utilidad es mayor en aspergilosis, candidiasis y neumocistosis (ver TP N° 7). El BG se libera durante el desarrollo de la infección y puede detectarse en el suero de los/las pacientes. El fundamento de la prueba se basa en la capacidad del BG de activar la cascada de coagulación en el lisado de amebocitos del cangrejo herradura *Limulus polyphemus* y la interpretación requiere personal con experiencia en la prueba. En la actualidad se comercializan: *Fungitec-G® Test MK* (Seikagaku Kogyo, Japón), *Wako® WB003* (Wako Pure Chemical Industries, Japón), *B-G Star®* (Maruha Corporation, Japón) y *Fungitell®* (Associates of Cape Cod Inc., Estados Unidos).

## Detección de Anticuerpos

Las pruebas más utilizadas en el laboratorio de rutina para la detección de anticuerpos son la inmunodifusión doble (IDD), la fijación de complemento (FC) y el ELISA. La prueba de inmunodifusión doble se basa en la difusión radial de los inmunoreactantes (Ag y Ac) en un gel de agar que, al encontrarse, forman un complejo Ag-Ac que precipita en el gel y aparece como una línea blanca. Esta técnica se ha utilizado para el diagnóstico del género *Aspergillus*, histoplasmosis, paracoccidiodomicosis y esporotricosis. Por su parte, la prueba de fijación de complemento se basa en la capacidad del complemento para unirse a los complejos Ag-Ac, determinada por la lisis de eritrocitos. Esta prueba ha sido de utilidad en la detección de anticuerpos contra *Histoplasma capsulatum* y *Paracoccidioides brasiliensis*; sin embargo, su uso de rutina es poco práctico debido a que su laboriosidad.

El sistema de ensayo inmunoenzimático ligado a una fase sólida, o ELISA, se emplea ampliamente para la detección de anticuerpos en los líquidos corporales. Basado en esta tecnología, se desarrolló el *Platelia™ Candida Ab/Ac/Ak®* (Bio-Rad, Francia), el cual detecta anticuerpos anti-manano de *Candida*, que aparecen antes de las manifestaciones clínicas y se asocian a un riesgo mayor de candidiasis invasiva en pacientes neutropénicos/as. Sin embargo, debido a la alta prevalencia de anticuerpos anti-manano en la población, se han intentado investigar otros marcadores más específicos de candidiasis como aquellos dirigidos contra antígenos de la fase micelial. La detección de anticuerpos anti-micelio se comercializa como un test de inmunofluorescencia indirecta (IFI): *Invasive candidiasis (CAGTA) IFA IgG* (Laboratorios Vircell, España) para el diagnóstico de la infección por complejo *C. albicans* y otras especies del género. Por otra parte, el kit comercial *Aspergillus fumigatus IgG ELISA* (IBL-America, Estados Unidos) permite determinar la presencia de anticuerpos IgG anti-*Aspergillus sección Fumigati* en muestras de suero o plasma de pacientes con sospecha clínica de aspergilosis pulmonar crónica. También está disponible *Platelia™ Aspergillus IgG* (Bio-Rad, Francia), el cual se basa en una técnica inmunoenzimática que detecta en las mismas muestras anticuerpos IgG dirigidos contra un antígeno recombinante purificado de *Aspergillus*.

En relación a las coccidiodomicosis, las pruebas cutáneas con esferulina o con coccidiodina eran los métodos más empleados; sin embargo, resultan positivas en el 70% de la población de áreas endémicas. Los ensayos comerciales disponibles actualmente se basan en la detección de anticuerpos IgM o IgG, ya sea en formato de FC, IDD o ELISA, como por ejemplo, el *PREMIER Coccidioides EIA* (Meridian Bioscience Europe, Bélgica). Para las paracoccidiodomicosis, existen métodos diagnósticos basados en la IDD, la FC, la IFI y el ELISA. La positividad depende de dos condiciones: la capacidad inmunológica del/la paciente de producir anticuerpos y un período mayor o igual a 21 días desde el inicio de los síntomas.

Hay que tener en cuenta que una de las principales desventajas es la utilidad limitada en el diagnóstico de las micosis invasivas debido a que la respuesta puede estar retrasada, reducida o no existir en pacientes inmunocomprometidos. Sin embargo, este problema podría resolverse al elegir epitopes antigénicos apropiados y estudiar muestras seriadas del/la paciente para analizar la evolución de dichos títulos y su correlación con los datos clínicos y microbiológicos.

### **Diagnóstico Molecular para la Identificación de Hongos de Importancia Médica**

En la lucha contra las enfermedades infecciosas, la microbiología clínica ha requerido optimizar las pruebas diagnósticas a nivel de especificidad, sensibilidad, rapidez y confianza para contribuir a la prevención, control y tratamiento adecuado de estas enfermedades. El diagnóstico molecular tiene la gran ventaja de que no necesita basarse en el cultivo del microorganismo. Este hecho permite en la mayoría de los casos un diagnóstico más rápido debido a que no es necesaria la espera de 24-48 hs (en ocasiones, semanas) antes de obtener colonias del agente patógeno en los medios de cultivo. Aunque los métodos convencionales y las pruebas inmunológicas siguen siendo la herramienta fundamental para el diagnóstico en micología dado su facilidad y accesibilidad, requieren de ciertos parámetros como la adecuada obtención y procesamiento de la muestra y un análisis meticuloso por personal entrenado para obtener resultados confiables. Con la aplicación de la Biología Molecular y los avances en genómica se ha logrado aumentar la sensibilidad y rapidez del diagnóstico de una gran variedad de micosis, facilitando así el inicio de un tratamiento oportuno. Además, han permitido el acceso a secuencias de ADN y perfiles proteicos de hongos para la correcta identificación de género, especie o subespecie y obtener datos epidemiológicos certeros.

El laboratorio de Biología Molecular es el área diagnóstica de mayor crecimiento en los laboratorios clínicos en los últimos años; un ejemplo cercano fue la necesidad de implementar técnicas moleculares durante la pandemia por el virus SARS-CoV-2. Estas técnicas, así como la automatización, la nanotecnología y la informática, han permitido mejorar el diagnóstico de enfermedades infecciosas y, con ello, la instauración temprana de un tratamiento que permita disminuir la morbimortalidad asociada. Es claro que una prueba diagnóstica ideal debería ser capaz de procesar pequeños volúmenes de muestra, ser rápida, técnicamente simple o automatizada, de bajo costo y que no requiera procesamiento por lotes que provocan retrasos en la entrega de resultados.

Entre las técnicas moleculares utilizadas en la identificación de hongos se han descrito: el análisis de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP; del inglés, *Restriction Fragment Length Polymorphism*), la electroforesis de enzimas multilocus (MLEE; del inglés, *Multilocus Enzyme Electrophoresis*), el uso de sondas de hibridación marcadas para la

identificación de un fragmento específico de ADN (por ejemplo, por *Southern blot*) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; del inglés, *Polymerase Chain Reaction*) con sus modificaciones, para la amplificación de diferentes fragmentos de ADN específicos. La amplificación de dianas acoplada a la secuenciación de los productos amplificados ha permitido una identificación más precisa de diferentes hongos. En la última década, diferentes trabajos han mostrado la utilidad del MALDI-TOF MS (del inglés, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry*) para la identificación definitiva a nivel de género y especie en muestras clínicas y cultivos. En este apartado, nos centraremos particularmente en las últimas tres tecnologías.

