



Material
Didáctico
para Estudiantes

GUÍA DE TRABAJOS PRÁCTICOS:
Micología

FQByF

Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia



Universidad Nacional
de San Luis

SERIE DIDÁCTICA: MATERIAL DIDÁCTICO PARA ESTUDIANTES

Guías de Trabajos Prácticos: Micología

Esp. Luis Ernesto GONZÁLEZ CRISTÓFANO

Dra. Alicia Viviana LAPIERRE

Esp. Graciela Beatriz RODRÍGUEZ

Esp. Verónica Ester AMPUERO

Esp. GERMÁN DARÍO RONCHI

Mg. Ricardo Ariel FLORIDIA

FACULTAD DE QUÍMICA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN LUIS

2020

Decana

Dra. Mercedes Edith CAMPDERRÓS

Vice Decana

Dra. Lucía Beatriz FUENTES

Secretaria académica

Dra. Estela Isabel GASULL

Comisión de la Serie Didáctica

Coordinadora

Dra. María Cristina ALMANDOZ

Integrantes

Departamento de Bioquímica
y Ciencias Biológicas

Dra. Susana I. SÁNCHEZ

Dra. Verónica P. FILIPPA

Departamento de Farmacia

Dr. Luis A. DEL VITTO

Dra. Alejandra O. MARIA

Departamento de Química

Dra. Yamina A. DÁVILA

Dra. María de los Ángeles ÁLVAREZ

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 estudios 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 acorde 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/mda.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.

GUÍA DE ESTUDIO PARA TRABAJOS PRÁCTICOS DE MICOLOGÍA

PRESENTACIÓN DEL CURSO DE MICOLOGÍA

El presente material está dirigido a los alumnos 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 11/10-CD.

Durante el curso los alumnos concurren a una clase teórica de 2 hs. y un trabajo práctico de laboratorio y/o aula de 2 horas por semana, el crédito horario total es de 60 horas cuatrimestrales durante las 15 semanas que dura dicho periodo.

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. Tienen no solo importancia médica sino también social y económica.

Los alumnos adquirirán conocimientos sobre las micosis más comunes producidas en el hombre, 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 a los estudiantes la concurrencia a clases de consulta que los docentes ponen a su disposición y que darán una mejor perspectiva a los temas.

En la asignatura se trata de enriquecer la formación del futuro Licenciado en Bioquímica, haciéndolo no solo un efector de técnicas, sino un profesional formado y preparado para formar parte del equipo de salud, dándole las herramientas que lo distinguen como un posible referente. Asimismo debe considerarse que el estudiante

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 el estudiante se familiarice 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, con el fin de orientarlo.

El equipo docente de la asignatura, está constituido por los siguientes docentes:

- Profesor Responsable: ***Esp. LUIS ERNESTO GONZÁLEZ CRISTÓFANO***
- Profesora Co-Responsable: ***Dra. ALICIA VIVIANA LAPIERRE***
- Jefa de Trabajos Prácticos: ***Esp. GRACIELA BEATRIZ RODRÍGUEZ***
- Jefa de Trabajos Prácticos: ***Esp. VERÓNICA ESTER AMPUERO***
- Jefe de Trabajos Prácticos: ***Esp. GERMÁN DARÍO RONCHI***
- Jefe de Trabajos Prácticos: ***Mg. RICARDO ARIEL FLORIDIA***

PLAN DE TRABAJOS PRÁCTICOS

-Trabajo Práctico N° 1

Toma de muestras y procesamiento de las mismas

- 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

Técnicas de siembra y aislamiento

-Técnicas de siembra y aislamiento. Medios de cultivo. Procesamiento de muestras clínicas. Micro cultivos.

-Trabajo Práctico N° 3

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° 4

Identificación de levaduras de interés médico

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

-Trabajo Práctico N° 5

Micosis superficiales

-Identificación macro y microscópica de las principales especies causantes de estas patologías.

-Trabajo Práctico N° 6

Aspergilosis

-Diferenciación de las principales especies causantes de esta micosis.

- Trabajo Práctico N° 7

Casos clínicos de micosis

-Resolución de problemas clínicos reales y adaptados.

-Trabajo Práctico N° 8

Consulta obligatoria previa al trabajo práctico integral

-Revisión de lo observado en los trabajos prácticos precedentes.

-Trabajo Práctico Nº 9

Trabajo práctico integral.

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

ÍNDICE

Instructivo para alumnos. Hábitos personales y prácticas operativas seguras en laboratorio.	Página 2
Toma de muestras. Procesamiento y preparación de muestras micológicas. TP°1	Página 5
Preparación de materiales, medios de cultivo, soluciones y colorantes utilizados en micología TP N° 2	Página 12
Técnicas de siembra y aislamiento. TP°3	Página 17
Técnicas de Observación. Identificación. TP°4	Página 23
Micosis Superficiales. TP°5	Página 36
Levaduras de interés médico. TP°6	Página 47
Aspergilosis. TP°7	Página 57
Resolución de casos clínicos de Micosis. TP°8	Página 70

INSTRUCTIVO PARA ALUMNOS. HÁBITOS PERSONALES Y PRÁCTICAS OPERATIVAS SEGURAS EN 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 DEL ALUMNO EN EL LABORATORIO

- 1.- En todos los casos los alumnos 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 alumnos trabajar solos fuera de las horas normales previstas.
- 3.- Se recomienda trabajar con orden y método, manteniendo las mesadas libres de elementos innecesarios. Los artículos personales: mochilas, camperas, paraguas, etc. 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 de la cátedra.
- 6.- Las alumnas/os que posean cabellos largos deben usarlo recogido durante las actividades prácticas.
- 7.- No se debe pipetear ni probar sustancias con la boca, para tal fin se debe usar pro pipetas.
- 8.- No se deben oler las placas con cultivos.
- 9.- Es obligatorio el uso del guardapolvo en el laboratorio y guantes de látex.
- 10.- No está permitido descartar ningún tipo de sustancia líquida o sólida sin consultar previamente al encargado del trabajo práctico a cargo.
- 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 del jefe de Trabajos Prácticos quien indicará cómo proceder.
- 13.- Lavarse las manos después de finalizar el Trabajo Práctico y luego de toda operación que haya comportado posible contacto con material irritante, cáustico, tóxico o patógeno.

- 14.-Conectar equipos a la red eléctrica previo 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 de muestras de tubos de ensayo, vasos etc., para evitar proyecciones sobre uno mismo u otra persona. Evitando de esta forma 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 responsable del laboratorio.
- 8.- No dejar envases abiertos.

C.-NORMAS DE DESECHO DE RESIDUOS EN EL LABORATORIO

- a.- pueden desecharse por la cañería: los residuos hidrosolubles, dejando correr el agua en volúmenes muy superior al desechado. No arrojar productos no biodegradables.
- b.- no pueden desecharse por la cañería mezclas o compuestos insolubles que puedan producir bloqueo de las cañerías. Sustancias químicas de alta toxicidad.
- c.- los residuos potencialmente patógenos se deben desechar en bolsas rojas colocadas en recipientes provistos para tal fin.

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.

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.

Trabajo Práctico de Laboratorio Nº 1

TOMA DE MUESTRAS Y PROCESAMIENTO DE LAS MISMAS

OBJETIVOS:

El presente trabajo práctico capacitará al alumno en los siguientes ítems:

- 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 TEORICA:

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 de realizar una buena toma de muestra.

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

Toma de muestra

Para lograr a 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, para aumentar la posibilidad de observar y recuperar al agente causal.
2. Es necesario recoger las muestras asépticamente, utilizando contenedores estériles, remitirlas al laboratorio antes de 2 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. En situaciones que requieran un estudio epidemiológico, debe establecerse la necesidad de una toma de muestras ambientales, familiares o animales.
7. El recipiente se identificará con los datos del paciente (nombre y localización), y debe protegerse para que no se rompa en su transporte al laboratorio.
- 8- Las muestras deben ir acompañadas obligatoriamente del pedido médico, en el cual, al menos, debe hacerse constar la siguiente información: datos del 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; datos del médico solicitante.
9. Al laboratorio se le debe informar de la probable presencia de hongos peligrosos. También si se sospecha la presencia de hongos con requerimientos especiales, *Malassezia* spp, por ejemplo, así como de viajes u origen de 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 paciente previo a la toma de la muestra en las micosis superficiales

- 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 los dos días previos a la extracción de la muestra
- 4) Baños con agua y sal y cepillados 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 previa a la toma de muestra

Antes de realizar la toma de muestras 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 afectas emiten una fluorescencia brillante verdosa amarillenta (pudiendo poner de manifiesto lesiones no perceptibles a simple vista).

Toma de muestras en las diferentes micosis superficiales			
Localización de la micosis		Procedimiento	Materiales a emplear
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	Onicolísis 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 SUBCUTANEAS

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 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 SISTEMICAS O BRONCOPULMONARES ENDEMICAS

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

Secreciones respiratorias: pueden obtenerse por expectoración espontánea (Esputo), expectoración inducida con solución fisiológica (Esputo Inducido), Lavado bronquial o Lavado broquioalveolar

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 que 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 seleccionar la parte más representativa. Buscándose 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 (1500xg durante 10 minutos) 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, (mezclada con igual volumen de la muestra y dejándola actuar a temperatura ambiente hasta que se consiga la fluidificación), posteriormente puede concentrarse la muestra por centrifugación.

Líquidos orgánicos (LCR, PLEURAL, PERITONEAL, ARTICULAR, etc.) Deben concentrarse por centrifugación (1500-2500xg durante 10 min.) o filtración (0,2 µm de poro), siempre que haya suficiente cantidad. Sembrar 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.

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 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 10 x y 40 x. 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 y 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 neoformans* y la diferenciación de este hongo con los elementos celulares en la muestra.

Microscopía previa coloración

No existen coloraciones específicas para hongos, aunque algunas permiten una mayor visualización de los mismos.

Las coloraciones de rutina empleadas en el laboratorio de micología incluyen: Gram, Kinyoun o Ziehl-Neelsen y Giemsa a las que puede agregarse la coloración de Gomori-Grocot y Azul de Toluidina para la visualización de *Pneumocystis* spp.

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 a saber:

Velocidad de crecimiento de los hongos		
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 cultivos, para la identificación del mismo se procede a la observación de las características macro y micromorfológicas de las colonias (ver práctico 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 observaran videos descriptivos y se simulara la toma de muestras de lesiones en distintas localizaciones de la piel en hipotéticas lesiones por hongos.

BIBLIOGRAFÍA

-R. Arenas Guzmán. Micología Médica Ilustrada (2014) Quinta Edición. Mc-Graw Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V., ISBN: 978-607-15-1125-6.

Trabajo Práctico de Laboratorio Nº 2

PREPARACION DE MATERIALES, MEDIOS DE CULTIVO, SOLUCIONES Y COLORANTES UTILIZADOS EN MICOLOGIA

OBJETIVOS:

El presente trabajo práctico capacitará al alumno en los siguientes ítems:

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

INTRODUCCION TEORICA:

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 paciente.

Materiales utilizados en micología:

Hisopos: Se utilizan para toma de muestras, 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 muestras, 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, comercialmente se proveen estériles.

Pipetas: Es conveniente disponer de distintos volúmenes de pipetas estériles cuando se necesita 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:

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.

Agar lactrimel

Medio utilizado para facilitar la fructificación de hongos filamentosos. Muy útil para observar la micro-morfología de dermatofitos.

Miel de abeja:.....2 g

Leche descremada:.....40 ml

Harina común:.....4 g

CO₃Ca:.....0,5 g

Agar:.....4 g

H₂O destilada:.....200 ml

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

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.

Papa:.....40 g
Glucosa:.....2 g.
Agar:.....4 g.
H₂O destilada:.....200 ml

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

Medio comercial: Disolver 7,8 gr. del polvo en 200 ml de agua destilada. Dejar reposar 5 minutos. Calentar hasta ebullición con agitación continua para disolución total. Distribuir en recipientes apropiados. Esterilizar en autoclave 15 minutos 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.

Agar Czapek - Dox

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

Medio deshidratado comercial:.....9,6 g.
H₂O 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.

Agar semillas de girasol

Medio selectivo y diferencial para el aislamiento de *Cryptococcus neoformans*.

Extracto de semillas de girasol:.....60 ml
Glucosa:.....0,2 g..
Agar:.....4 g.
H₂O destilada:.....140 ml

Suspender los componentes en el agua destilada, esterilizar 15 minutos 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.

Extracto de semillas de girasol

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

Mueller Hinton 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 DE ANTIBIÓTICOS PARA USO EN MICOLOGÍA

Gentamicina

Llevar los 80 mg contenidos en la ampolla a 4 ml de volumen final con agua destilada. Fraccionar en tubos de a 1 ml rotulados y conservar en freezer.

Utilizar un tubo por cada 200 ml de medio preparado. (Concentración final 100 µg/ml)

Ampicilina

Disolver el contenido de un frasco de droga (1000 mg) en 5 ml de agua destilada (200000 µg/ml). Tomar 1 ml de esta solución y llevar a 10 ml con agua destilada (20000 µg/ml).

Fraccionar en tubos de a 1 ml rotulados en el freezer. Utilizar 1 tubo cada 200 ml de medio preparado. (Concentración final 100 µg/ml)

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y COLORANTES

Hidróxido de potasio 20%

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

KOH:.....2 g.

H₂O destilada:.....10 ml

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

Lactofenol azul de algodón

Utilizada para la observación de los componentes fúngicos y 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

Acido láctico:.....20 ml

Cristales de fenol:.....20 g.

H₂O 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.

