

MICOLOGÍA MÉDICA

Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio

Rubén López Martínez • Luis Javier Méndez Tovar
Francisca Hernández Hernández • Laura Rosio Castañón Olivares

- Taxonomía actualizada y descripción de nuevas micosis
- Incorporación de nuevos microorganismos al reino fungi
- Inclusión de nuevas técnicas de laboratorio

booksmedicos.org

trillas 

MICOLOGÍA MÉDICA

Procedimientos para el
diagnóstico de laboratorio

Rubén López Martínez • Luis Javier Méndez Tovar

Francisca Hernández Hernández • Laura Rosio Castañón Olivares

booksmedicos.org



EDITORIAL
TRILLAS

México, Argentina, España,
Colombia, Puerto Rico, Venezuela





Prólogo

El conocimiento de los hongos se remonta a la prehistoria. Estos organismos han acompañado al hombre, sea como fuente de alimento o ligado a rituales mágico-religiosos. Tal es el caso de los hongos pertenecientes a los géneros *Chitocybe*, *Panaeolus*, *Psilocybe* y *Stropharia*. A algunos de éstos se les conoció en la América prehispánica como "carne de los dioses". No obstante, la micología médica data del siglo XIX con los estudios de Langenbeck sobre candidosis, de Mahon en relación con la tiña alopecica y de Gruby sobre el favus (autor que en 1841 describiría, antes que Roberto Koch, los hechos que se requiere demostrar para que un microorganismo sea considerado agente de una enfermedad). Más adelante, Sabouraud se encargaría, con la publicación de su libro *Les Teignes*, de iniciar el estudio científico y sistemático de los hongos patógenos. Habría que comentar aquí que algunas enfermedades producidas por bacterias, como los actinomicetos y algunos vegetales, se estudian clásicamente dentro de la micosis.

La comprensión de las micosis requiere del conocimiento profundo del parásito y del hospedero. Estas relaciones parásito-hospedero constituyen la esencia del estudio de las micosis, así como de todas las enfermedades de origen infeccioso; su estudio se apoya en los datos proporcionados por los laboratorios.

Escribir un libro sobre procedimientos de laboratorio para confirmar la etiología micótica de un padecimiento no es tarea fácil. Los autores de este tipo de textos han de igualar o superar ciertos libros clásicos, como el *Précis de Microscopie* de Maurice Langeron (Masson et Cie, París, 1949), quien además de haber sido un gran micólogo fue el profesor de Antonio González Ochoa, fundador de la micología médica en México.

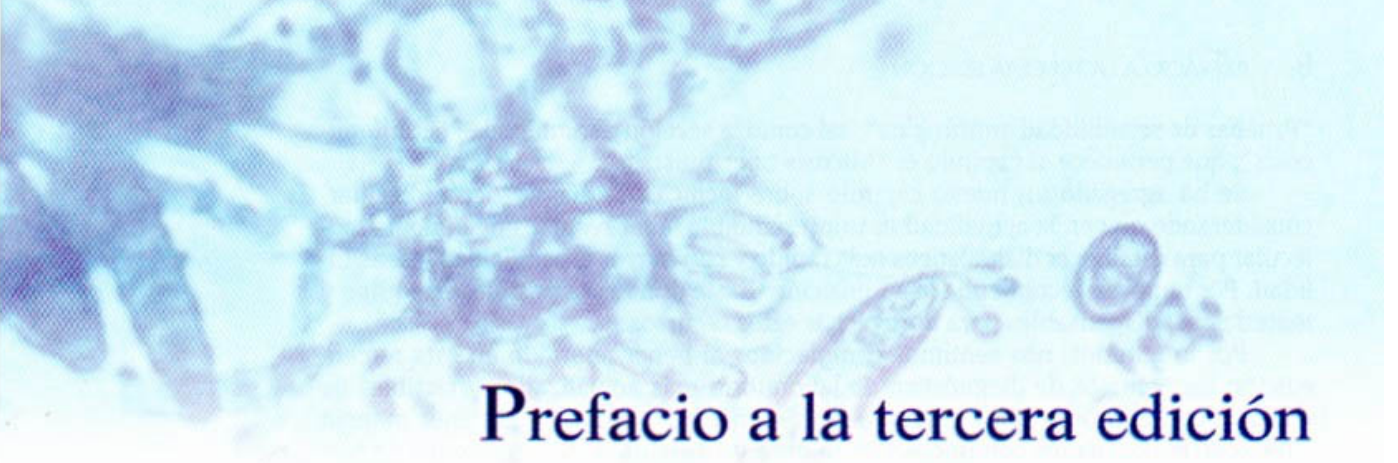
Esta tarea ha sido ampliamente lograda por Rubén López Martínez, Luis Javier Méndez Tovar, Francisca Hernández y Rosio Castañón Olivares, líderes de la micología nacional desde el Laboratorio de Micología Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Al leer el contenido de su libro, llama la atención la claridad y la mesura con que se describen las diferentes técnicas, la morfología y la fisiología de los hongos productores de infecciones superficiales, subcutáneas, sistémicas y por oportunismo, así como las llamadas pseudomicosis superficiales y profundas. Es un abordaje novedoso escrito con sabiduría.

Los médicos, pero especialmente los laboratoristas que no trabajan en un laboratorio especializado en micología agradecerán el amplio capítulo que se refiere a

los hongos contaminantes más comunes en el laboratorio, ya que el desconocimiento de estas especies y su confusión con agentes patógenos crea errores en ocasiones de gran trascendencia en los cuales va de por medio la vida de un individuo. Otro gran acierto del libro es ocuparse de manera amplia, casi como un "recetario de cocina", de la descripción de las diferentes técnicas de laboratorio, así como de las medidas de protección necesarias en el manejo de muestras biológicas y cultivos, cuando se sospechan infecciones como la producida por *Coccidioides immitis*.