#### **a. Detección de ADN Fúngico por Reacción en Cadena de la Polimerasa**

Entre las nuevas aplicaciones para la identificación de hongos a partir de muestras clínicas (suero, sangre, etc.) y de cultivos, se encuentra la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual presenta la capacidad de amplificar pequeñas cantidades de ADN fúngico (entre 1 y 10 fg) hasta concentraciones detectables. Es una técnica versátil que permite la detección e identificación de una especie fúngica en concreto, cuyo objetivo son secuencias de ADN específicas de dicha especie (como actina, calmodulina,  $\beta$ -tubulina, genes ribosomales 5.8S, 18S y 28S, y regiones no codificantes ITS1 e ITS2 del ADNr) o bien la detección de múltiples especies, por ejemplo, en un cribado diagnóstico empleando como objetivo secuencias de regiones comunes del genoma presentes en hongos de diferentes géneros (PCR panfúngica). La PCR convencional, a pesar de ser muy sensible, presenta algunas desventajas como la presencia de falsos positivos y a que no es una técnica cuantitativa. Tratando de superar a la PCR convencional, diferentes variaciones han sido introducidas como la PCR anidada y la PCR cuantitativa (qPCR o PCR en tiempo real). En esta última, la cual ha sido utilizada en una gran cantidad de estudios con fines diagnósticos, la cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo es proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando, el cual es indicativo de la carga fúngica. La PCR en tiempo real es más robusta, específica y sensible que la PCR convencional; además, requiere menos cantidad de ADN de las muestras. La variación de secuencias dentro de los productos amplificados permite la identificación precisa de los hongos a nivel de especie. Una variación de esta reacción cuantitativa es la PCR múltiple, la cual puede detectar de forma simultánea en sangre y suero múltiples fragmentos de ADN en una misma reacción, reduciendo el tiempo de obtención de resultados y los costos. Aunque el diagnóstico basado en PCR supera las limitaciones de otros métodos diagnósticos, aún presenta algunos inconvenientes que evitan que sea implementada en los laboratorios de diagnóstico micológico de rutina. La principal desventaja es la falta de estandarización (lo que explica la variación de los resultados entre laboratorios, afectando la reproducibilidad), la necesidad de personal calificado y problemas

Año 2024

en la extracción del material genético de las muestras. A pesar de ello, la PCR es una buena alternativa en el diagnóstico de infecciones fúngicas porque aporta gran sensibilidad y especificidad para identificar hongos en muestras clínicas.

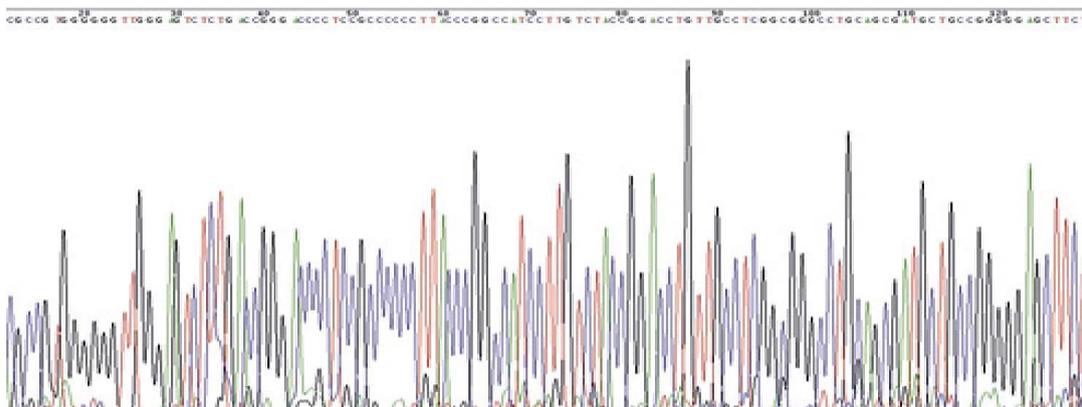
Para el diagnóstico de hongos se han utilizado sistemas como *LightCycler® Septifast Test* (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), *Magicplex™ Sepsis Real-Time Test* (Seegene, Seoul, Corea), *SepsiTest™ UMD CE IVD* (Molzymb GmbH & Co, KG, Bremen, Alemania) y *VYOO® System* (Analytik Jena, Alemania), en donde *LightCycler® Septifast Test* y *VYOO® System* han sido retirados momentáneamente del mercado. Con estos sistemas, además de bacterias, pueden identificarse las especies más comunes de *Candida spp.* (complejo *C. albicans*, *C. tropicalis*, complejo *C. parapsilosis*, complejo *C. glabrata*, *P. kudriavzevii*) y *Aspergillus s. Fumigati* en un periodo de tiempo de 5-8 hs. El sistema *LightCycler® Septifast Test* es una prueba de PCR multiplex en tiempo real que consiste en la extracción de ADN de la sangre, su purificación y posterior realización de 3 PCR múltiples (una para bacterias gram negativas, otra para gram positivas y otra para hongos). Permite identificar 25 patógenos diferentes, donde la especificidad de la técnica es elevada y la sensibilidad es mayor en bacterias que en hongos (80% y 61%, respectivamente). El sistema *Magicplex™ Sepsis Real-Time* se basa en la realización de una primera PCR convencional y una segunda PCR en la que los *primers* están marcados con una sustancia fluorescente. Permite la detección de una mayor cantidad de microorganismos (73 bacterias gram positivas, 12 bacterias gram negativas y 6 hongos). El sistema *SepsiTest™ UMD CE IVD* utiliza *primers* dirigidos a dianas del ARNr de bacterias (16S) y hongos (18S) para la realización de la PCR. Se obtiene como resultado si los microorganismos están presentes o no y, en el caso de que sea positivo, se secuencia para la identificación definitiva. Permite identificar 345 patógenos, tanto en sangre como en otros líquidos biológicos, entre ellos las especies de *Candida* más frecuentes y el complejo *C. neoformans/C. gattii*. *VYOO® System* se basa en una PCR multiplex que permite detectar las 34 bacterias y los 7 hongos más frecuentes implicados en infecciones sistémicas. La identificación tiene lugar después de la amplificación múltiple con sondas específicas y se realiza mediante tecnología de *microarrays*. Entre los posibles microorganismos que pueden identificarse destacan *A. s. Fumigati* y las especies de *Candida spp.* mencionadas.

Otros sistemas que pueden emplearse son: *MycAssay™ Aspergillus* (Myconostica, Manchester, Inglaterra), un ensayo de PCR en tiempo real que permite identificar ADN de hasta 15 especies diferentes del género *Aspergillus* en muestras de plasma, suero, tejido y BAL dentro de las 3 hs de recepcionada la muestra y *MycAssay™ Pneumocystis* para identificar *Pneumocystis jirovecii* en muestras respiratorias (patógeno capaz de producir neumonía de forma frecuente en pacientes con VIH o inmunocomprometidos/as).

Como se mencionó, el diagnóstico por métodos moleculares es rápido, sensible, específico y rentable; sin embargo, una de las limitaciones es la capacidad para detectar simultáneamente múltiples analitos en una sola reacción. Recientemente se desarrolló un método automatizado para la identificación de hongos patógenos basado en la tecnología *Luminex® xMAP®* (*Luminex Corporation, Estados Unidos*) que utiliza microesferas recubiertas con diferentes sondas de hibridación específicas de hongos que capturan el ADN con la secuencia complementaria de interés, detectándose mediante fluorescencia. Esta tecnología permite analizar más de 100 secuencias dianas diferentes en cada pocillo de reacción, a partir de una sola muestra y en un solo ensayo, con el fin de realizar identificaciones de patógenos fúngicos en individuos inmunocomprometidos, como *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Fusarium*, *Trichosporon*, *Mucor*, *Rhizopus* y *Penicillium*.

### b. Secuenciación de Ácidos Nucleicos Fúngicos

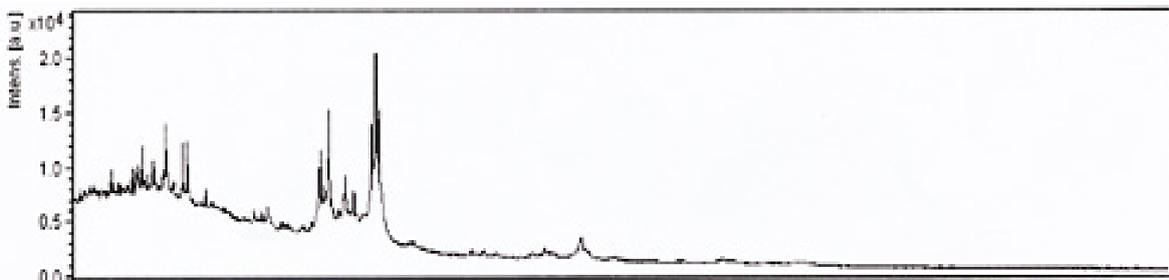
El creciente progreso en la tecnología y la disponibilidad de las secuencias del genoma completo de hasta 5000 hongos ha facilitado que métodos basados en las secuencias del ADN tengan aplicación tanto en investigación como en micología clínica para la identificación de diferentes microorganismos. La secuenciación es un método rápido (puede lograrse con 24 hs de crecimiento del hongo), económico y específico, por lo que se considera uno de los candidatos para convertirse en el estándar de referencia para la identificación de hongos. La identificación se logra comparando la secuencia del producto de amplificación obtenida a partir de la muestra o cultivo (Figura 1) con una base de datos de secuencias de especies conocidas. La diana que se emplea con mayor frecuencia es la que codifica para los ARNr (5.8S, 18S y 28S), que contienen secuencias conservadas comunes a todos los hongos, dominios variables y regiones espaciadoras internas, altamente variables.