EFFECTOS SOBRE LA SALUD DEL FENOL:

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.

2.- Crónicos: Alteraciones hepáticas, renales y cardiacas. Dermatitis de contacto y decoloración de la piel.

PRECUACIONES DURANTE SU MANIPULACIÓN:

Evitar la inhalación de los vapores. Los lugares en donde se manipulen estos productos deben estar acondicionados según lo dispuesto en la IOP SQ 17 (a). Si a pesar de todo puede persistir su presencia, se deberá utilizar protección respiratoria provista del adecuado filtro, de acuerdo con la IOP SQ 18 (a).

Cuando se vayan a manipular estos productos, utilizar siempre la protección ocular recomendada en la IOP SQ 15 (a), así como guantes indicados en la IOP SQ 16 (a).

Mantenerlos en envases cerrados, en lugar fresco y bien ventilado, evitando que les dé la luz directamente.

Azul de metileno 1% en solución acuosa

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

Azul de metileno:.....0,1 g.

H₂O destilada:.....10 ml

ACTIVIDADES A DESARROLLAR:

Se procederá a la preparación del material de vidrio para su posterior esterilización:

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

Envolver adecuadamente con papel adecuado y esterilizar en autoclave 15 minutos a 121°C.

Preparar los medios de cultivo descritos en el apartado introducción teórica y esterilizar en autoclave 15 minutos a 121°C.

BIBLIOGRAFÍA

-R. Arenas Guzmán. Micología Médica Ilustrada (2014) Quinta Edición. Mc-Graw Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V., ISBN: 978-607-15-1125-6.

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

-Pemán J, Martín Mazuelos E, Rubio MC. (Eds). Guía práctica de identificación y diagnóstico en Micología Clínica. 2ª edición (2006) Revista Iberoamericana de Micología.

-Introducción a la Micología Médica. Dr. Amadeo Javier Bava. Acta bioquímica Clínica Latinoamericana, (2002) Suplemento 4. ISSN 0325-2957

-Universitat Politècnica de Valencia Servicio Integrado de Prevención y Salud Laboral https://www.spri.upv.es/IOP_SQ_33.htm

Trabajo Práctico de Laboratorio Nº 3 TÉCNICAS DE SIEMBRA Y AISLAMIENTO

OBJETIVOS:

El presente trabajo práctico capacitará al alumno en los siguientes ítems:

- 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 aislamientos de microorganismos.
- Adquirir destreza en la generación de microcultivos y conocer su utilidad.

INTRODUCCIÓN TEORICA:

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 30° 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 punta, ansa, 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.

Tubos sin inclinar: Se siembran introduciendo una punta en el centro del agar. También se llama siembra por picadura.

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 donde se encuentran de 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.

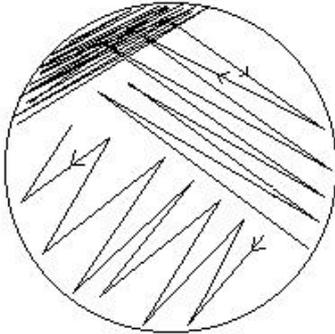
El aislamiento se puede lograr directamente a partir de una muestra cuando el o los microorganismos están en una proporción adecuada.

Para aislar se utiliza alguno de los siguientes procedimientos:

Aislamiento por 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 de los cuales contiene 10 ml de un medio de agar adecuado, se calienta en baño de agua para fundir el agar. Enfriar el contenido de los tubos a 45° C; se añade al primero de ellos un volumen de 1ml del material que contiene la levadura agitando cuidadosamente, se lleva 1 ml a un segundo tubo y el resto se vierte asépticamente en una placa de Petri; se agita el segundo tubo y se separa 1 ml para el tercero, vertiendo el resto en la placa de Petri. Se continúa del mismo modo hasta obtener 4 o 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 para efectuar el recuento. (Fig. 2)

Aislamiento por agotamiento en superficie: Existen distintas técnicas, el objeto es obtener colonias aisladas. Una de ellas 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 estria el resto de la

superficie sin sembrar (ver figura 1). La placa también se puede dividir en cuadrantes sembrado en cada uno de ellos sin volver a cargar el ansa.



Aislamiento por agotamiento (Figura 1)

Aislamiento por siembra espontánea: Permite obtener la flora micológica del aire de una localidad o ambiente. Se colocan placas con medio de cultivo Sabouraud-glucosa abiertas en los lugares apropiados. Al cabo de un intervalo de tiempo variable (5-15-30 minutos), 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, se pueden realizar repiques de las colonias que nos interesen para trabajar con un hongo determinado.

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, se homogenizan, se dejan solidificar y se incuban a la temperatura adecuada. Esta técnica se realizará en el laboratorio.

Métodos especiales de aislamiento

Recurriendo 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 incuban a 28 ° C durante 15 a 30 días, trasladando luego los pelos con los hongos queratinofílicos a un medio de cultivo adecuado.-

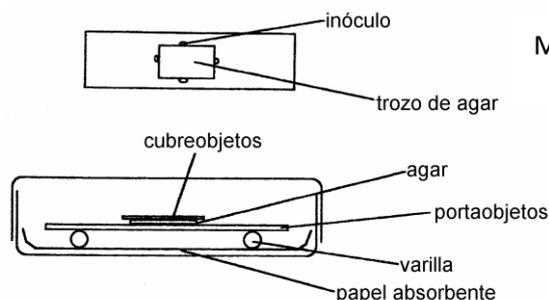
Microcultivo

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

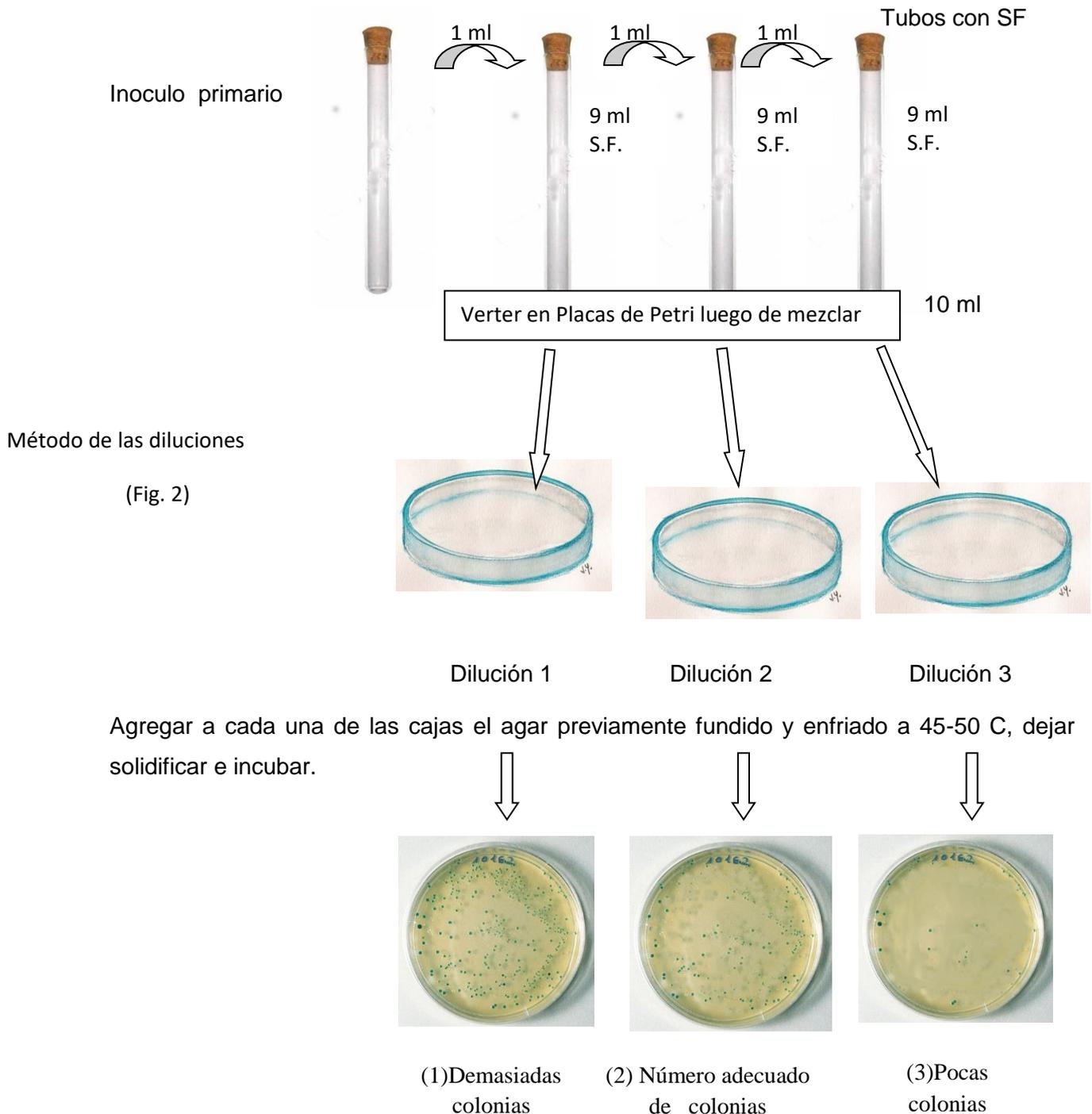
A-Cultivos de adhesión:

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 caja 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 ancha aguja estéril se remueven porciones pequeñas de colonia de hongos que se desea estudiar y se inocula en los cuatro 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 incuban. 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 color claro. (Fig. 3)

B- Cultivo en lámina gelatinosa: En una placa de Petri estéril colocar los soportes y un portaobjeto previamente flameado. Depositar sobre el porta 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 caja 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.



Microcultivo (Fig. 3)



Siembra de colonia gigante:

Sembrar con ansa aguja en el centro de botellas utilizadas en los hemocultivos o tubos de ensayos con el medio dispuesto en pico de flauta, también se pueden usar cajas 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 ó 4 días y luego cada semana, durante un mes.

ACTIVIDADES A DESARROLLAR:

Con las muestras de hongos suministradas, procederán a trabajar de la siguiente manera:

- Siembra por estrías en caja de Petri y pico de flauta.
- Método de diluciones para recuento de colonias (trabajar con hongos levaduriformes).
- Siembra espontánea en algún ambiente cercano al laboratorio (por ej. baños, aulas, etc.)
- Preparación y siembra de microcultivos.
- Siembra de colonia gigante (trabajar con hongos filamentosos)

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

- R. Arenas Guzmán. Micología Médica Ilustrada (2014) Quinta Edición. Mc-Graw Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V., ISBN: 978-607-15-1125-6.
- Pemán J, Martín Mazuelos E, Rubio MC. (Eds). Guía práctica de identificación y diagnóstico en Micología Clínica. 2ª edición (2006) Revista Iberoamericana de Micología.
- De Hoog GS, Guarro J. Atlas of clinical fungi. Centralbureau voor Schimmelcultures/ Universitat Rovira y Virgili. Baarn and Delf, The Netherlands (2000), Universitat Rovira y Virgili, Reus.

Trabajo Práctico de Laboratorio Nº 4 TÉCNICAS DE OBSERVACIÓN

OBJETIVOS:

Con el siguiente práctico el alumno obtendrá la capacidad de:

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

INTRODUCCIÓN TEORICA:

La micología es esencialmente descriptiva. El estudio y clasificación de los hongos se hace, pues, en base a los caracteres:

Morfológicos macroscópicos del desarrollo del hongo.

1. Morfológicos 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 macro-morfología 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.

2. 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.

a. Observaciones con lupa: Permiten la observación de hongos de grandes dimensiones, sin necesidad de recurrir a técnicas más complejas.

b. Observaciones microscópicas directas: se efectúan con material entre porta y cubreobjeto, tomando una pequeña cantidad de material que se deposita sobre el portaobjeto. Se puede usar una gota de líquido de montar (ver más adelante), o solución fisiológica, agua destilada, 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 al estado vivo.

Las preparaciones para las observaciones microscópicas directas pueden realizarse por:

1) Disociación:

Preparaciones directas por 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 de 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 a seco de menor y mayor aumento.

2) Impresión:

Preparaciones directas por 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 portas. Se presiona igual que en el caso anterior.

Para efectuar la coloración, se deja secar previamente a temperatura ambiente y recién se colorea. A 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:

-Líquido de montar de Patterson

- Sol. de acetato de K al 2%.....50 ml.
- Glicerina.....20 ml.
- Alcohol.....30 ml..
- CuSO₄.....c.s.p.
- colorear

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.

-Colorante de Gueguen

- Ácido láctico.....100 ml.
- Sudan III.....0,1gr.
- Azul de algodón.....0,1gr.
- 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 hs. filtrar y agregar el Azul de algodón y la solución de Yodo.

Algunos elementos del hongo aparecen así muy bien diferenciados y coloreados. Las grasas aparecen 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.

-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, producen colonias en 1 a 5 días.
2. Los hongos patógenos dimorfos 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 que: 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, veloso, algodonoso, yesoso.

Morfología macroscópica

Sobre medios de cultivo generales se deberá tener en cuenta:

1. 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

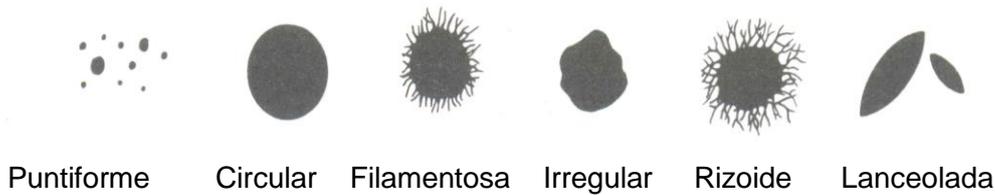
Consistencia:

Viscosa, mantecosa, friable (se disgrega al tocarla), dura.