**Figura 1.** Cromatograma de una secuencia de un fragmento de ITS de *Histoplasma capsulatum*. Cada pico y color corresponde con un nucleótido: timina (rojo), adenina (verde), citosina (azul), guanina (negro). En la parte superior se especifica la secuencia que posteriormente se compara con las secuencias depositadas en un banco de datos (GenBank) para identificar al hongo de interés. Extraída de *Castaño y col. 2015*.

### c. Detección de Proteínas Fúngicas por MALDI-TOF MS

En la última década, la tecnología de MALDI-TOF MS ha sido introducida en el campo de la microbiología para la identificación de diferentes microorganismos. Esta técnica permite la obtención de una huella peptídica o espectro, la cual es resultado de la ionización suave de las proteínas ribosomales, donde los iones se separan en función de su relación masa-carga tras ser acelerados en un campo eléctrico. Un microorganismo dado presentará siempre una serie de picos característicos en el espectro, el cual se compara contra los perfiles correspondientes a cepas de referencia disponibles en bases de datos o bibliotecas de espectros de masas que son específicos para cada género y especie (Figura 2). La identificación puede hacerse directamente a partir de muestras clínicas o de cultivos. Esta técnica ha sido calificada por diferentes investigadores/as como una técnica de fácil implementación, confiable, rápida, precisa y costo-efectiva para la identificación de levaduras y hongos filamentosos de importancia médica.



**Figura 2.** Espectro de proteínas de la forma micelial de *Histoplasma capsulatum* obtenido por MALDI-TOF MS. Extraída de Castaño y col. 2015.

La comparación de la identificación de diferentes hongos por cultivo y por MALDI-TOF MS ha demostrado que, mientras el método convencional identifica correctamente el 61,5% de los aislamientos, con MALDI-TOF MS se pueden identificar hasta el 89%. Además, una gran ventaja es que puede emplearse directamente sobre muestras de hemocultivo, lo que permite seleccionar el tratamiento antifúngico apropiado de forma oportuna. Por otra parte, se ha demostrado la amplia diferencia que existe en el tiempo que toma identificar levaduras mediante métodos convencionales (aproximadamente 48 hs) en comparación con MALDI-TOF MS (menos de 1 h), y a pesar del importe relativamente elevado del equipo, el precio de la identificación por muestra es relativamente bajo (actualmente, alrededor de USD 1,50), lo que la convierte en una técnica costo-efectiva.

En Argentina, los equipos comerciales que utilizan MALDI-TOF MS son el sistema *MALDI Biotyper*® (Bruker Daltonics Inc., Alemania) y el sistema *VITEK*® MS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia). Cada uno presenta su propia biblioteca de espectros de referencia que se comercializa junto con el equipo, la cual es posible ampliar ya que permite agregar nuevos espectros. La versatilidad de esta tecnología ha permitido la identificación certera de

levaduras de relevancia clínica; en contraposición, la identificación de hongos filamentosos mediante MALDI-TOF MS en el diagnóstico clínico de rutina ha tenido un poco más de complicaciones debido a la dificultad para lisar la pared celular robusta y rígida que poseen, requiriendo procesos de extracción más agresivos (mecánicos y químicos). Más de 20 instituciones de salud han incorporado MALDI-TOF MS al laboratorio clínico. Algunos constituyen laboratorios nacionales de referencia (LNR) que han documentado la evaluación de la metodología para identificar bacterias y hongos; de esta manera, los laboratorios de menor complejidad cuentan con la certeza de que la información obtenida es confiable y validada por los LNR. Desde 2013, se ha recopilado información sobre microorganismos y se han desarrollado bases de datos complementarias con espectros proteicos que no están incluidos en las bases comerciales o están escasamente representados, y espectros de variantes biológicas regionales. De esta forma, se creó en 2015 la Red Nacional de Identificación Microbiológica por Espectrometría de Masas (RENAEM) que incluye a laboratorios públicos y privados que han implementado la espectrometría de masas como herramienta para el diagnóstico. La finalidad es promover la integración y transferir los avances desarrollados por grupos de trabajo nacionales, además de unificar metodologías y criterios de identificación. Los/las profesionales interesados/as pueden acceder a la página web de la red de forma gratuita y desde cualquier dispositivo electrónico (Figura 3). Este sitio incluye los protocolos recomendados por los fabricantes, un manual de procedimiento operativo estándar, actualizaciones y publicaciones de los/las participantes de la red.



**Figura 3.** Código QR para acceder a la página web de RENAEM. Extraída de: *Rocca y col. 2019.*

MALDI-TOF MS amplía la capacidad diagnóstica y supera a los métodos convencionales porque permite la identificación a nivel de especie con implicancias clínicas y epidemiológicas. Teniendo en cuenta sus ventajas, y, a pesar de los costos iniciales que implica la inclusión del equipo en las instituciones de salud, el MALDI-TOF MS será, sin dudas, una tecnología de uso frecuente. No obstante, hasta que esta tecnología (y el resto de tecnologías abordadas en este TP) complete las etapas de validación y verificación, aún no pueden reemplazar al análisis microbiológico tradicional.

## ACTIVIDADES A DESARROLLAR

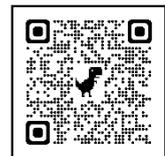
1. Mencione cuáles son las principales ventajas de los métodos moleculares en comparación a los métodos de diagnóstico convencionales. ¿Cree Ud. que en un futuro cercano podrían estos últimos ser reemplazados totalmente por las nuevas tecnologías? Justifique.
2. ¿Cuáles son los géneros de hongos que se han vuelto el principal foco de los métodos moleculares? ¿Es importante poder identificarlos a nivel de especie? En caso de que su respuesta sea afirmativa, explique por qué cree que es así.
3. ¿Cuál es la principal ventaja de detectar antígenos en lugar de anticuerpos? Mencione qué antígenos (y componentes no antigénicos) son los más utilizados en la actualidad.
4. Menciona las principales ventajas y desventajas de la detección de ADN fúngico por la técnica de PCR. ¿Cuáles son las diferencias entre la PCR en tiempo real y la PCR convencional?
5. ¿Cuál es la diferencia entre la secuenciación de ácidos nucleicos fúngicos y la técnica de MALDI-TOF MS? Explique el fundamento de ambos. ¿Cuál es la Red que funciona como base de datos de los laboratorios que han implementado la espectrometría de masas como herramienta para la identificación de microorganismos?

## BIBLIOGRAFÍA

Autier, B., Prattes, J., White, P. L., Valerio, M., Machado, M., Price, J., Egger, M., Gangneux, J.P., Hoenigl, M. (2022). *Aspergillus lateral flow assay with digital reader for the diagnosis of COVID-19-associated pulmonary aspergillosis (CAPA): a multicenter study*. Journal of clinical microbiology, 60(1), e01689-21.

Castaño, V.J.T., Muñoz, S.V.F., Arango, A.C.M. (2015). *Diagnóstico micológico: de los métodos convencionales a los moleculares*. Medicina & Laboratorio, 21(5), 211-242.

Di Conza, J.A. (2022). *Aplicaciones de la espectrometría de masas MALDI-TOF en la microbiología clínica*. Revista argentina de microbiología, 54(3), 1-10.



Fuentes Feria, E. & Illnait-Zaragoz, M.T. (2020). *Diagnóstico micológico por técnicas no convencionales en el siglo XXI*. Revista Cubana de Medicina Tropical, 72(3).



Maldonado, I., García Ramírez, D., Striebeck, P., Lafage, M., Fernández Canigia, L. (2017). *Espectrometría de masas MALDI-TOF: evaluación de la etapa preanalítica para la identificación de hongos miceliales*. Revista argentina de microbiología, 49(1), 7-14.



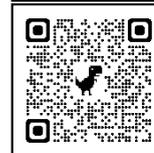
Martinez-Gamboa, A., Niembro-Ortega, M.D., Torres-Gonzalez, P., Santiago-Cruz, J., Velazquez-Zavala, N.G., Rangel-Cordero, A., Crabtree-Ramirez, B., Gamboa-Dominguez, A., Reyes-Gutierrez, E., Reyes-Teran, G., (...), Sifuentes-Osornio, J. (2021). *Diagnostic accuracy of antigen detection in urine and molecular assays testing in different clinical samples for the diagnosis of progressive disseminated histoplasmosis in patients living with HIV/AIDS: A prospective multicenter study in Mexico*. PLoS Neglected Trop. Dis. 2021, 15, e0009215.



Mellado, O.M.D. (2020). *Técnicas de biología molecular en el diagnóstico de enfermedades infecciosas*. NPunto, 3(30), 88-111.



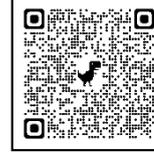
Morales Restrepo, N. & Cardona-Castro, N. (2018). *Métodos de diagnóstico en micología*. CES Medicina, 32(1), 41-52.



Quindós, G., Eraso, E., López-Soria, L. M., Ezpeleta, G. (2012). *Enfermedad fúngica invasora: ¿Diagnóstico micológico convencional o molecular?* Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica, 30(9), 560-571.



Quindós, G. (2018). *Epidemiología de las micosis invasoras: un paisaje en continuo cambio*. Revista Iberoamericana de Micología, 35(4), 171-178.



Reslova, N., Michna, V., Kasny, M., Mikel, P., Kralik, P. (2017). xMAP technology: applications in detection of pathogens. *Frontiers in microbiology*, 8, 55.



Rocca, M.F., Almuzara, M., Barberis, C., Vay, C., Viñes, P., Prieto, M. (2020). *Presentación del sitio web de la Red Nacional de Identificación Microbiológica por Espectrometría de Masas. Manual para la interpretación de resultados de MALDI-TOF MS*. Revista argentina de microbiología, 52(1), 83-84.



Scharmann, U., Verhasselt, H.L., Kirchoff, L., Buer, J., Rath, P. M., Steinmann, J., Ziegler, K. (2020). *Evaluation of two lateral flow assays in BAL fluids for the detection of invasive pulmonary aspergillosis: A retrospective two-centre study*. Mycoses, 63(12), 1362-1367.



## TRABAJO PRÁCTICO DE AULA Nº 9

### RESOLUCIÓN DE CASOS CLÍNICOS

#### OBJETIVOS

- Integrar los conocimientos teóricos individuales de las Micosis aprendidas, con el resto de las manifestaciones clínicas que pueden afectar a un/a paciente.
- Plantear diagnósticos diferenciales.
- Afianzar los conocimientos adquiridos, realizando un estudio puntual y crítico de los datos aportados, para poder obtener el diagnóstico certero del/la paciente.
- Relacionar al/la profesional bioquímico/a con el resto de los/las profesionales del equipo de salud.

#### Caso Clínico Nº 1

Paciente de sexo femenino de 22 años de edad. Como antecedentes tenía factores de riesgo para enfermedades infectocontagiosas y consumo de drogas ilícitas, causa por la cual fue hospitalizada en varias oportunidades. La última internación que refiere a meses previos fue un cuadro de derrame pleural de etiología no precisada, desconociéndose más datos de ese evento.

Ingresó a la clínica por presentar desde hace tres días fiebre, irritabilidad y somnolencia; comenzó posteriormente con vómitos explosivos y convulsión tónica. Al examen físico presentaba temperatura de 38,2 °C axilar y frecuencia cardíaca de 70/min, irregular, somnolienta, con signos meníngeos positivos y sin signos de focalización neurológica. Los exámenes de laboratorio revelaron un hemograma con 35% de hematocrito, hemoglobina 12 g/dl, 15000 leucocitos por mm<sup>3</sup>, 5% de cayados, 65% de segmentados, 20% de linfocitos, 10% de monocitos y una velocidad de eritrosedimentación (VHS) de 25 mm/h. Debido a que no se encontraba el foco y las manifestaciones neurológicas se decidió realizar un estudio de líquido cefalorraquídeo (LCR). Los resultados que arrojó el mismo fueron los siguientes: incoloro, transparente, con 60 mg/dl de proteínas, glucorraquia 20mg/dl, leucocitos 120/mm<sup>3</sup> con 70% de mononucleares, la tinción de Gram no mostró gérmenes y las pruebas de látex para *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* y *Streptococcus B* resultaron negativas.

Debido a los antecedentes de la paciente, se decidió realizar estudios de serología para hepatitis B, C y HIV. Los resultados de las hepatitis fueron negativos, pero resultado ser positivo para HIV. Obtenidos los resultados, se solicitó al laboratorio realizar la tinción de Burri al LCR, obteniendo la imagen de la Figura 1A. En el cultivo del LCR se obtuvo crecimiento de un microorganismo compatible con el observado previamente (Figura 1B). Se medica a la paciente con acyclovir y anfotericina B, evolucionando favorablemente en los días posteriores.



(A) (B)  
**Figura 1.** (A). Técnica de Burri, 400X. (B) Cultivo, 35°C, 48 hs.

Fuentes: <https://phil.cdc.gov/details.aspx?pid=3771> y

<https://www.scielo.br/j/abd/a/hPsBxf5SrXBnQx9Pq9ZJH9w/?lang=en#ModalFigfiq3-body2>

### Preguntas

1. ¿Cuál es el cuadro que afecta a la paciente? ¿Qué microorganismo es el que está involucrado?
2. ¿Cuál es la sintomatología de estos cuadros? ¿Sobre qué pacientes es más probable que se produzca?
3. Explique la técnica de Burri. ¿Qué otro nombre recibe? ¿Qué observa en la misma?
4. Indique las características de las colonias resultantes del cultivo. ¿Cuáles son las condiciones de cultivo?

### Caso Clínico Nº 2

Paciente de sexo masculino de 40 años de edad, de profesión albañil. Tiene una alimentación deficiente en cantidad y en calidad, con predominio de carbohidratos. Vive en una casa con condiciones de higiene escasas. Antecedente de Hipertensión Arterial Sistémica por línea paterna. Alcoholismo positivo desde los 15 años hasta la fecha, llegando a la embriaguez cada fin de semana. Tabaquismo positivo desde los 14 años hasta la fecha, consumiendo aproximadamente 6-7 cigarrillos diarios. Antecedente de Tuberculosis Pulmonar (TBP) diagnosticada a los 26 años, aparentemente con evolución satisfactoria. Sin demás

antecedentes de importancia para su padecimiento actual.

Inicia su padecimiento con un cuadro clínico manifestando tos productiva con expectoración hemoptoica, astenia, adinamia, hipertermia de 39°C y palidez de tegumentos. No se palpan adenopatías ni visceromegalias, el resto de la exploración física sin datos que comentar. Se solicitan exámenes de laboratorio encontrándose un hemograma con datos de Anemia Normocítica Hipocrómica, Química Sanguínea, Examen General de Orina, Cultivo y exudado faríngeo normales. Baciloscopías en serie de 5 negativas. La tomografía de tórax mostró una imagen localizada a nivel de Lóbulo Superior Derecho (LSD), redondeada, bien delimitada, de paredes definidas con presencia de opacidades heterogéneas con tendencia a la homogenización y una principal redondeada, homogénea mientras que en la parte inferior es posible encontrar un nivel hidroaéreo. El paciente es sometido a Toracotomía, encontrándose una cavidad que afectaba al LSD conteniendo material hemático, fibrinoide y mucoso de color negro. Se envía a Patología y al laboratorio de microbiología para cultivo. En el examen directo se obtienen la imagen mostrada en la Figura 2A. Luego de la incubación a 25°C durante una semana, desarrolló un microorganismo compatible con la observación del directo (Figura 2B).



**Figura 2.** (A) Azul de lactofenol, 400X. (B). Placa de cultivo (25 °C, 6 días).

Fuentes: <https://annardx.com/micosis-sistemicas-diagnostico-oportuno/> y

<https://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/4178/course/section/1584/FARMACIA%20T%20AULA%201-%20MACRO%20Y%20VEGET.pdf>

### Preguntas

1. ¿En qué pacientes se puede observar el cuadro clínico anteriormente citado? ¿Es importante la inmunidad del paciente?
2. ¿Cuál es el microorganismo causante de la patología?
3. Indique las características macroscópicas y microscópicas de este microorganismo y las condiciones de crecimiento.
4. Cuando se realiza este hallazgo, es importante repetir la muestra. ¿Por qué?