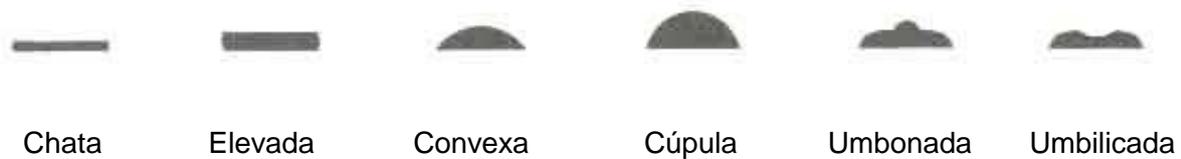
Densidad (con luz a través de la colonia):

Opaca, Transparente, Traslúcida

Forma:



Elevación:



Margen:



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 $K(OH)$ 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 cubreobjetos sobre la gota y se deja reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. 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 doblez 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
- 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 immitis*)
- Blastosporas (Ej. levaduras)
- Clamidiasporas (Ej. *Cándida albicans*)
-

Identificación preliminar de cultivos de hongos

Para la identificación de un moho se precisa una descripción completa del organismo. Para estudiar sus características, se prefiere el medio de Czapeck que es un medio satisfactorio y da muy buenos resultados con fines comparativos para *Penicillium* y *Aspergillus*.

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 veloso o acordonado, mientras que las levaduras producen colonias mantecosas con superficies lisas.

Las colonias individuales desarrolladas en el medio Czapeck, 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

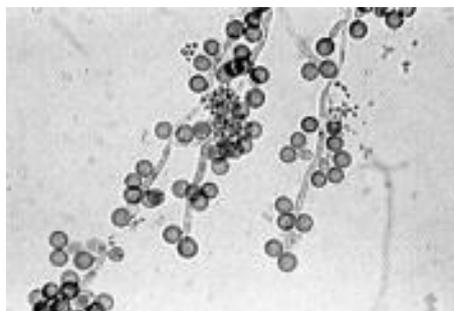
Invirtiendo la placa de Petri puede observarse el color del fondo de la colonia, así como cualquier coloración producida en el medio.

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.

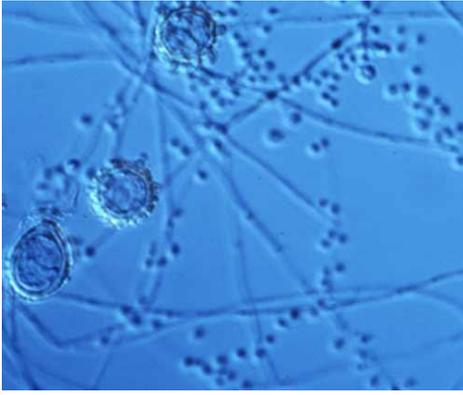
Con las esporas se efectúan las observaciones siguientes: forma, tamaño, color y características. En las hifas fértiles se examinan: ramificaciones, tabiques, anchura, color, características y naturaleza de las paredes (lisas, picadas o rugosas). A partir de las observaciones así adquiridas y complementadas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

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

Hongos filamentosos o mohos				
Hifas no tabicadas	Hifas tabicadas			
	Dematiáceos	Hialinos		
Phycomycetes : * <i>Rhizopus sp.</i> * <i>Mucor sp.</i> * <i>Absidia sp.</i>	Conidias Multicelulares Tabiques transversales y longitudinales: * <i>Alternaria sp.</i> * <i>Curvularia</i> Conidias unicelulares: * <i>Cladosporium sp.</i> * <i>Nigrospora sp.</i> De crecimiento lento: * <i>Phialospora sp.</i> * <i>Fonsecaea sp.</i>	Dimórficos: * <i>Histoplasma capsulatum</i> * <i>Coccidioides immitis</i> * <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> * <i>Sporotrix schenkii</i>	Dermatofitos: * <i>Microsporum sp.</i> * <i>Trichophyton sp.</i> * <i>Epidermophyton sp.</i>	Conidióforos con vesícula dilatada: * <i>Aspergillus sp.</i> Conidióforos que se ramifican: * <i>Penicillium sp.</i> Conidióforos que forman racimos: * <i>Fusarium sp.</i>



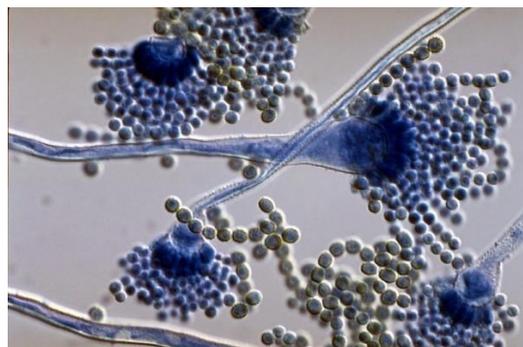
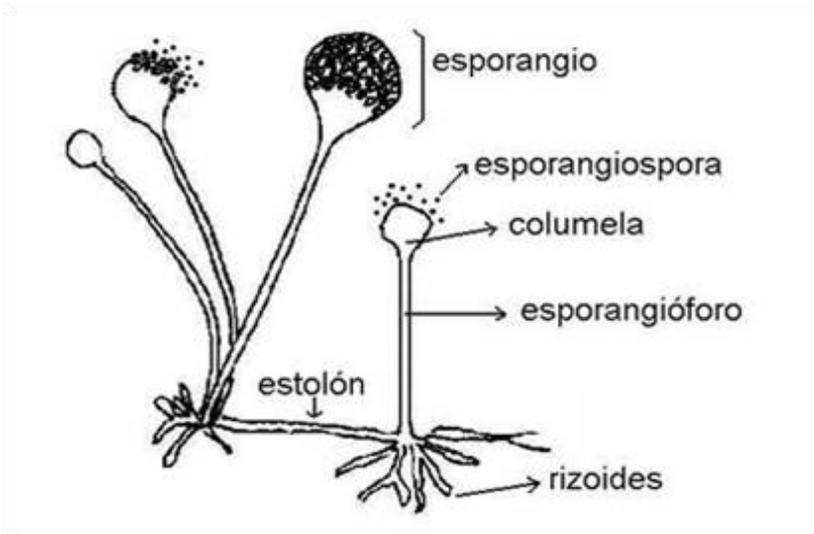
Blastosporas y Clamidosporas de *Cándida albicans*



Macro y Microconidias



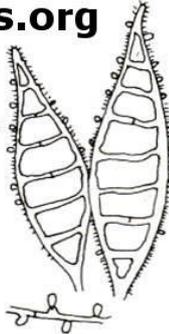
Microconidias y Clamidosporas



Aspergillus sp

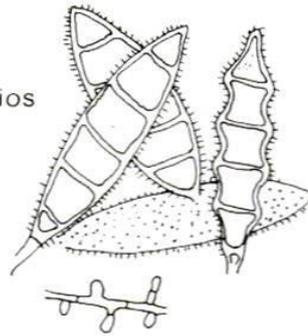
Telmeds.org

macroconidios
con más de
seis lóculos



M. canis

macroconidios
hasta con
seis lóculos

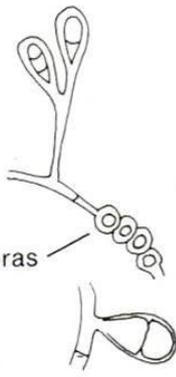


M. gypseum

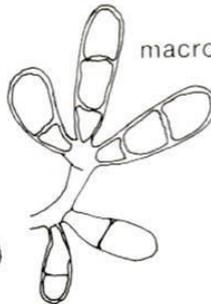
Género *Epidermophyton*

Telmeds.org

clamidosporas



macroconidios en mazo



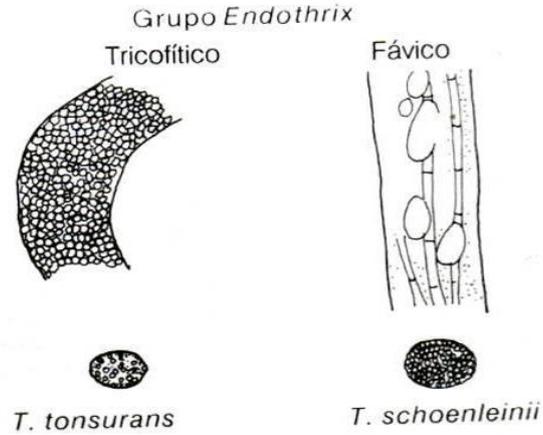
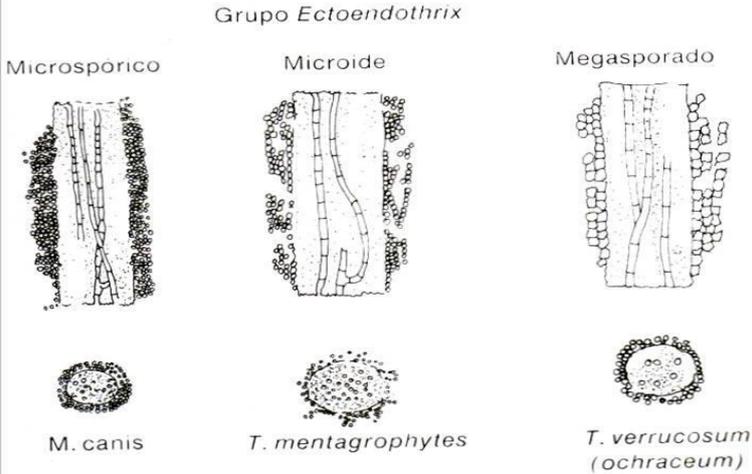
E. floccosum

microconidios
redondos en
racimos

Hifas en
zarcillos y
tirabuzón

Telmeds.org

T. mentagrophytes



ACTIVIDADES A DESARROLLAR:

- Observación de materiales clínicos
 - Observación macroscópica de los cultivos
 - Observación microscópica de los desarrollos, realizando distintas técnicas
 - Observación del desarrollo en microcultivo
-

BIBLIOGRAFÍA

- R. Arenas Guzmán. Micología Médica Ilustrada (2014) Quinta Edición. Mc-Graw Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V., ISBN: 978-607-15-1125-6.
- Pemán J, Martín Mazuelos E, Rubio MC. (Eds). Guía práctica de identificación y diagnóstico en Micología Clínica. 2ª edición (2006) Revista Iberoamericana de Micología.
- De Hoog GS, Guarro J. Atlas of clinical fungi. Centralbureau voor Schimmelcultures/ Universitat Rovira y Virgili. Baarn and Delf (2000) The Netherlands, Universitat Rovira y Virgili, Reus, Spain.

Trabajo Práctico de Laboratorio N° 5:

MICOSIS SUPERFICIALES

OBJETIVOS

Con el siguiente práctico el alumno deberá estar capacitado para:

- 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.

INTRODUCCION TEORICA

Dentro de las micosis superficiales podemos encontrar las dermatofitosis; que causan las llamadas tiñas y las dermatomicosis; dentro de la cual 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*, *Epidermophyton* y *Trichophyton*; los cuales se distinguen entre sí por sus conidios, 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 los hongos sobre la piel, los pelos y las uñas.

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

- Zoofílicos: se encuentran principalmente en animales, pero pueden transmitirse a humanos. Por ejemplo, *M. canis*, *T. mentagrophytes*, etc.
- Antropofílicos: se encuentran principalmente en humanos y, muy rara vez, se transmiten a animales. Como por ejemplo *E. floccosum*, *T. rubrum*, entre otros.
- Geofílicos: 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 *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, que se enumeran a continuación:

- Tiña capitis: cuero cabelludo, cejas, pestañas.
- Tiña corporis: piel lampiña del tronco, cuello, brazos, piernas y dorso de las manos y pies.
- Tiña cruris: ingle, perineo, región perianal.
- Tiña unguium: 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**; es una micosis que cursa con lesiones maculosas híper o hipo pigmentadas, 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 la *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 horas 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 PACIENTE:

Es importante una buena explicación de las condiciones en las cuales debe asistir al laboratorio el paciente y dependiendo de la localización de la lesión serán las indicaciones que es preferible brindárselas al 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 al análisis sumergir las uñas en agua con sal por 10 minutos 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 2 – 3 días previos.
3. **Muestra de piel:** Evitar el uso de lociones, cremas, talcos, 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.

Precedentemente 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 mediante diversas técnicas:

- **En la 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.
- **En las 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.
- **En las tiñas microspóricas:** se reconocen por presentar una placa escamosa blanquecina con escasa o nula inflamación, que puede alcanzar varios centímetros de diámetro, y en el 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:** Son las formas supurativas de tinea capitis, es común en los niños. 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).
- **En las tiñas tricofíticas antropófilicas:** 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 paciente.
- **En la 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 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.

- **Onicomycosis proximal subungueal:** causada por *Candida spp*, *Fusarium spp* o por recidivas de una *tinea 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.

- **Onicomycosis 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.

- **Onicomycosis 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 está 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.

- **Onicomycosis distrófica total:** corresponde al estadio final de cualquier onicomycosis. 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.