### Caso Clínico Nº 3

Paciente de sexo masculino de 60 años de edad asiste al Hospital Central por presentar un cuadro clínico de aproximadamente 4 meses de evolución, caracterizado por evacuaciones diarreicas de color chocolate con una frecuencia de 2 a 3 veces/día y que empeoraron paulatinamente en frecuencia y cantidad, haciéndose sanguinolentas en el último mes. Durante este periodo presentó pérdida de peso de 9,1 kg, fiebre, debilidad generalizada y palidez.

El paciente presenta hipertensión e insuficiencia cardiaca congestiva, niega tabaquismo, uso de drogas ilícitas, y dejó el alcohol hace 15 años. Niega enfermedades de transmisión sexual. Al presente tiene astenia, fiebre, pérdida de peso de más de 10 kg en los últimos 4 meses, presenta evacuaciones diarreicas frecuentes, sanguinolentas. A nivel pulmonar presenta buena entrada y salida de aire bilateral, sin ruidos agregados. Tiene dolor a la palpación en mesogastrio e hipogastrio. Se palpa hepatomegalia. Bazo normal. Está orientado en tiempo y espacio.

Se solicitan estudios de laboratorio, que arrojan los siguientes resultados: hemoglobina 8,6 g/dl, hematocrito 26%. Leucocitos 3300/mm<sup>3</sup>, con 63% de neutrófilos. Plaquetas 350000/mm<sup>3</sup>. Tiempo de protrombina 90% y APTT 28 segundos, fibrinógeno 340 mg/dl. Glucemia 88 mg/dl, creatinina 1,0 mg/dl, calcio 8,0 mg/l, GOT 51 U/L, GPT 34 U/L, LDH 295 U/L, Fosfatasa alcalina 398 U/L. Otras pruebas realizadas fueron: VDRL no reactivo, toxoplasmosis IgG (IFI): 1/1024. Serología para hepatitis A, B, y C: no reactivo. Citomegalovirus: reactivo. Serología para HIV: reactivo.

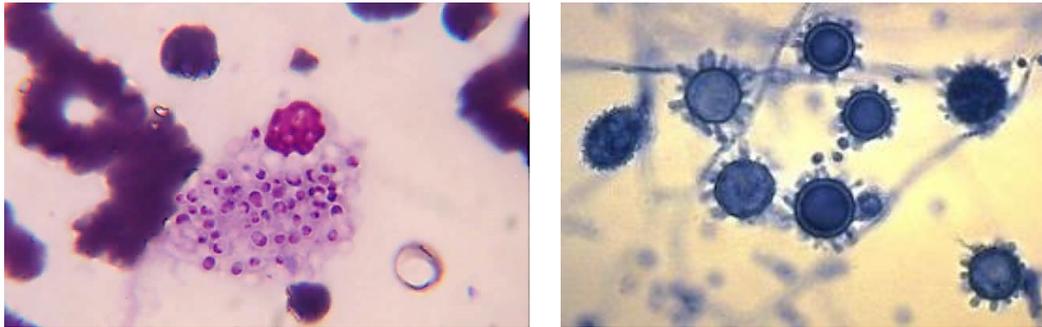
Se solicitó un estudio coproparasitológico de materia fecal cuyos resultados fueron negativos.

En la piel del paciente se observan eritemas diseminados con erupciones, de las que se realiza un raspado para cultivo y anatomía patológica. Los resultados del raspado con previa coloración de Giemsa se observan en la Figura 3A. En el cultivo se obtuvo el crecimiento de un hongo cuyas estructuras se observa en la Figura 3B.

El médico receta anfotericina B al paciente ya que las alteraciones intestinales son producto de una infección generalizada del mismo microorganismo encontrado en piel.

#### Preguntas

1. ¿Cuál es el microorganismo causante de la patología?
2. ¿Qué se observa en la Figura 3? Describa las características.
3. Describa las manifestaciones clínicas del cuadro ocasionado por este microorganismo.
4. Indique las presentaciones clínicas que puede desarrollar este microorganismo.



(A) (B)  
**Figura 3.** (A). Coloración de Giemsa, 1000X. (B). Cultivo, 400X. Fuentes: <https://piel-l.org/blog/737> y <https://www.ecured.cu/images/thumb/a/a6/Histoplasma.jpg/260px-Histoplasma.jpg>

#### Caso Clínico N° 4

Paciente de sexo femenino de 30 años de edad, presenta enfermedad de Hodgkin refractaria y necesita como tratamiento un trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica. Al ingresar al hospital, presenta fiebre, prurito y disnea, con eritema generalizado y úlceras. Luego de la quimioterapia presenta aplasia medular. Se realizan análisis de laboratorio y se toman muestras de piel para biopsia y cultivo microbiológico. La paciente se encuentra neutropénica.

Se administra preventivamente un antifúngico y se espera el resultado de los análisis microbiológicos y anátomo-patológicos. En el cultivo puede observarse las características macroscópicas de crecimiento en placa (Figura 4A) y su estructura microscópica (macroconidias) (Figura 4B).



(A) (B)  
**Figura 4.** (A). Agar papa dextrosa, 27°C, 7 días. (B) Macroconidias y clamidosporas.

Fuentes: <http://www.pf.chiba-u.ac.jp/gallery.html> y <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/6286/T19473%20GONZALEZ%20MORALES%2C%20SUSANA%20%20TESIS%20.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Se decide instaurar tratamiento con caspofungina. Se le realiza nuevos estudios de laboratorio, el hemograma muestra leucocitosis con neutrofilia y desviación a la izquierda.

Tres días después, entra en shock refractario, sufre una disfunción multiorgánica y fallece. Los hemocultivos recogidos el día del fallecimiento, tanto de sangre periférica como de sangre obtenida a través de catéter, fueron positivos tras cuatro días de incubación. Luego, en el agar glucosado de Sabouraud, se aisló un hongo filamentoso, del tipo ya estudiado.

### **Preguntas**

1. ¿Cuál es el hongo causante de la patología?
2. Describa la micromorfología de este hongo.
3. Indique la sintomatología y las distintas zonas que puede afectar.
4. ¿Qué otros hongos podrían causar esta infección en piel?

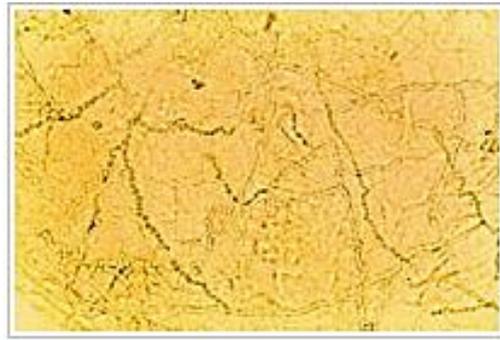
### **Caso Clínico Nº 5**

Paciente de 16 años de edad, sexo masculino. Consulta en una Clínica de la Ciudad por descamación del cuero cabelludo. La dermatosis localizada en el cuero cabelludo tiene aproximadamente un año de evolución, se caracteriza por alopecia difusa y descamación fina, presenta leve fluorescencia amarillo verdosa a la luz de Wood (Figura 5). El paciente habita una vivienda rural, tienen contacto con animales (gatos y perros). En consultas previas, el paciente fue tratado como una tiña del cuero cabelludo indicándole griseofulvina por nueve meses, sin mejoría clínica. Acude a otro facultativo realizándole una biopsia de cuero cabelludo informando dermatitis seborreica, recibiendo tratamiento local con queratolíticos, esteroides de mediana potencia y champú con imidazol.

Se solicitan estudios de laboratorio, los cuales dan resultados normales. El médico actual indica realizar un estudio micológico. Para el mismo, se extrajo con pinza pelos de la zona periférica de la lesión en la cabeza. La observación directa previo tratamiento con KOH al 20% durante una hora permitió observar la presencia de elementos indicativos de una infección fúngica (Figura 6). Se procedió al cultivo, el cual se realizó en Agar Sabouraud con Cloranfenicol y Mycosel® a temperatura ambiente, evidenciándose colonias algodonosas blancas a partir del cuarto día con pigmento amarillo naranja al reverso. Al realizar el microcultivo, se observaron abundantes aleurioconidias multicelulares (macroconidias) fusiformes con espículas en su superficie y escasas aleurioconidias unicelulares (microconidias) (Figura 7).



**Figura 5.** Luz de Wood.



(A)

(B)

**Figura 6.** (A) Pelo y (B) piel descamada con KOH 20%.

Fuente: [www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia](http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia)



**Figura 7.** Azul de lactofenol, 400X. Fuente: <https://es.wikipedia.org/wiki/Dermatofito>

El paciente recibió tratamiento con Itraconazol: 5mg/kg/día/dosis, una semana al mes durante 3-4 meses, logrando una buena evolución clínica.

### Preguntas

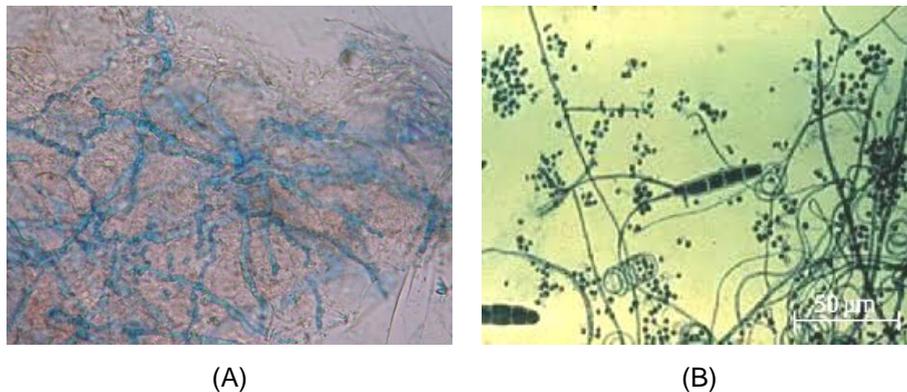
1. Indique cuál es el diagnóstico del paciente. ¿Cuáles son las características clínicas?
2. ¿Cuál es el microorganismo causante de la patología? ¿Cuál es la causa de la infección?
3. Describa qué se observa en el examen directo (Figura 6). ¿Cuál es la parasitación en el pelo?

4. Describa la morfología de las colonias en el cultivo y la micromorfología del microorganismo. ¿Qué observa en la Figura 7?

### Caso Clínico Nº 6

Paciente de sexo masculino de 10 años de edad, quién acude al Hospital por presentar una gran úlcera en cuero cabelludo. Fue hospitalizado con el diagnóstico de piodermitis, debido a la abundante secreción purulenta, signos de flogosis y fiebre, por lo que recibe antibioticoterapia sistémica por 10 días con escasa mejoría. Se solicitó valoración por parte del servicio de Dermatología y, al ser evaluado en este centro, se observó solución de continuidad con pérdida de sustancia en cuero cabelludo, acompañado además de signos importantes de flogosis y de alopecia focal en región parietal derecha. Concomitadamente, es evaluado en la consulta de Micología, donde se realiza examen directo con KOH al 10%, observando lo mostrado en la Figura 8A. Se realizó cultivo micológico, observándose colonias pulverulentas, con reverso de color marrón rojizo, por lo que se concluye el patógeno causante del cuadro al observar la morfología microscópica (Figura 8B). Se observa además compromiso ectothrix del tallo piloso.

Se inició tratamiento con griseofulvina (20 mg/kg/día), 750 mg una vez al día por 10 semanas. Se realizó control clínico y micológico hasta la curación completa. Actualmente, sólo presenta lesiones cicatriciales, con repoblación difusa del cabello terminal en área afectada.



**Figura 8.** (A) Examen directo con KOH al 10%, Azul de lactofenol. (B) Azul de lactofenol, 400X. Fuentes: <https://piel-l.org/blog/wp-content/uploads/2010/09/18.jpg> y <https://www.fmed.uba.ar/sites/default/files/2019-04/SEMINARIO%2010.pdf>

### Preguntas

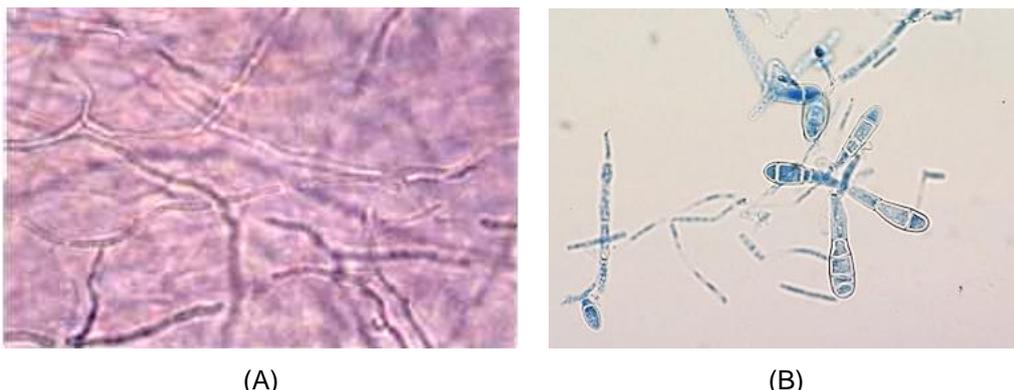
1. ¿Cuál es el patógeno involucrado en el cuadro clínico? Indique cómo realiza la toma de muestra en este caso.
2. ¿Qué observa en la Figura 8A? Describa los cuadros clínicos que puede ocasionar.

3. ¿En qué medios siembra la muestra y bajo qué condiciones? Describa las características macroscópicas de las colonias en el medio de cultivo.
4. ¿Qué observa en la Figura 8B? Describa las características microscópicas del hongo.

### Caso Clínico Nº 7

Paciente H.A. de sexo masculino de 45 años de edad, sin antecedentes clínicos de interés, sano, practica deporte con regularidad. Acude al consultorio de dermatología de la clínica para consultar por lesiones en la piel de dos meses de evolución de tipo eritematosas, descamativas y muy pruriginosas. Las lesiones se presentan en la ingle y se extienden hacia la cara interna de los muslos. Las lesiones comenzaron como pápulas foliculares con crecimiento centrífugo y evolucionaron hasta formar grandes placas de bordes sobre-elevados y coloración más intensa. Inicialmente fueron tratadas con corticoides, observando una pequeña mejoría clínica, pero al cabo de unas semanas, empeoraron. Se solicitó un estudio de la zona afectada, indicándose un examen directo, cultivo y biopsia. La observación directa se realizó previo tratamiento con KOH al 20% durante 60 minutos, visualizándose lo mostrado en la Figura 9A. Parte del material se sembró en agar Sabouraud con cloranfenicol y en agar Sabouraud con cloranfenicol y actidiona. A los 10 días de incubación crecieron colonias características de un hongo filamentoso con aspecto de dermatofito. A la observación al microscopio, se visualiza lo mostrado en la Figura 9B.

Luego de obtener el informe de laboratorio, el paciente fue tratado localmente con terbinafina, logrando en semanas una recuperación completa.



(A) (B)  
**Figura 9.** (A). Examen directo, KOH al 20%, 400X. (B). Azul de lactofenol, 400X.

Extraídas de: Ballesté y col. (2003) y <https://docplayer.es/80629307-Mohos-hialinos-monomorficos.html>

### Preguntas

1. ¿Qué agente le parece el causante más probable de estas lesiones y qué nombre recibe

- esta dermatosis? ¿Qué observa en la Figura 9A?
2. ¿Qué métodos emplearía para el correcto diagnóstico de este microorganismo? ¿Con qué otros microorganismos se realiza el diagnóstico diferencial?
  3. ¿Qué características tiene el crecimiento en cultivo? ¿Qué características microscópicas puede indicar? ¿Qué observa en la Figura 9B?
  4. ¿Qué tipo de tejido puede afectar?

### **Caso Clínico Nº 8**

Paciente de sexo femenino de 35 años de edad. Presentaba múltiples abscesos subcutáneos, por lo que comenzó a ser tratada como una posible paciente con inmunodeficiencia. Los abscesos comenzaron a aparecer hace aproximadamente 8 meses atrás de la consulta, en la región lumbar derecha, en conjunto con adenopatías en la región inguinal del mismo lado. La paciente comenzó a perder peso (10 kg en 8 meses), presentaba febrículas, adinamia y palidez progresiva sin sintomatología pulmonar. Actualmente presenta lesiones en la piel con características ulceradas. Presentaba hipoventilación pulmonar en el tercio medio de ambos hemitórax y crecimiento hepático de 2 cm. Concomitantemente con la aparición de las lesiones en piel presentó un absceso de la pared abdominal que alcanzó 9 cm de diámetro y fue drenado quirúrgicamente y analizado por anatomía patológica y cultivado.