METODOLOGIA PRÁCTICA:

1.- Examen directo:

Dermatofitos

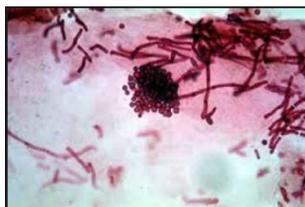
Para escamas y pelos:

- Preparar KOH 40% (40mg de KOH + 100 ml de H₂O 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

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

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



Se observarán cúmulos o racimos de esporas gemantes ovaladas o redondeadas de 4 a 8 µm y filamentos cortos, sinuosos en forma de "S" de 2 a 4 µm, 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

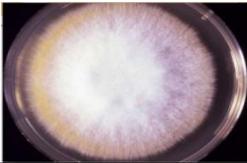
Medios de cultivo para hongos: Sabouraud, Agar papa dextrosa, Lactrimel, fraccionado en tubos en pico de flauta con el agregado de antibióticos, por ejemplo, la mezcla antibiótica que se preparó en el TP 2.

En 2 a 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	Descripción de la colonia
	<p>Microsporium canis: Colonias con micelio aéreo algodonoso que va del color crema a carne con coloración amarillenta en los bordes. Reverso: Anaranjado</p>
	<p>Microsporium gypseum: Colonia granulosa de color marrón canela y de aspecto estrellado, bordes blanquecinos. Reverso: Marrón</p>
	<p>Trichophyton mentagrophytes: Colonia granulosa poco prominente, de color amarillo pálido y bordes blanquecinos. Reverso: En ocasiones puede producir pigmentos rojo-anaranjados.</p>
	<p>Trichophyton rubrum: Colonias vellosa, prominente, abundante, de color blanquecino, con bordes más claros. Reverso: Pigmento rojo vinoso oscuro característico de esta especie.</p>



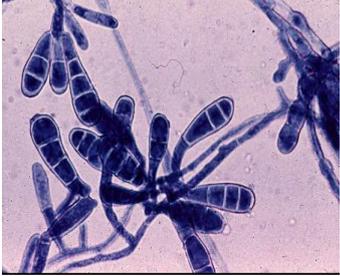
Malassezia furfur: Colonias cremosas, pequeñas de color beige. (agar Sabouraud con antibióticos Cloranfenicol-Actidione)

Imágenes propias

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 micro morfológicamente

Microscopía	Características
	<p>Microsporium canis: Macroconidias fusiformes, divididas delgadas de pared gruesa y rugosa, extremos puntiagudos ligeramente curvados hacia un lado</p>
	<p>Microsporium gypseum: Macroconidias fusiformes, de pared delgada y rugosa y extremo redondeado</p>
	<p>Trichophyton mentagrophytes: Escasas macroconidas alargadas en forma de lápiz, con paredes lisas. Microconidas redondas u ovales, frecuentemente en grupos, algunas hifas en forma de espiral.</p>

	<p><i>Trichophyton rubrum</i>: Microconidas en forma de lágrima ubicadas lateralmente a las hifas</p>
	<p><i>Epidermophyton floccosum</i>: Macroconidias de paredes delgadas, en forma de mazo o clava con u extremo redondeado. No hay Microconidios.</p>

drfungus.org

Otras pruebas para dermatofitos:

1) Producción de órganos perforadores

Preparación:

Se colocan cabellos de 1cm de longitud en una placa de Petri y se esterilizan por autoclave (121 °C, 10 minutos). Se agregan 25 ml de agua destilada estéril y 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 coloreando con azul de lactofenol, entibiando ligeramente entre porta y cubre, se realiza con intervalos de 4 semanas.



Corrado Capretti

Interpretación

Positivo: *T. interdigitale*, *E. floccosum*, *Microsporum* spp.

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

2) Medio de agar urea de Christensen

Preparación del medio:

- 1.- Agregar Peptona 1g, Glucosa 1g, NaCl 5g, KH₂PO₄ 2g, Rojo de Fenol 12g, Agar 20g, agua destilada 900 ml. Se calienta hasta disolución total.
- 2.- Esterilizar en autoclave 121 °C durante 15 min.
- 3.- Enfriar a 50 °C y agregar 100 ml de Urea al 20 % en agua destilada y esterilizada por filtración.
- 4.- Alicuotar en tubos de hemólisis estériles inclinados.

Interpretación de resultados.

Son ureasa **positiva:** *T. interdigitale*, *T. mentagrophytes*, *Microsporum* spp.

Son ureasa **negativo:** *T. rubrum*, *T. verrucosum*

Son urease **variable:** *T. schoenleinii*, *T. tonsurans*

En resumen...

El diagnóstico micológico correcto en 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
- Siembra de material clínico en Agar Sabouraud
- Observación macroscópica de los cultivos
- Observación microscópica de los desarrollos

BIBLIOGRAFIA

- R. Arenas Guzmán. Micología Médica Ilustrada (2014) Quinta Edición. Mc-Graw Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V., ISBN: 978-607-15-1125-6.
- M. del Carmen Perrone, MANUAL DE TOMA, TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS (2008) Red de Micología.
- Elmer W. Koneman, Micología Practica de Laboratorio (1987) Ed Medica Panamericana 3era ed,.
- Nelly Janeth Sandoval, Roberto Arenas, Diagnóstico y Tratamiento de Dermatofitos y Pitiriasis Versicolor, Revisión Bibliográfica (2012) Revista Médica HONDUR, Vol. 80, N°2.
- Ajello, L.; Georg, L. K.. In vitro hair cultures for differentiating between atypical isolates of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum* (1957) *Mycopathologiae Mycologia Applicata*, VIII,1, 3-17.

Trabajo Práctico de Laboratorio Nº 6

IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS DE INTERÉS MÉDICO

OBJETIVOS:

El trabajo práctico capacitará al alumno en los siguientes ítems:

- 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 TEORICA:

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 de *Cándida albicans* y *Cryptococcus neoformans* 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 de *Cándida albicans* y *Cryptococcus neoformans*. 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.

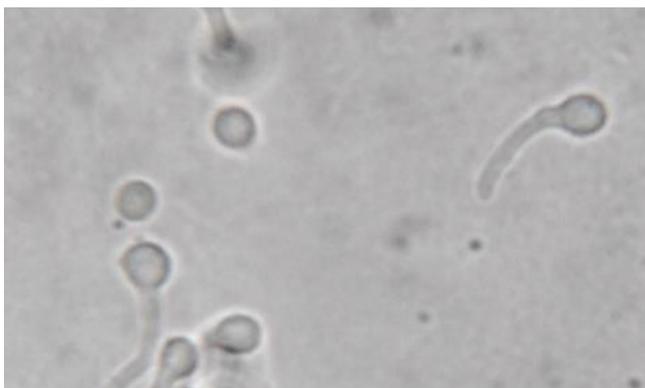
- 1. Prueba de formación de tubo germinativo por *Candida albicans*.
- 2. Prueba de formación de Clamidosporas por *Candida albicans*.
- 3. Agar semillas de girasol para diferenciación de *Cryptococcus neoformans*.
- 4. Prueba de la producción de ureasa para *Cryptococcus neoformans*.
- 5. Crecimiento a 28 ° C y 37 ° C.
- 6. Crecimiento en extracto de malta ó 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 capsula de *Cryptococcus neoformans*.

Producción de tubo germinativo

Esta prueba es considerada hasta el presente como la más confiable para identificar presuntivamente *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 (*C. albicans*) y uno negativo (*C. guilliermondii* u otra).



Almeida, G. M. D. et al

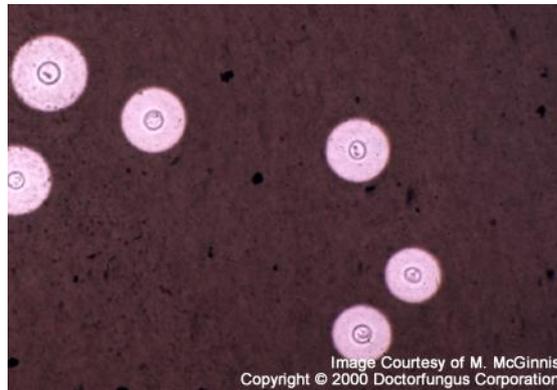
Interpretación: El tubo germinativo se ve como una proyección filamentosa delgada, que no presenta constricción en el punto de origen.

Coloración con Tinta China

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

Método: 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.

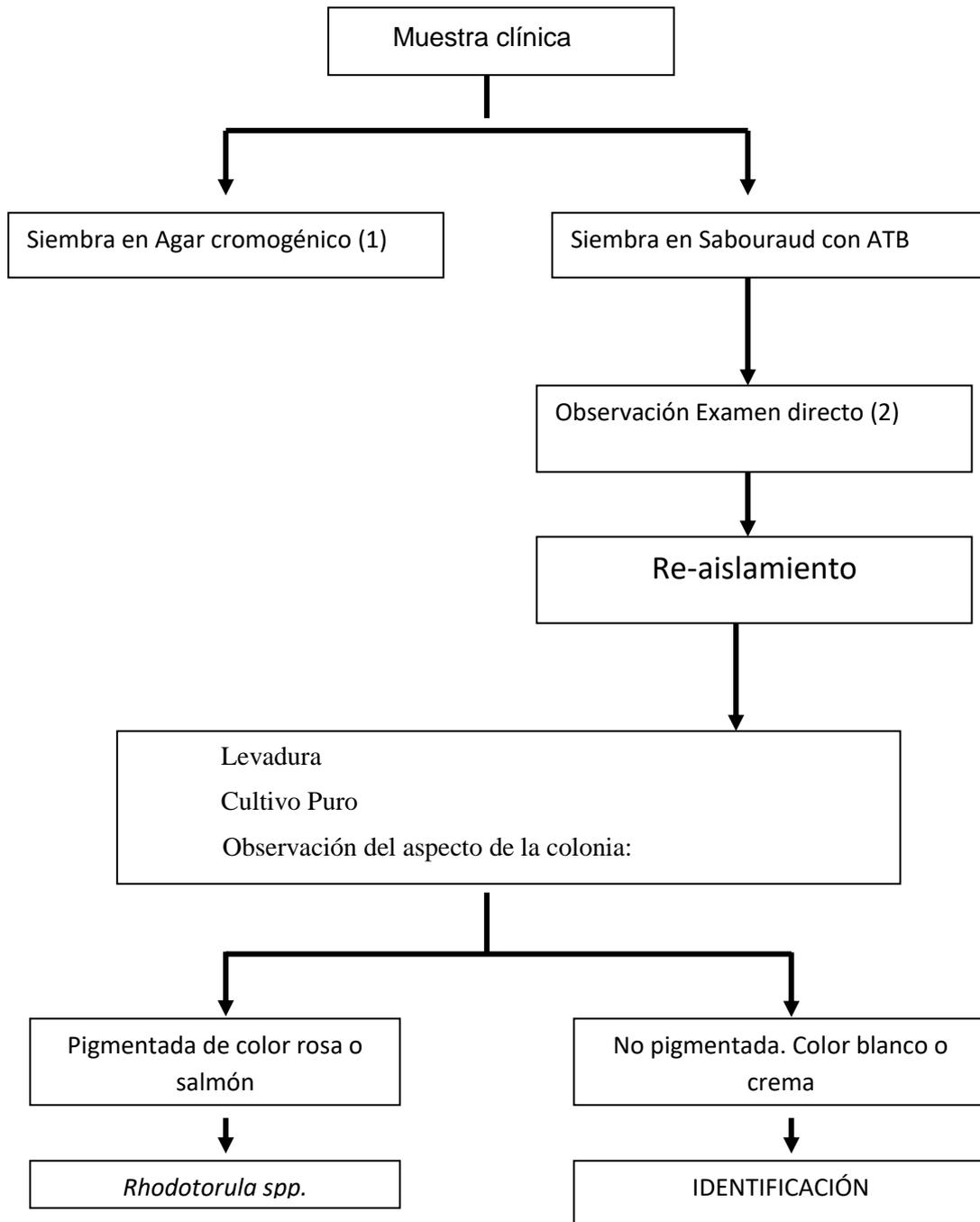


A raíz de la dificultad que presenta la identificación de levaduras diferentes de *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans* en los laboratorios de microbiología general de los centros de salud, se propone un algoritmo de identificación presuntiva con la intención de brindar una ayuda al momento de arribar a la identificación fenotípica.