Se realizaron estudios de laboratorio, entre los mismos un hemograma, el cual mostró los siguientes resultados: hemoglobina 9,8 mg/dl, hematocrito 36%, leucocitos 9500/mm<sup>3</sup> y plaquetas 200000/mm<sup>3</sup>. Presentó glucemia basal normal, al igual que las pruebas funcionales hepáticas y renales. La serología para hepatitis C y B resultó ser negativa, al igual que para HIV. La VDRL resultó ser positiva (2 dils), con la prueba confirmatoria positiva. La radiografía de tórax mostró infiltrados reticulares intersticiales, en ambos campos pulmonares. Se realizaron pruebas intradérmicas con aspergilina, histoplasmina, tuberculina, las cuales resultaron negativas, pero con esferulina presentó una pápula de 12 mm.

De las muestras de piel donde se encontraban las lesiones, como también del absceso extraído quirúrgicamente, se realizó un examen directo con KOH al 20%, observando lo mostrado en la Figura 10A. Días más tarde se obtuvo desarrollo en el medio de cultivo Sabouraud con cicloheximida desarrollando un crecimiento blanco, húmedo y membranoso, que luego se volvió algodonoso en la superficie del medio. El examen directo del crecimiento en el medio de cultivo y tratado con azul de lactofenol se puede observar en la Figura 10B. Luego de que el médico recibe el informe del laboratorio, comienza el tratamiento con anfotericina B durante 10 semanas, donde la paciente evoluciona favorablemente.



**Figura 10.** (A) Examen directo, KOH 20%, azul de metileno, 400X (B). Azul de lactofenol, 400X.

Fuentes: <http://rad-online.org.ar/wp-content/uploads/2021/07/v98n4a05.pdf> y <http://paholita3c.blogspot.com/2012/06/micosis-sistemicas-las-micosis.html>

### Preguntas

1. ¿Cuál es patógeno que afecta a la paciente y cuáles son los órganos afectados?
2. ¿Qué se observa en la Figura 10A? ¿Es infectante? Describa.
3. ¿Qué se observa en la Figura 10B? ¿Es infectante? Describa. Indique condiciones y medios de cultivo.
4. Describa la forma clínica de este patógeno y su epidemiología.

### Caso Clínico N° 9

Paciente masculino de 10 años, nacido en Perú. Sin antecedentes de importancia, su enfermedad actual comienza hace 6 meses, con fiebre intermitente (39 °C), hiporexia y pérdida ponderal progresiva.

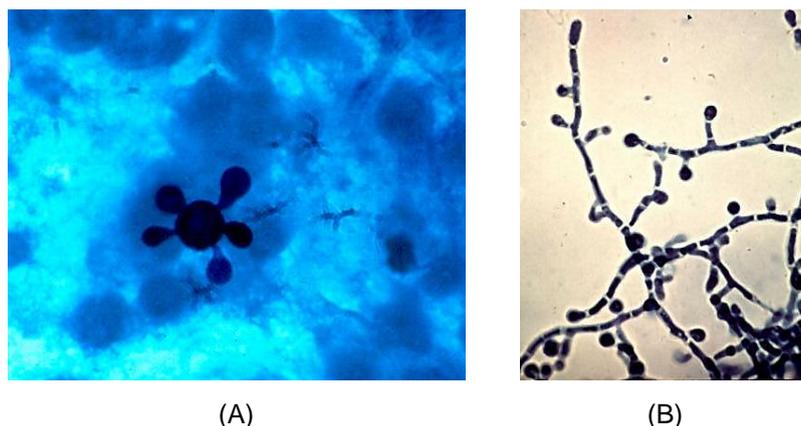
A los 3 meses de comenzar el cuadro, fue internado con un diagnóstico presuntivo de dengue clásico. Durante esta internación desarrolla linfadenopatías generalizadas, hepatoesplenomegalia y mayor compromiso general, lo cual prolonga su hospitalización por un mes, aprovechando para realizar otros exámenes auxiliares para completar el diagnóstico. Se realizó una laparoscopia exploratoria donde evidencian linfadenopatías intra-abdominales, retroperitoneales y visceromegalia, realizándose toma de biopsia hepática y de ganglios intra-abdominales. En el post-operatorio inmediato se le diagnostica clínicamente una neoplasia avanzada metastásica, indicándosele quimioterapia, que es rechazado por los padres del menor.

La evolución del paciente fue progresivamente deteriorante, presentando a los 5 meses de comenzar el cuadro lesiones papulares múltiples, algunas umbilicadas, otras ulceradas y costrosas, distribuidas en todo el cuerpo y predominantemente en cara y cuello; además progresa con disnea a moderados esfuerzos y edemas periféricos. En el examen físico de ingreso, encontramos un paciente taquicárdico, polipneico, adelgazado, con lesiones

papulares de centro deprimido tipo molusco predominantemente en cara, algunas ulceradas y costrosas y distribuidas de forma difusa en tórax, abdomen y extremidades. Además, linfadenopatías cervical, axilar e inguinal, bilaterales, de más de 0.5 cm, móviles y dolorosas. Presentaba también distensión abdominal con dolor a la palpación y hepatoesplenomegalia. El examen del sistema neurológico no mostró alteraciones.

La radiografía de tórax presentaba infiltrados peri-hiliares bilaterales, además de cardiomegalia e imágenes radiolúcidas múltiples en huesos largos. La ecografía abdominal mostró bazo e hígado aumentados de tamaño. El perfil hematológico mostró anemia moderada microcítica e hipocrómica (hematocrito en 25.4%), leucocitosis (11100 células/mm<sup>3</sup>) y eosinofilia marcada (14%); en el perfil bioquímico se observó fosfatasa alcalina en 2116 UI, proteínas totales 6.8 g/dl, albumina 2.0 g/dl, glicemia, uremia y examen de orina normales. Las pruebas de ELISA para VIH y VDRL fueron no reactivas. Se solicitó un examen directo con KOH al 20% de las lesiones cutáneas, obteniéndose la imagen mostrada en la Figura 11A. Se realizaron también directos de esputo y orina, ambos negativos. En la biopsia de piel se observaban, en regular cantidad, unas estructuras levaduriformes tanto en la dermis papilar como reticular. Se solicitó cultivar las muestras derivadas de las lesiones cutáneas, para ello se utilizó agar Sabouraud glucosado adicionado de antibióticos, a 25°C durante 45 días, luego se realiza la observación microscópica de la colonia desarrollada (Figura 11B).

El paciente recibió tratamiento endovenoso con anfotericina B (0.7mg/kg/día) por un mes, el cual fue interrumpido debido a alteraciones en la función renal y posteriormente continuó con itraconazol 200mg/día (10mg/kg/día). Permaneció hospitalizado por tres semanas, siendo dado de alta con evolución favorable.



(A) (B)  
**Figura 11.** (A). Directo con KOH al 20%. (B). Observación del cultivo, 100X.

Fuentes: <http://saber.ula.ve/tropical/contenido/capitulo2/capitulo17/figuras/17-0003.jpg> y [https://botit.botany.wisc.edu/toms\\_fungi/images/paraco2.jpg](https://botit.botany.wisc.edu/toms_fungi/images/paraco2.jpg)

### Preguntas

1. ¿Cuál es el patógeno que está desencadenando el cuadro? Indique su epidemiología.  
 Año 2024

2. Describa el cuadro clínico de la patología.
3. ¿Qué observa en el directo de la lesión cutánea mostrada en la Figura 11A? Indique características del microorganismo.
4. ¿Qué se observa en la Figura 11B? Dé características de las colonias desarrolladas en cultivo.