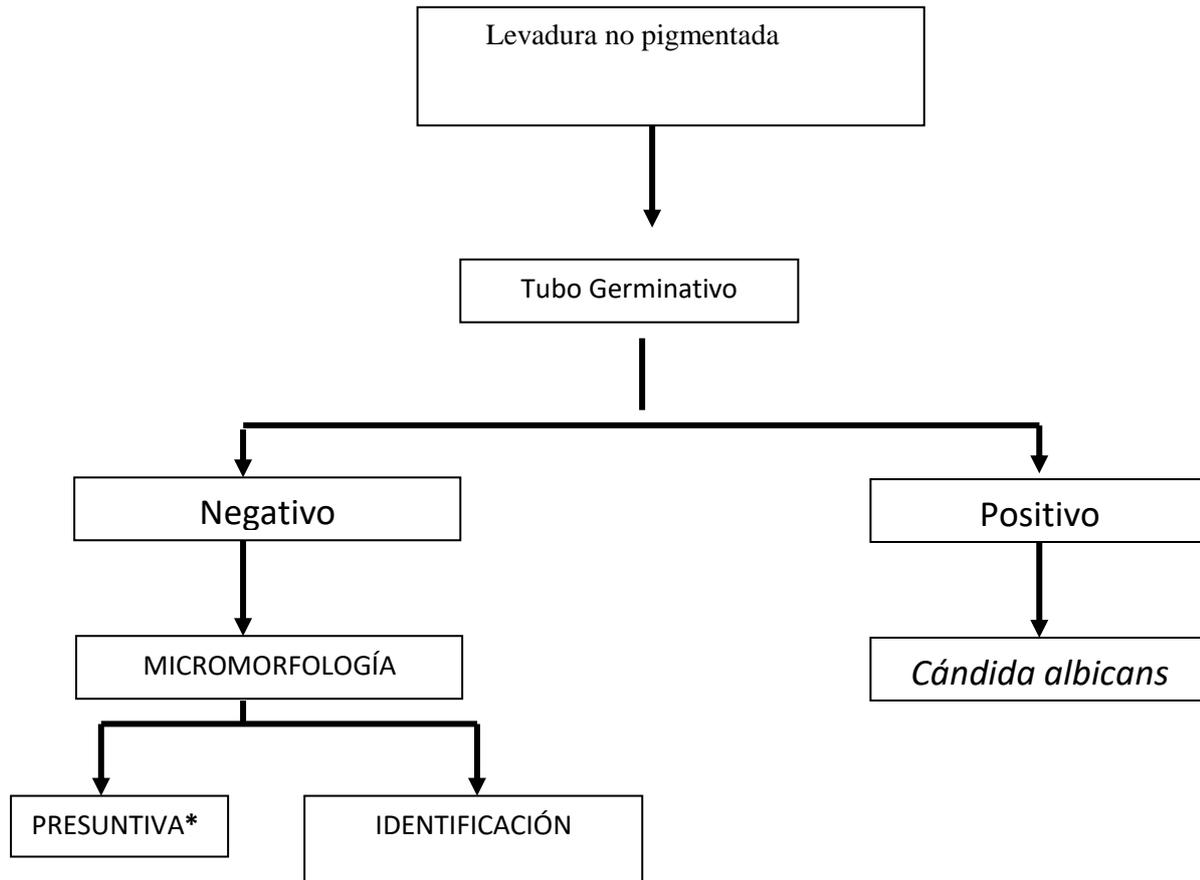
Se recuerda que las metodologías propuestas sólo permitirán una identificación presuntiva de los aislamientos, por lo tanto, es necesario completar el esquema de identificación mediante la realización de metodología estándar, o bien derivando a los Centros de Referencia.

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 se utilicen para realizar la identificación presuntiva de los aislamientos de levaduras.

Algoritmo de identificación de levaduras



1. Realizar la siembra del primocultivo en un agar cromogénico (contiene antibiótico) permite en 24 h la visualización de las colonias puras, la detección de una infección mixta de levaduras y la identificación presuntiva de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei*.
2. Es conveniente realizar una observación de las colonias obtenidas para asegurarse que el cultivo esté libre de bacterias.



Micromorfología: esta observación se debe realizar siempre, ya sea para la identificación presuntiva como para la identificación completa.

- 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 brotación: monopolar o multipolar o fisión.
- Se puede realizar en agar harina de maíz (CMA), que permite la observación de la disposición de las estructuras y además, en el caso de *C. albicans*, se puede ver la formación de clamidoconidias.

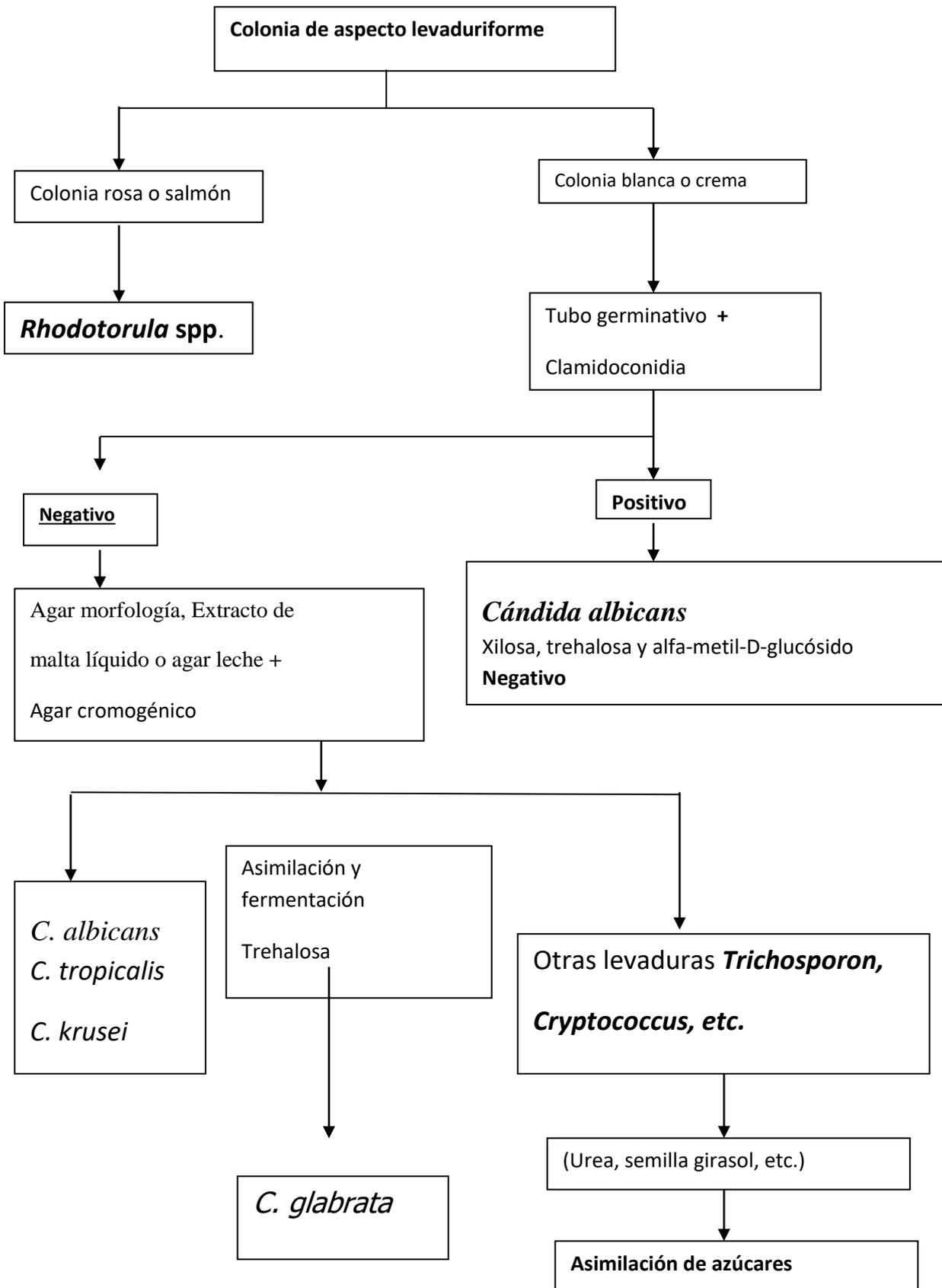
Identificación presuntiva:

Además de las características macro y micromorfológicas, la identificación presuntiva puede realizarse incluyendo otras pruebas:

- Siembra en un agar cromogénico, especialmente CHROMagar Candida que permite identificar: *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei*.
- Prueba de ureasa.
- Agar semillas de girasol.
- Asimilación de trehalosa.
- Disco de fluconazol de 25 µg.

<u>Especie de Levadura</u>	<u>Micromorfología</u>	<u>CHROM</u>	<u>Trehalosa</u>	<u>Urea</u>	<u>fluconazol</u>
<i>C. albicans</i>	Pseudomicelio con blastoconidias agrupadas clamidoconidias	Verde	Neg.	Neg.	----
<i>C. tropicalis</i>	Pseudomicelio largo y ramificado, blastoconidias dispuestas a lo largo	Azul	Positivo (+ de 3 horas)	Neg.	----
<i>C. parapsilosis</i>	Pseudomicelio corto, ramificado, blastoconidias ovoides	Crema (ND)	Neg.	Neg.	-----
<i>C. krusei</i>	Células alargadas (en forma de habano) con blastoconidias terminales.	Rosa seca	Neg.	Positivo (débil)	confirma con halo < 14 mm.
<i>C. glabrata</i>	Blastoconidias muy pequeñas sin pseudomicelio	Rosa, crema (ND)	Positivo (a partir de las 2 hs)	Neg.	-----
<i>C. guilliermondii</i>	Blastoconidias muy pequeñas con Pseudomicelio Rudimentario (escaso)	(ND)	Neg.	Neg.	----
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Levaduras redondas brotantes.	(ND)	Neg.	Positivo	---
<i>Trichosporon beigelii</i>	Blastoartroconidias, Clamidoconidias intercalares	Azul violáceo	Neg.	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 .
- Yeast Star
- Auxacolor
- RapID Yeast Plus system
- MALDI-TOF

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 indicaciones del fabricante, pudiéndose obtener resultados a las 48 horas 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 bio-código 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*, *C. guilliermondii*, *C. neoformans*, *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 indicaciones del fabricante pudiéndose obtener resultados a las 72 horas 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 KNO₃, crecimiento a 42 °C y producción de ureasa.

Este es el sistema más utilizado en EEUU. Este sistema permite identificar el 97% de los aislamientos comunes y un 88% de los menos comunes. Entre las especies que no pudieron ser identificadas se encuentran: *C. albicans*, *C. guilliermondii* y *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 horas 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*, *C. krusei*, *C. rugosa*, *C. zeylanoides*, *C. neoformans*, entre otras. Este método posee la ventaja de que puede identificar presuntamente *C. dubliniensis*, especie morfológicamente similar a *C. albicans* y con dificultades de diferenciar.

VITEK 2 ID-YST System (sistema automatizado para identificación y sensibilidad a antifúngicos):

Puede identificar especies de levaduras a las 15 horas a través de una técnica muy sensible basada en la fluorescencia. ID-YST comprende 47 reacciones bioquímicas e incluye nuevas especies descritas. El método permitió identificar 92 % de las cepas probadas. Un 6,2% fue no identificado (*C. inconspicua*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. norvegensis*, *C. parapsilosis*) y 1,7 % erróneamente identificada (*C. kefir*, *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 horas y se siembran dos gotas en cada una de las celdas, se incuba 24 o 48 horas a 30°C y, simultáneamente, se debe realizar el examen macro y microscópico de las colonias con lo que la sensibilidad aumenta a 91%.

BIBLIOGRAFÍA

- R. Arenas Guzmán. Micología Médica Ilustrada, Quinta Edición. (2014) Mc-Graw Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V., ISBN: 978-607-15-1125-6.
- Pemán J, Martín Mazuelos E, Rubio MC. (Eds). Guía práctica de identificación y diagnóstico en Micología Clínica. 2ª edición. (2006) Revista Iberoamericana de Micología.
- De Hoog GS, Guarro J. Atlas of clinical fungi. Centralbureau voor Schimmelcultures/ Universitat Rovira y Virgili. Baarn and Delf, The Netherlands (2000) Universitat Rovira y Virgili, Reus.
- D. Coleman , M. Rinaldi, K. Haynes, J. Rex, R. Summerbell, E. Anaissie, A. Li, D. Sullivan. Importance of *Candida species* other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. Med Mycol (1998) 36: 156-165.
- M. Guevara Robles, F. Ausejo, J. Caveró. Manual de Procedimientos y Técnicas de Laboratorio para la Identificación de los Principales Hongos Oportunistas causantes de Miosis Humanas. (2007) Ministerio de Salud. Instituto Nacional de Salud. Serie de Normas Técnicas N° 44, ISBN: 978-9972-857-62-1, pp. 100.
- M. Mendoza. Importancia de la identificación de levaduras. (2005) Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 25: 103-117.
- M. Panizo, V. Reviákina, M. Dolande, B. Maldonado. Aislamiento de levaduras en muestras clínicas. (2002) Rev Soc Ven Microbiol, 22: 57-63.

TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO Nº 7 ASPERGILOSIS

OBJETIVOS:

El presente trabajo práctico capacitará al alumno en los siguientes ítems:

- 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*; género que crece en importancia desde 1729, año en el que fue descrita la primera patología humana. Presentan una gran versatilidad metabólica y una gran capacidad para dispersar sus conidios dado que su cabeza conidial puede producir más de 500.000 conidios.

Al género *Aspergillus* pertenecen aproximadamente 900 especies, cuyos conidios son inhalados en forma permanente por el hombre. Es uno de los más frecuentemente hallados en el ambiente, pudiendo aislarlo de cualquier sustrato que contenga materia orgánica y humedad como por ejemplo del suelo y vegetales en descomposición, por lo tanto puede afectar nuestro bienestar de diferentes formas:

- Patógeno humano y animal
- Por 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 hombre, independientemente del sexo, edad y raza, a saber:

Aspergillus fumigatus, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*,
Aspergillus terreus.

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.

Así el estudio de esputos; lavado bronquioalveolar (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 μm de ancho (Foto N° 1). El uso de la técnica de Calcofluor puede facilitar la observación de las formas fúngicas. Coloraciones como las de Gram Nicolle, Hematoxilina Eosina y Gomori-Grocott (Figura N° 2) permiten una buena visualización de las hifas características.

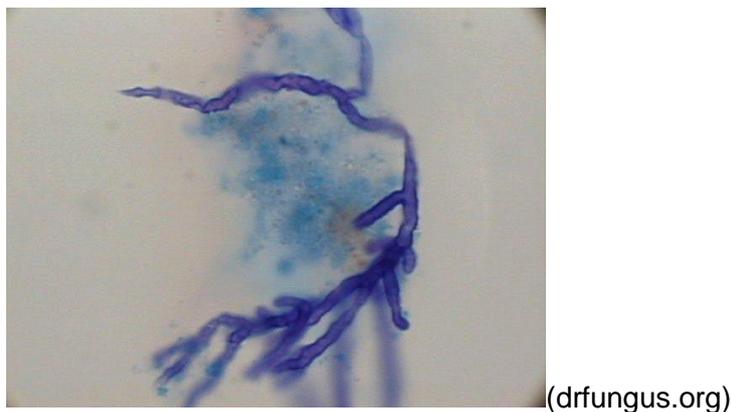


Figura N° 1. Examen directo de material rinosinusal con Azul de lactofenol: se observan hifas anchas tabicadas y con ramificaciones dicotómicas.

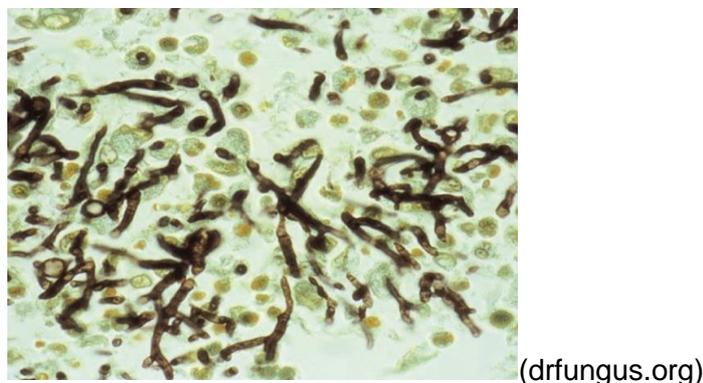


Foto N° 2: Extendido de absceso cerebral coloreado con Gomori-Grocott: se observan hifas anchas tabicadas y con ramificaciones dicotómicas.

En esputos, la presencia de hifas y, en raros casos, la de elementos de fructificación, orienta 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 (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 (Mycosel). La temperatura también influye en el desarrollo de las especies involucradas, 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. *A fumigatus* es considerado una especie termo tolerante, porque puede desarrollar a temperaturas de alrededor de 45 °C.

El diagnóstico micológico se ve dificultado por la ubicuidad del género, por lo tanto su hallazgo en muestras aisladas de 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 (obtenidos de sitios estériles), la observación de las hifas características y desarrollo de hongos pertenecientes al género *Aspergillus*, tienen valor diagnóstico. El hallazgo de un resultado positivo en el tracto respiratorio 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.

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 es la siguiente:

Aspergillus fumigatus (85-90%); *Aspergillus flavus* (10%); *Aspergillus niger* (3-7 %); *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus terreus* (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 analiza su estructura reproductiva cuyos constituyentes son: cabeza conidial, conidióforo, vesícula, fialide, conidios, células de Hülle, cleistotecio y esclerotes. Fig N° 1

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 fialides.

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 65µm.

Fialide: Es la célula conidiógena que da origen a los elementos de reproducción asexual denominados conidios. 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 primer hilera, esterigmas o métulas.

Conidios: 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.

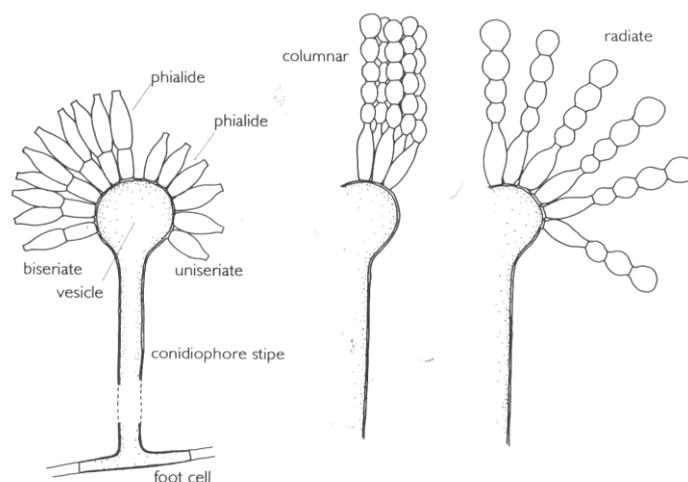


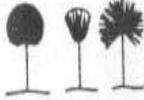
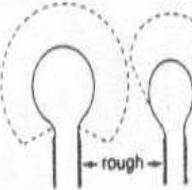
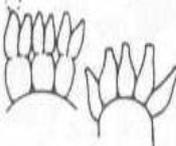
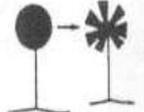
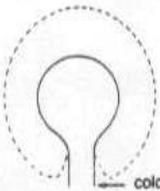
Figura N° 1: Estructuras reproductivas de especies del género *Aspergillus*. (Esquema según Guarro)

Células de Hülle: 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. flavus*; *A. oryzae*; producen masas fuertes, de formas, tamaños y colores diferentes, con células de paredes gruesas que semejan un parénquima. La producción de estas estructuras dependen 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 sexual: esporos. Al género *Aspergillus* taxonómicamente se lo puede ubicar dentro de los hongos fialidados 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 N° 1 y Fig N° 2.

Figura N° 2: Características micro morfológicas de especies de *Aspergillus*

Species	Conidial Head	Vesicle and Conidiophore	Sterigmata	Conidia
<i>A. fumigatus</i>	 greenish blue, blue-gray	 smooth, colorless		green 2-3.5 μ 
<i>A. flavus</i>	 yellowish green	 rough colorless		yellow-green 3-5 μ 
<i>A. niger</i>	 black to dark brown	 colorless or brown		dark brown 4-5 μ 
<i>A. terreus</i>	 tan	 smooth, colorless		pale yellow 2-2.5 μ 
<i>A. nidulans</i>	 dark green	 smooth, brown		green 3-3.5 μ 

(Imágenes Boletín Micológico Vol. 23: 49 - 66 2008)

Tabla N° 1. Características macro y micro morfológicas de las especies de *Aspergillus* asociadas con patologías en humanos

	CARACTERISTICAS	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. terreus</i>	<i>A. nidulans</i>
Colonia	Aspecto	Plano, aterciopelado algodonoso	Pulverulento	Punteado negro	Aterciopelado, flocoso	Plano, aterciopelado
	Color	Verde botella, blanco-grisáceo	Verde amarillento	Blanco amarillento	Marrón amarillento	Verde amarillento
	Reverso	Incoloro, Rojo amarillento	Incoloro, café amarillento	Incoloro, amarillento	Incoloro, beige	Rojo púrpura
Reproducción	Conidióforo	Corto, liso, incoloro,	Regular, pared rugosa	Largo, 1.5 – 3 mm	Regular, hialino liso	Muy corto, liso, café (marrón),
	Vesícula	Mazo o domo	Esférica	Globosa	Subesférica	Hemisférica
	Fialides	Una serie, paralelas	Una a dos series radiadas	Dos series radiadas	Dos series Ligeramente columnar	Dos series, paralelas
	Conidios	Globosos, equinulados, verdes	Piriformes o globosos, verde amarillentos	Globosos, negros	Globosos, estriados, amarronados	Globosos, equinulados, verdes

Reproducción sexuada	Cleistotecios	Globosos, amarillos	---	---	---	Globosos, café (marrón)
	Ascosporas	Globosos con crestas ecuatoriales	---	---	---	Rojizas
	Células en avellana	-	---	---	---	20 μ m
	Esclerotes	-	Blanco o negro	---	---	---
Otros	Temperatura de desarrollo óptimo	37 a 50 °C	37 °C	37 °C	37 °C	30 a 37 °C

Diagnóstico serológico

Los métodos serológicos son de gran ayuda diagnóstica, siendo la búsqueda de anticuerpos circulantes, una de las técnicas más frecuentemente usadas.

La inmunodifusión (ID) es el ensayo inmunológico más frecuentemente realizado en el laboratorio de micología, obteniendo la presentación de 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, pero en pacientes con Aspergilosis Invasiva (AI) pueden presentar 1 o ninguna banda de precipitación por lo que se trató de avanzar en nuevas técnicas de serodiagnóstico.

Rippon y col. sostienen que la prueba de ID aún es útil y que se pueden correlacionar los patrones de bandas con patologías como por ejemplo: 1 banda débil se presenta en asmáticos, 4 ó 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 aspergilosis invasiva 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 (GM):

Desde hace 20 años se conoce la presencia de más de 100 componentes antigénicos en el suero de enfermos con aspergilosis invasiva, siendo el marcador de mayor utilidad diagnóstica el galactomanano. El galactomanano es un componente de la pared celular del género *Aspergillus*, siendo el principal exoantígeno liberado durante la angioinvasión. En enfermos con aspergilosis invasora 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 horas) 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. 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/mm³ >3 semanas ó <500 N/mm³ >5 semanas), catalogados como de alto riesgo de desarrollar una AI. El GM es de dudosa utilidad diagnóstica en población pediátrica, receptor 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, conjuntamente con los datos proporcionados por la biología molecular (PCR) permitirían probar la Aspergilosis invasiva. 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 paciente recibe terapia antifúngica, el clearance de Ag se ve favorecido, y consecuentemente las pruebas resultaran negativas.

Diagnóstico de AI mediante detección de (1-3)- β -D-glucano (BG):

El glucano es un componente de la pared celular fúngica formado por monómeros de glucosa unidos con enlaces (1-3)- β y (1-6)- β . El (1-3)- β -D-glucano 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 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 sugiere que la detección de BG (Fungitell, Asoc. Cape Code, EU) es una herramienta diagnóstica de la AI invasiva, 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, 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.

La biología molecular ha aportado mucho para el diagnóstico de las aspergilosis tanto en el diagnóstico en muestras clínicas como en los estudios taxonómicos de cepas. 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.

ACTIVIDADES A DESARROLLAR:

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

BIBLIOGRAFÍA

- R. Arenas Guzmán. Micología Médica Ilustrada (2014) Quinta Edición. Mc-Graw Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V., ISBN: 978-607-15-1125-6.
- Pemán J, Martín Mazuelos E, Rubio MC. (Eds). Guía práctica de identificación y diagnóstico en Micología Clínica. 2ª edición. (2006) Revista Iberoamericana de Micología.
- De Hoog GS, Guarro J. Atlas of clinical fungi. Centralbureau voor Schimmelcultures/ Universitat Rovira y Virgili. Baarn and Delf, The Netherlands (2000) Universitat Rovira y Virgili, Reus.
- Rippon, John W. Tratado de Micología Medica (1990) tercera edición Mc-Graw Hill Interamericana Editores, ISBN 968-25-1466-5

Trabajo Nº 8

RESOLUCIÓN DE CASOS CLÍNICOS

OBJETIVOS: Con el siguiente práctico el alumno deberá estar capacitado para:

- Integrar los conocimientos teóricos individuales de las micosis aprendidas, con el resto de las manifestaciones clínicas que pueden afectar a un 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 paciente.
- Relacionar al profesional bioquímico con el resto de los profesionales del equipo de salud.

PROBLEMA CLÍNICO Nº 1

Datos del paciente: Paciente J.C. de 33 años de edad, procedente de la localidad de Fontana, provincia de Formosa, República Argentina. La zona es subtropical, húmeda, con temperatura media anual de 23 °C y está situada en el nordeste argentino. El paciente era trabajador rural en un obraje y abatía árboles de maderas duras. Fue admitido en el Hospital Muñiz el día 17/12/2007.

El motivo de la internación fue la presencia de lesiones úlcero-vegetantes de aspecto verrugoso en ambos pies, con marcado predominio en el pie derecho, acompañadas de linfedema de la pierna homolateral.

Fue enviado desde la ciudad de Formosa para confirmación del diagnóstico e inicio del tratamiento.

Antecedentes: En el año 2005 sufrió un accidente en el cual un rollizo de quebracho se cayó sobre su pie derecho y le ocasionó heridas graves, que motivaron la amputación de la primera falange del cuarto dedo de ese pie. A partir de este episodio comenzaron a aparecer las lesiones que presentaba en el momento de la internación y en los últimos meses se produjeron úlceras y vegetaciones en el pie contra-lateral. Después del accidente, al aparecer heridas infectadas y zonas de necrosis, además de la amputación, se le efectuaron limpieza quirúrgica de la herida y tratamiento con ciprofloxacina y clindamicina. Pese a estas medidas presentó un linfedema progresivo de la pierna derecha. El paciente no refirió episodios febriles, ni astenia, ni pérdida de peso.

Examen físico: Paciente en buen estado general, decúbito activo indiferente, afebril, estatura 1,70 m, peso 79 kg contextura física atlética. Temperatura axilar 36,7 °C, frecuencia cardíaca 56 por minuto, tensión arterial 145/80 mm Hg y frecuencia respiratoria 16 por minuto.

En el pie derecho se observaron lesiones úlcero-vegetantes de aspecto verrugoso que abarcaban la planta, los bordes laterales y el talón y ascendían hasta el tobillo del mismo lado. En la pierna homolateral presentó edema frío e indoloro, desde el dorso del pie hasta la rodilla, con aspecto elefantíaco. En el pie izq. se observaron lesiones similares, pero más pequeñas y menos numerosas que abarcaban la planta y los bordes laterales (Figuras 1 y 2).

No se palparon adenomegalias en la vecindad, ni en otros territorios y el resto del examen físico no arrojó otros datos positivos.

Se formularon algunos diagnósticos presuntivos y se propuso el siguiente plan de estudios: exámenes de laboratorio de rutina, radiografía de tórax, ecografía abdominal, tomografía de miembros inferiores, radiografías de pies.



Figura 1. Lesión úlcero-vegetante de aspecto verrugoso en el pie derecho.



Figura 2. Linfedema de la pierna.