### **Caso Clínico N° 10**

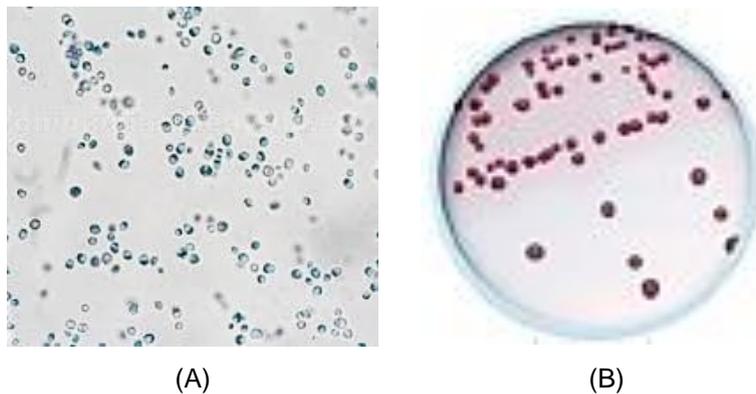
Paciente de sexo femenino de 10 años de edad realiza una consulta externa de dermatología en el Hospital por presentar, en la cavidad oral y labios, placas blanquecinas que cubren el centro y los bordes de la lengua, así como ambas comisuras labiales; al remover estas placas se observa eritema y fisuras en la mucosa. No se encuentran signos clínicos de hipoparatiroidismo o enfermedad de Addison. Desde los 2 meses de edad, ha requerido atención hospitalaria por diarrea, gastroenteritis aguda, neumonía y desnutrición moderada, con múltiples hospitalizaciones. Los análisis de laboratorio informan anemia crónica y parasitismo intestinal. El examen de ELISA para virus de la inmunodeficiencia humana resultó negativo. La paciente es la segunda de tres hermanas y tiene dos hermanos mayores; padres y hermanos son sanos. No se encontró evidencia de infecciones cutáneas a repetición o endocrinopatías en abuelos y tíos de la paciente.

Ante una posible inmunodeficiencia primaria, específicamente una Citotoxicidad mediada por células, se indican estudios inmunológicos. La citometría de flujo informa niveles séricos bajos de linfocitos T y células NK, que repercuten en el número total de linfocitos; las concentraciones séricas de linfocitos B son normales. El déficit en la inmunidad mediada por células se constata también a través de una prueba de candidina, que denota ausencia de induración, tanto a las 48 hs como a la semana de haberse aplicado; iguales resultados se observaron con la prueba de tuberculina a las 48 hs de aplicación. Los niveles séricos de IgA, IgE y IgM son normales, y los de IgG altos. Las concentraciones séricas de electrolitos: sodio, potasio, cloro, calcio, fósforo, así como las pruebas de función renal y la transaminasa glutámico-pirúvica, son normales. Los estudios clínicos confirman la sospecha diagnóstica de una citotoxicidad mediada por células, específicamente por déficit de linfocitos T y células NK.

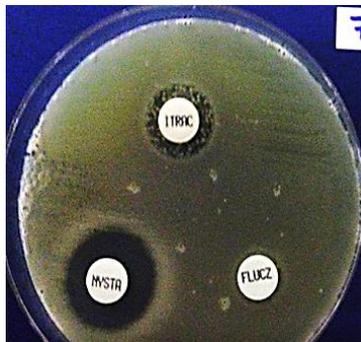
Se realiza un hisopado de la lesión de la boca y comisuras labiales. Uno de los hisopos se impronta en un portaobjeto y se coloca solución fisiológica para observación directa (Figura 12A). El otro hisopo se cultiva en medios adicionados o no de antibióticos. En 24 hs se observa crecimiento de colonias compatibles con una levadura. Se realiza una prueba de filamentación en tubo, la cual da negativa, y se informa al médico.

Se indica itraconazol 100 mg por vía oral, una vez al día, por dos meses, y nistatina 1000000 U/ml vía oral, 4 veces día, resolviéndose las lesiones cutáneas y orales.

Aproximadamente un mes después de terminado el tratamiento con itraconazol, reapareció la candidiasis oral. Se realiza nuevamente el cultivo, el cual da una colonia de similares características, pero esta vez se siembra en un agar cromogénico (Figura 12B); debido al resultado obtenido, se realiza un antifungigrama (Figura 13). Se realiza un cambio de tratamiento a caspofungina, durante 30 días, revirtiendo el cuadro, pero al cabo de dos años volvió a tener otro episodio, respondiendo satisfactoriamente.



**Figura 12.** (A). Examen directo de la lesión, 100X. (B). CHROMagar™: colonias de color rosa viejo.  
Fuentes: <https://www.udea.edu.co/wps/portal/udea/web/inicio/unidades-academicas/microbiologia>.  
CBS Vaginal specimen collections (Belgium)



**Figura 13.** Antifungigrama: resistencia a azoles.

Fuente: <https://todos.cicese.mx/imagenes/internas/p1150beid51qthj1do3m114ktqf7.jpg>

### Preguntas

1. ¿Cuál es el microorganismo causante del cuadro clínico? Escriba las posibles especies que podrían ser responsables.
2. ¿Cuáles son los cuadros clínicos que puede ocasionar este género?
3. Describa los estudios micológicos a realizar y las características morfológicas tanto micro como macroscópicas de las colonias. ¿Qué otras pruebas se pueden realizar para llegar a la especie? ¿Qué observa en la Figura 12?
4. ¿Qué importancia tiene llegar al género y especie en este caso? ¿Qué observa en la Figura 13?

## BIBLIOGRAFÍA

Arenas Guzmán, R. y Torres, E. (2019). *Micología Médica Ilustrada*. Sexta Edición. Mc-Graw Hill Interamericana, ISBN: 978-607-15-1424-0.

Murray, P.R., Rosenthal, K., Pfaller, M.A. (2017). *Microbiología médica*. Novena Edición. Elsevier Health Sciences.

### Páginas web

Ballesté, R., Mousqués, N., Gezuele, E. (2003). *Onicomycosis: Revisión del tema*. Revista Médica del Uruguay, 19(2), 93-106.

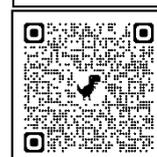
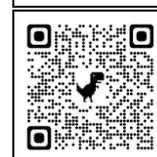
<https://www.rmu.org.uy/revista/2003v2/art3.pdf>

Carrol, K.C., Morse, S.A., Mietzner, T., Miller, S. (2016). *Microbiología médica de Jawetz, Melnick & Adelberg*. 27ma edición. McGraw Hill Education.

<https://bibliotecaia.ism.edu.ec/Repo-book/m/MicrobiologiaMedica.pdf>

Zurita Macalupú, S.R. y Urcia Ausejo, F.C. (2017). *Atlas para el diagnóstico micológico*. Ministerio de Salud, Perú. ISBN: 978-612-310-116-9.

[https://antimicrobianos.ins.gob.pe/images/contenido/documentos/nacionales/ATLAS PARA DX MICOLOGICO INS PERU.pdf](https://antimicrobianos.ins.gob.pe/images/contenido/documentos/nacionales/ATLAS_PARA_DX_MICOLOGICO_INS_PERU.pdf)



**TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N° 10**  
**CONSULTA OBLIGATORIA PREVIA AL TP INTEGRAL**

**OBJETIVOS**

- Afianzar los conocimientos adquiridos durante la cursada mediante la observación simultánea de diversos preparados en fresco y fijados de cultivos provenientes de las distintas secciones o géneros de hongos aprendidos en los Trabajos Prácticos.
- Integrar los conocimientos mediante la observación de las principales características microscópicas que distinguen a estas secciones/géneros de hongos de interés clínico.

**ACTIVIDADES A DESARROLLAR**

- Observación de preparados en fresco y fijados provenientes de cultivos de las secciones o géneros de hongos estudiados en los TP anteriores a modo de revisión.
- Descripción de las principales características macroscópicas y microscópicas que permiten diferenciarlos entre sí.

**Recomendación:**

- Dibujar en un papel o sacar fotografías de todas las estructuras que permitan diferenciar entre las distintas secciones o géneros de hongos abordados.
- Estas imágenes serán de suma utilidad como repaso para el Trabajo Práctico Integral y para las demás instancias de evaluación ;)

**TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N° 11**

**TRABAJO PRÁCTICO INTEGRAL**

**OBJETIVOS**

- Evaluar el proceso de aprendizaje de los/las estudiantes del Curso mediante la observación de diversos preparados en fresco y fijados. El/la alumno/a deberá ser capaz de analizar diferentes muestras micóticas en el laboratorio y arribar a la identificación de las mismas.

**ACTIVIDADES A DESARROLLAR**

- Se realizará la observación de un determinado número de preparados en fresco y fijados.
- Cada preparado -sin rotular- deberá ser identificado por el/la estudiante, el/la cual asignará una sección o género de hongo según corresponda, justificando esta decisión en base a las características principales que permiten diferenciarlos entre sí.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Arenas Guzmán, R. y Torres, E. (2019). *Micología Médica Ilustrada*. Sexta Edición. Mc-Graw Hill Interamericana, ISBN: 978-607-15-1424-0.
- Bonifaz, A. (2015). *Micología Médica Básica*. Quinta Edición. Mc-Graw Hill Interamericana, ISBN: 978-607-15-1270-3.