Resultados de los exámenes de laboratorio de rutina:

Eritrosedimentación: 10 mm en la primera hora,

Hematocrito: 44,6%,

Hemoglobina: 14,9 g%

Leucocitos: 7.500/ μ l

(Neutrófilos 59%, eosinófilos 7%, basófilos 1%, linfocitos 26% y monocitos 7%)

Hepatograma, uremia, glucemia, creatininemia y uricemia dentro de los límites normales.

Sodio 144 meq/l y potasio 4,5 meq/l.

Serología para enfermedad de Chagas – Mazza: hemaglutinación y ELISA reactivas

Prueba de VDRL reactiva 2 diluciones (2dils).

Serología de VIH 1/2 no reactiva.

Recuentos de células CD4-positivas: 736/ μ l (36%) y CD8-positivas: 389/ μ l (19%).

Estudios radiológicos: Las radiografías de tórax presentaron aumento del espesor del intersticio pulmonar en ambas bases, aumento del espesor de la cisura del lóbulo medio del pulmón derecho y aumento del tamaño de ambos hilos pulmonares (Figura 3).

Las radiografías de pie no mostraron lesiones óseas activas (Figura 4).



Figura 3. Radiografía de tórax.



Figura 4. Radiografía del pie.

Tomografía computarizada de los miembros inferiores. Sólo se observó edema de partes blandas en la pierna derecha.

Ecografía abdominal. Hepatomegalia leve con escaso aumento de la ecogenicidad.

Vesícula biliar pequeña y de paredes finas, imagen compatible con un cálculo de 32 mm que casi llena por completo la luz.

Páncreas de tamaño normal, ligeramente heterogéneo.

Esplenomegalia homogénea de 120 mm de diámetro e imagen calcificada de 3 mm en el polo inferior.

Riñones de aspecto normal.

Retroperitoneo: no se observaron adenomegalias.

En un estudio histopatológico de piel, previo a su internación, se comprobó hiperqueratosis, hiperacantosis, papilomatosis, eliminación transepitelial del proceso inflamatorio y, en la dermis, proceso inflamatorio mixto, granulomatoso y supurativo con congestión vascular. No se encontraron microorganismos.

Se le efectuaron tres biopsias de las lesiones cutáneas, pruebas cutáneas y serológicas que permitieron aclarar el diagnóstico e instituir un tratamiento adecuado.

a. Examen micológico de biopsia cutánea remitida en solución salina estéril, cuyo examen microscópico directo mostró elementos esféricos, hialinos de 15 a 20 μm de diámetro, con pared celular refringente, de doble contorno y varios blastoconidios que rodeaban a la célula madre. Los cultivos en medio de agar-glucosado de Sabouraud, lactrimel de Borelli y agar-infusión de cerebro y corazón con antibióticos, incubados a 28 °C y 37 °C no presentaron el desarrollo de hongos.

Examen microbiológico de la misma muestra clínica, la coloración de Ziehl-Neelsen no presentó bacilos ácido-alcohol resistente y los cultivos en medios de Löwenstein-Jensen, previa homogeneización, no exhibieron el desarrollo de micobacterias a los 60 días de incubación a 30 °C y 37 °C.

c. Examen histopatológico de una biopsia cutánea fijada en formol al 10% en solución salina a pH 7,4 presentó granulomas epitelioides con áreas de supuración en la dermis papilar y profunda, hiperqueratosis, hiperacantosis y eliminación transepitelial del proceso inflamatorio. En la coloración de Grocott, dentro de las células gigantes, se observaron elementos esféricos, multibrotantes, Grocott-positivos, de dimensiones que oscilaron entre los 8 μm y los 25 μm .

d. Exámenes microbiológicos y citológicos de lavado broncoalveolar, no presentaron hallazgos patológicos.

e. Se realizaron pruebas cutáneas de hipersensibilidad retardada con PPD 2 UT, paracoccidioidina (antígeno de Fava Netto) e histoplasmina, que arrojaron resultados negativos.

f. Se realizaron pruebas de inmunodifusión en gel de agar con paracoccidioidina e histoplasmina. La inmunodifusión con paracoccidioidina resultó positiva con título 1/8 y la contra-inmunolectroforesis con inmunodifusión secundaria fue positiva con la presencia de tres bandas anódicas y cuatro catódicas. Las pruebas con histoplasmina fueron negativas.

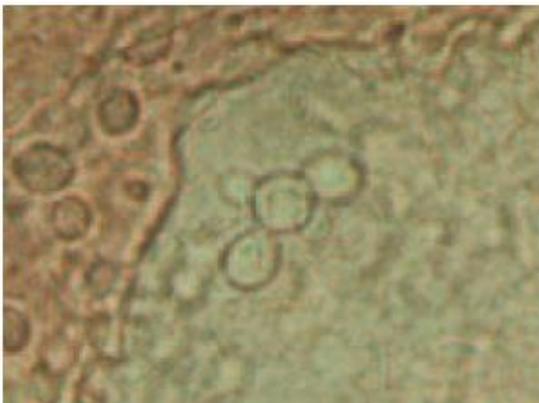


Figura 5. Examen al estado fresco de la biopsia cutánea mostrando elementos esféricos multibrotantes x400.



Figura 6. Coloración de Giemsa de la biopsia que muestra una célula madre con tres blastoconidios x1.000.

Preguntas:

1. ¿Cuáles son las posibles causas de las lesiones verrugosas de los miembros inferiores?

Marque con una cruz la o las posibles causas de dar este tipo de lesiones:

- Tuberculosis cutánea verrugosa
- Piodermitis vegetante
- Sífilis terciaria
- Criptococosis meníngea
- Leishmaniosis cutánea verrugosa
- Cromoblastomycosis
- Esporotricosis
- Cánceres cutáneos

2. La presencia de eosinófilos con que patologías puede corresponderse, nombre tres, y los valores que pueden observarse en ellas.

3. ¿Qué importancia puede haber tenido el traumatismo grave que sufrió el paciente dos años antes de la enfermedad actual?

4. De acuerdo a los resultados de los estudios realizados, indique cuál es la patología que compromete la salud del paciente.

5. Describa brevemente las características que crea más sobresaliente de este microorganismo.

6. Indique la epidemiología de este microorganismo.

CASO CLÍNICO PROBLEMA N°2

Datos del paciente: Paciente B. R. O., 75 años, sexo masculino. Reside en Villa Mercedes, Provincia de San Luis. En casa de buena construcción con sanitarios completos. Trabajó muchos años como rematador de ganado y ahora está retirado. Tiene un buen nivel socio-económico y cultural.

Antecedentes patológicos previos: En 1962 tuvo una úlcera gástrica sangrante por la cual fue sometido a una intervención quirúrgica, gastrectomía subtotal (Bilroth II), esto condicionó un déficit crónico de la absorción del hierro y una gastritis biliar crónica, con úlcera de la neo-boca.

Se le planteó una nueva intervención quirúrgica que fue rechazada por el paciente. Debe recibir constantemente aporte exógeno de hierro para suplir el déficit.

En 1972, presentó un cuadro respiratorio, con infiltrados radiológicos pulmonares, que se acompañaron de artralgias en las grandes articulaciones, fiebre y eosinofilia sanguínea. Fue diagnosticado como síndrome de Loeffler. Recibió corticosteroides y el cuadro clínico remitió.

En 1973, consultó por granulomas cutáneos, de aspecto vegetante, en la zona dorsal del dedo medio de la mano derecha. Se le efectuó una biopsia cutánea cuyo estudio histopatológico acusó un granuloma epitelioides con células gigantes en el cual se comprobó la presencia de un hongo dimorfo. Este diagnóstico fue confirmado más tarde por las pruebas serológicas específicas. Durante 1973 y 1974, recibió dos series de anfotericina B de aproximadamente 1000 mg en total y más tarde fue tratado con ketoconazol 400 mg/día, durante seis meses. La lesión cutánea desapareció y su estado general de salud era excelente.

En 1994 tuvo convulsiones tónico-clónicas generalizadas, que respondieron al tratamiento con fenobarbital y fenitoína. La tomografía axial computadorizada (TAC) y resonancia nuclear magnética (RNM) de cerebro mostraron pequeñas anomalías, tanto en la sustancia gris como en la blanca, a las cuales los neurólogos le dieron escasa importancia.

En 2003 presentó un episodio bronconeumónico con fiebre, dolor torácico, sudoración profusa y tos con escasa expectoración. Durante el mismo tuvo elevación de la concentración de la fosfatasa alcalina (345 U/l) y de la eritrosedimentación (58 mm en la primera hora). Fue tratado con ceftriaxona y se produjo la remisión del cuadro clínico.

Enfermedad actual: Consultó por una osteoartritis de la rodilla izquierda de tres años de evolución, dolía espontáneamente, tenía impotencia funcional y el dolor aumentaba con el movimiento, el apoyo y la palpación. La rodilla estaba tumefacta, fluctuante, con

choque rotuliano positivo, pero sin aumento de la temperatura local y sin eritema cutáneo.

Rx de rodilla: no visualizó lesiones óseas.

RNM mostró una lesión destructiva del cóndilo interno del fémur. Signos de artrosis, con osteofitos en los cóndilos femorales y platillos tibiales. Imágenes hipodensas en los cartílagos de los meniscos interno y anterior y menisco interno de pequeño tamaño. Se observó abundante líquido intraarticular, con zonas tabicadas, compatible con artritis purulenta.

La ecografía abdominal mostró una esplenomegalia homogénea de 13 cm. La radiografía de tórax no presentó alteraciones óseas, ni modificaciones de la silueta cardíaca, ni lesiones pleuro-pulmonares activas, se comprobó un enfisema pulmonar difuso. La punción articular obtuvo un líquido purulento cuyo examen microscópico no permitió observar ningún microorganismo. Los exámenes complementarios de laboratorio acusaron los siguientes resultados:

- *Hemograma*: hematíes 3.300.000 mm³, hematocrito 30%, hemoglobina 9,40 g%, glóbulos blancos 6.100 mm³, neutrófilos en cayado 1%, neutrófilos segmentados 63%, eosinófilos 13%, basófilos 0%, linfocitos 22%, monocitos 1%, células plasmáticas 0%. Eritrosedimentación 4 mm en la primera hora, glucosa 92 mg%, urea 23 mg%, colesterol 159 mg%, colesterol HDL 32 m%, colesterol LDL 103 mg%, ácido úrico 3,8 mg%, triglicéridos 82 mg%. *Hepatograma*: bilirrubina total 0.64 mg%, bilirrubina directa 0,20 mg%, bilirrubina indirecta 0,44 mg %, GPT 20 U/l, GOT 22 U/l, fosfatasa alcalina 218 U/l, proteínas totales 6,50g/dl.

- *Orina*: color amarillo claro, aspecto ligeramente turbio, sedimento regular cantidad, densidad 1020, examen químico: pH 5,20, reacción ácida, proteínas totales no contiene, glucosa no contiene, cuerpos cetónicos no contiene, urobilinógeno no contiene, pigmentos biliares no contiene, hemoglobina no contiene, sedimento: células planas escasa cantidad, células redondas no se observan, leucocitos 15 a 20 por campo, piocitos regular cantidad, pus: escasa cantidad. El urocultivo no presentó desarrollo de colonias bacterianas.

La ecografía prostática demostró aumento heterogéneo de la glándula.

El examen neurológico fue normal, pero el electroencefalograma mostró una disritmia cerebral.

Electrocardiograma: ritmo sinusal con bradicardia, tensión arterial 130/80.

El líquido articular fue sembrado en medios de agar-glucosado de Sabouraud y agar infusión de cerebro y corazón con antibióticos, la incubación se efectuó a 28 °C y

37 °C, durante tres semanas y el examen microscópico presentó el aspecto que se expone en la figura 1.

Además se llevaron a cabo pruebas serológicas específicas, examen micológico de orina y una RNM del encéfalo.



Figura 1

Preguntas:

1. ¿Cuál es la infección que aqueja al paciente?
2. ¿Describa las características macroscópicas y microscópicas de la colonia que crece en el medio de cultivo?
3. ¿Qué relación tiene este episodio con el que tuvo hace 30 años?
4. ¿Nombre el microorganismo que aqueja al paciente y la distribución geográfica de la afección?
5. Explique las distintas formas de este hongo, y su relación con la patogenia.

PROBLEMA CLÍNICO Nº 3

Antecedente personales: Paciente S.A., sexo masculino, 43 años de edad. Nació en la provincia de Jujuy (norte de Argentina, límite con Bolivia), vive actualmente en Avellaneda (sur del gran Buenos Aires). Acudió a consultas del Hospital Francisco Javier Muñiz por tos, expectoración mucopurulenta, disfonía y odinofagia en agosto de 2008. Hace 20 años tuvo tuberculosis pulmonar con afectación de las vértebras dorsales (mal de Pott). Hizo tratamiento anti-tuberculoso completo y sólo quedaron como secuelas una cifoescoliosis dorsal y fibrosis pulmonar. Toma alcohol y es fumador.

Enfermedad actual: Refirió tos, catarro, disfonía y odinofagia de tres meses de evolución, acompañada de pérdida de 5 kg de peso.

Examen físico. Paciente adelgazado, con astenia y con manifiesta dificultad respiratoria, tiraje y estertores traqueales. Altura 1,60 m, peso 45 kg, piel trigueña. Tensión arterial 110-70 mm Hg, frecuencia cardíaca 82 por minuto, frecuencia respiratoria 18 por minuto, temperatura axilar 37,5 °C.

El examen otorrinolaringológico acusó la presencia de granulomas faríngeos y en las cuerdas vocales. El especialista solicitó el examen fibroendoscópico traqueobronquial para visualizar mejor la región subglótica.

Este estudio demostró disminución de la luz traqueal en un 30%, por compresión extrínseca en el tercio superior y numerosos granulomas en la mucosa traqueal. Se tomaron muestras de biopsia para histopatología en formol al 20% y para micología y bacteriología en solución salina isotónica estéril. Después de las biopsias, el endoscopista colocó una prótesis anular para permitir el libre paso del aire por la región subglótica y la tráquea. El resto del examen físico mostró cifoescoliosis dorsal, adenomegalias pequeñas en el cuello y la ingle, hepatomegalia de dos traveses de dedo por debajo del reborde costal y disfonía muy acentuada.

Exámenes complementarios de laboratorio.

Eritrosedimentación: 90mm en la 1ª hora,

Eritrocitos: $4,2 \times 10^6/\mu\text{l}$, hematocrito: 36,3%, hemoglobina: 12,8 g/dl,

Leucocitos: $21.800/\mu\text{l}$, neutrófilos: 14,9%, eosinófilos: 66,7%, basófilos: 0%, linfocitos: 14,7%, monocitos: 3,7%

uremia: 37 mg/dl, uricemia: 2,2 mg/dl, glucemia: 74 mg/dl, creatininemia: 0,60 mg/dl, bilirrubina total: 0,9 mg/dl, directa: 0,4 mg/dl, transaminasa glutámico oxalacética: 6 U/ml, transaminasa glutámico pirúvica: 12 U/ml, fosfatasa alcalina: 301 U/ml, glutamyltranspeptidasa: 126 U/ml, proteínas totales: 7,5 g/dl, albúmina 3,2 g/dl, sodio: 138 mEq/l, potasio: 4,1 mEq/l.

Rx de tórax. Infiltrados heterogéneos en ambos vértices pulmonares, más acentuados y densos en el izquierdo.

Tomografía lineal del mediastino. Aumento del diámetro transversal del mediastino superior por masas heterogéneas y desviación de la tráquea.

Tomografía axial computarizada de tórax. Infiltrado denso del vértice del pulmón izquierdo, con un área central reblandecida. Infiltrados acinales pequeños y engrosamiento de los tabiques interalveolares y disminución del tamaño del pulmón izquierdo con desplazamiento del mediastino.

Tomografía computarizada del cuello. El examen fue dificultado por la movilidad del paciente. Se visualizó la colocación de una prótesis traqueal y subglótica.

Ecografía abdominal. Hepatomegalia homogénea, vía biliar intrahepática no dilatada, vesícula biliar de tamaño y contenido normal, colédoco de calibre normal. Páncreas difícil de observar por meteorismo. Bazo de 120 mm homogéneo. Riñones eco

estructura conservada. Adenomegalia del ligamento hepatoduodenal de 2 cm de diámetro isoecoica.

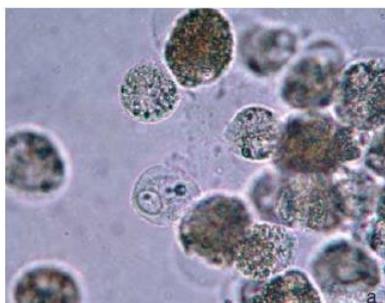
Tanto el examen micológico como el histopatológico permitieron llegar a un diagnóstico de certeza. Se realizaron, además, estudios serológicos y pruebas cutáneas.

Fue instaurado un tratamiento con una sola droga que mejoró considerablemente al paciente, recibiendo el alta médica del hospital.

Durante la internación se produjo la reducción de la leucocitosis a 12.300/ μ l y de la eosinofilia al 13,4%, en tanto que la fosfatasa alcalina aumentó a 630 U/ml. Debió recibir corticosteroides durante una semana para tolerar la colocación de la prótesis y se le administraron, además, dos monodosis de ivermectina.

Preguntas

1. ¿Cuál es la patología que aqueja al paciente, y quien la produce?
2. ¿Describa las formas en las que puede encontrarse el hongo y explique la patogenia del mismo?
3. ¿Cómo procesaría Ud. las muestras destinadas a los estudios microbiológicos?, y que características van a presentar los cultivos.
4. ¿En una coloración de una muestra clínica se puede observar el agente patógeno, explique?
5. Según la clínica del paciente con que micosis se correlaciona, nómbrelas. ¿Qué pruebas cutáneas haría?



Preparación al estado fresco de la biopsia traqueal, y coloración del patógeno

PROBLEMA CLÍNICO N° 4

Antecedentes Personales: Paciente L.P.A., sexo masculino, 31 años de edad, reside en San Antonio de Areco, Provincia de Buenos Aires. Trabajó como albañil. Adicto a cocaína, heterosexual promiscuo. Conocía su condición de VIH-seropositivo desde 1998, sólo realizó tratamiento antirretroviral durante 2 años con AZT, 3 TC. En el momento de la consulta no recibía tratamiento antirretroviral. Sufrió un herpes zoster intercostal izquierdo tres meses antes de la consulta.

Enfermedad actual: La enfermedad actual había iniciado 40 días antes con fiebre persistente, tos productiva, pérdida de peso no cuantificada, astenia y deterioro del estado general. Fue internado en el Hospital Carrillo del cual fue dado de alta a los pocos días, sin diagnóstico y con leve mejoría.

En el momento de su admisión en el Hospital Francisco Javier Muñiz se comprobó que el paciente estaba adelgazado, asténico, con palidez de piel y mucosas, refirió cefalea persistente, orientado en tiempo y espacio, colaborador, febril (temperatura axilar 38,5 °C), sin signos meníngeos ni de foco neurológico. Se observaron secuelas hiperpigmentadas del herpes zoster, una adenopatía supraclavicular izquierda, de 2 x 3 cm de diámetro, de consistencia firme, no adherida a los planos superficiales, adherida a los planos profundos, sin periadenitis, poco dolorosa a la palpación y hepatosplenomegalia moderada.

La semiología cardíaca y respiratoria no acusó signos de interés. La frecuencia cardíaca era de 96 por minuto, la respiratoria de 17 por minuto y la tensión arterial de 120-80 mm Hg.

Radiografía de tórax: imagen nodular en campo medio del pulmón derecho, de 3 a 4 cm de diámetro, rodeada por un halo con aspecto de vidrio esmerilado.

Exámenes complementarios de laboratorio:

Eritrosedimentación 71mm en la primera hora, hematíes $3.3 \times 10^6/\mu\text{l}$, leucocitos $3.900/\mu\text{l}$ (neutrófilos 46%, linfocitos 39%, monocitos 7%, eosinófilos 8%, B 0%), hemoglobina 10,5 g%, hematocrito 30,3%, plaquetas $179.000/\mu\text{l}$, glucemia 85 mg/dl, uremia 35 mg/dl, creatinemia 0,86 mg/dl, colesterolemia 117 mg/dl, ácido úrico 2,4 mg/dl, sodio 135 meq/l, potasio 4,2 meq/l. Proteínas totales 7,1 g%, albúmina 3,6 g%, láctico deshidrogenasa 475 U/ml.

Pruebas serológicas: HBc Ac positivo, HBs Ag negativo, HCV no reactivo, VDRL no reactivo, serología para tripanosomiasis americana (Chagas) no reactiva, serología para toxoplasmosis IgG positiva e IgM negativa.

Ecografía abdominal: Hepatomegalia homogénea, esplenomegalia de 125 mm, heterogénea con imágenes hipoecoicas, la mayor de 20 mm, el resto de los órganos sin alteraciones.

Se efectuó una punción lumbar y el examen del L.C.R. presentó 30 células/ μ l (80 neutrófilos 20% linfocitos), proteínas 241 mg/dl y glucosa 21 mg/dl. Se realizó la técnica de Burri cuya observación se muestra en la figura B.

Se le efectuaron hemocultivos para hongos por el método de lisis-centrifugación, en el cultivo se observó el crecimiento de una colonia cremosa.

Preguntas:

1. ¿Qué tipo de infección tiene el paciente, y que microorganismo podría estar produciéndola?
2. Describa las características microscópicas de patógeno, y su crecimiento en medios de cultivos
3. Indique que población es más susceptible de infectarse.
4. El paciente una vez infectado ¿la infección se puede diseminar, y a que órganos? Explique la patogenia de hongo.
5. ¿Para qué sirve y que observa con la técnica de Burri?

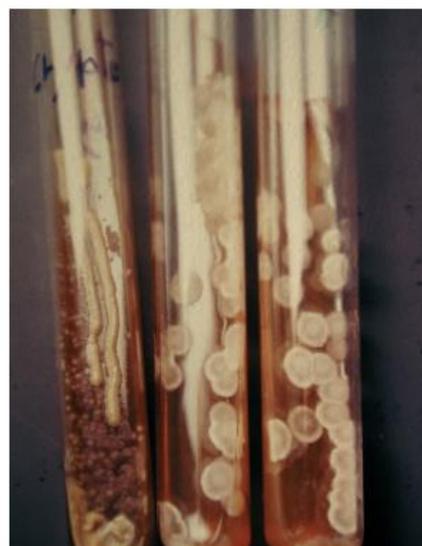


Figura 1: Hemocultivo por lisis-centrifugación donde se

PROBLEMA CLÍNICO Nº 5

La paciente A. B. acude al servicio de otorrinolaringología del hospital por presentar lesiones en lengua. La paciente tiene 65 años de edad, es oriunda de la Provincia de Buenos Aires.

Entre los antecedentes generales refiere que hace aproximadamente 6 meses fue intervenida quirúrgicamente y estuvo hospitalizada durante 8 días. En ese momento le indicaron terapia antibiótica por 13 días.

Al examen clínico bucal, se observó placa eritematosa de bordes difusos, superficie despapilada, ligeramente engrosada, localizada en el dorso de lengua de aproximadamente 3 x 4 cm. También se aprecia placa blanca (FOTO 1).



Refiere sentir ardor lingual desde hace dos semanas. Además se evidencia que la paciente es edéntula total superior e inferior, en la mucosa de paladar se observa placa eritematosa difusa con unos puntos rojizos más acentuados. En la mucosa de reborde superior derecho presenta zona eritematosa. (FOTO2).



La paciente es portadora de prótesis removibles total superior e inferior las cuales usa desde hace un año, las mismas se encuentran en buen estado, no las usa para dormir y realiza control de higiene adecuado.

Se indica toma de muestra por raspado para cultivo de la mucosa de lengua, mucosa de paladar y de las prótesis. Las mismas fueron sembradas en medio de Agar-Sabouraud por 48 horas. Se obtuvo resultado en el cultivo de las muestras de lengua y paladar, en prótesis fue negativo para hongos.

El tratamiento consistió en la administración tópica de Nistatina óvulos, 3 veces al día por dos semanas, dejando disolver el óvulo en la boca.

A las dos semanas se realizó control clínico, donde se observó ligera mejoría de la lesión con disminución de eritema en lengua y paladar y de la sintomatología. (FOTO 3).



A la tercera semana se hace control donde se evidencia disminución del eritema de lengua y paladar, no presentando ya el ardor lingual.

A la cuarta semana se observó notable mejoría de ambas lesiones. (FOTO 4).



Preguntas

1. Indique cual es la patología del paciente, y el hongo que la causa.
2. Describa al menos tres sitios donde presenta este hongo la patología citada e indique las manifestaciones clínicas observadas en el lugar de la toma de la muestra.
3. Nombre especies del género del hongo causante de este tipo de patologías.

4. Indique los factores que pueden predisponer a la aparición de esta enfermedad. En el caso clínico leído cual fue el factor predisponente?
5. En qué medio de cultivo se debe sembrar este patógeno, e indique y explique métodos de diferenciación de especies.

BIBLIOGRAFÍA

-Problemas clínicos en Micología Médica: problema N° 31. Ricardo Negroni, Alicia I. Arechavala, Elena Maiolo, Mario H. Bianchi, Gabriela Santiso, Santiago Garro y Tomás Orduna *Unidad Micología, Hospital de Infecciosas Francisco Javier Muñiz, Buenos Aires, Argentina* 62 *Rev Iberoam Micol* 2008; 25: 62-64.

-Problemas clínicos en Micología Médica: problema n° 36. Ricardo Negroni, Elena Maiolo, Alicia Arechavala, Roberto Duré, Cristian Sacheri y Tomas Orduna *Unidad Micología, Servicio de Endoscopia, Servicio de Otorrinolaringología, y Unidad 9, Hospital de Infecciosas Francisco Javier Muñiz, Buenos Aires, Argentina*

-Problemas clínicos en Micología Médica: problema n° 30. Elena Maiolo, Alicia I. Arechavala, Gabriela Santiso, Mario H. Bianchi, Florencia Troglio, Tomás Orduna y Ricardo Negroni. *Unidad Micología y Unidad 9 de Patología Regional, Hospital de Infecciosas Francisco Javier Muñiz, Buenos Aires, Argentina* 330 *Rev Iberoam Micol* 2007; 24: 330-331 *Casos clínicos* Dirección para correspondencia: Dr. Ricardo Negroni. *Unidad Micología. Hospital de Infecciosas Francisco Javier Muñiz. Uspallata n° 2272. 1282 Buenos Aires, Argentina* Fax: +54 11 4304 4655. E-mail: hmmicologia@intramed.net ©2007

-Problemas clínicos en Micología Médica: problema n° 12. Ricardo Negroni, Alicia Arechavala y Pablo Bonvehí. *Centro de Estudios Micológicos, Buenos Aires, Argentina.* *Rev Iberoam Micol* 2004; 21: 213-215 213

-Candidiasis eritematosa de la cavidad bucal. Reporte de un caso y revisión de la literatura. *VOLUMEN 41 N° 3 / 2003*