Ya hacía falta un libro en lengua española como el que nos presentan López, Méndez, Hernández y Castañón. Estoy seguro de que este texto llegará con el tiempo a ser uno de nuestros "clásicos" en la literatura referente al laboratorio de enfermedades infecciosas.

ERNESTO MACOTELA-RUIZ



Prefacio a la tercera edición

Esta tercera edición, corregida y aumentada, ofrece a los estudiantes y profesionistas dedicados al quehacer de las ciencias biomédicas un importante instrumento para desempeñar eficientemente las tareas de diagnóstico de laboratorio de las micosis. Después de haberse agotado la segunda edición de este libro, consideramos que sigue habiendo una demanda por conocer y actualizar esta disciplina micológica.

En la presente edición se ha revisado y actualizado cada capítulo, adecuándolo en todos los aspectos a los conocimientos de hoy día. Esta actualización ha obligado a realizar cambios sustanciales en diferentes puntos:

- a) En la taxonomía se han recomendado géneros y especies de hongos que estaban mal ubicados.
- b) En la nomenclatura se han denominado correctamente ciertas micosis como la lacaziosis, en lugar de la lobomicosis.
- c) Respecto a la naturaleza fúngica de algunos organismos, muchos de ellos se han incorporado al reino fungi, como los Microsporidia, de los cuales existen aproximadamente 160 géneros, siendo el *Encephalitozoon* uno de ellos con poder patógeno para mamíferos.
- d) También se han sustituido más de 30 imágenes; unas eran esquemas y actualmente se cuenta con fotografías de buena calidad e ilustrativas; otras ya eran fotografías, pero no tenían la calidad suficiente o las estructuras no eran del todo claras.

En cuanto a las técnicas de laboratorio para el diagnóstico de las micosis, se han eliminado algunas que ya son obsoletas, por una parte, por lo difícil o imposible de adquirir los componentes de las fórmulas y, por otra parte, por la dificultad de realizarse y porque no existen normas de estandarización en cuanto a sus procedimientos y resultados. Por otra parte, se proponen nuevas técnicas de diagnóstico, muchas de las cuales son de procedencia comercial, siendo en ocasiones más accesibles y económicas aun para los laboratorios clínicos con equipamientos y recursos económicos limitados.

Por su reconocida experiencia y por la trascendencia actual del tema, en esta ocasión se invitó a la doctora Patricia Manzano Gayosso a escribir el capítulo 11:

“Pruebas de sensibilidad antifúngica”, así como la sección denominada “Feohifomicosis”, que pertenece al capítulo 6: “Micosis oportunistas.”

Se ha agregado un nuevo capítulo sobre técnicas de diagnóstico molecular, considerando que en la actualidad es imprescindible tener recursos de biología molecular para establecer diagnósticos más rápido y con mayor especificidad y sensibilidad. Por tanto, se recomienda la adquisición, hasta donde sea posible, de equipo y materiales indispensables para aprovechar estos recursos.

Por lo anterior, nos sentimos complacidos al haber aportado en esta tercera edición los recursos de diagnóstico de laboratorio más actualizados y factibles de realizar, con el propósito de colaborar con el médico tratante en el mejor manejo clínico de los pacientes con micosis. Esta obra va dirigida a los estudiantes de Medicina, Química y Biología para que cuenten con el acervo de conocimientos y las destrezas necesarias para cumplir satisfactoriamente con su currículo escolar.

LOS AUTORES

Autores y colaboradora

AUTORES

Rubén López Martínez. Profesor titular "C" de tiempo completo. Jefe del Laboratorio de Micología Médica. Asesor académico de maestría y doctorado en Ciencias Biomédicas, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Micólogo egresado del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales (actualmente Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica), Secretaría de Salud. Estancia de perfeccionamiento en Micología, Instituto Pasteur de París, Francia, y en el Center for Diseases Control (CDC), Atlanta, Georgia, EUA. Miembro del Sistema Nacional de Investigadores Nivel 2. Miembro titular de la Academia Nacional de Medicina.

Luis Javier Méndez Tovar. Investigador asociado "C", Laboratorio de Investigación Médica en Dermatología y Micología, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Profesor titular de micología, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. Profesor titular del curso de Micología Médica, Programa de Especialidad en Dermatología, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS. Ex becario del Instituto Pasteur de París, Unidad de Micología, París, Francia. Profesor visitante en el Departamento de Inmunología, Universidad de Londres, Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte.

Francisca Hernández Hernández. Maestra y doctora en Ciencias Biomédicas. Profesora titular "B" de tiempo completo. Profesora titular de Micología y directora de tesis de pregrado y posgrado, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. Ex becaria de la Unidad de Micología, Instituto Pasteur, París, Francia. Investigadora visitante del Laboratorio de Ecoparasitismo del Instituto Pasteur de Lille, Francia.

Laura Rosio Castañón Olivares. Doctora en ciencias. Profesora titular A de tiempo completo y profesora titular de Micología Médica. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. Ex becaria del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri, La Habana, Cuba.

COLABORADORA

Patricia Manzano Gayosso. Médica cirujana egresada de la Facultad de Medicina, UNAM. Maestra en Ciencias Biomédicas (micología), Facultad de Medicina, UNAM. Diplomado en Micología Médica, misma facultad. Diplomada en micología clínica a distancia, Hospital General "Dr. Manuel Gea González", Secretaría de Salud. Profesora titular A de tiempo completo, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. Profesora titular de Micología Médica (pregrado), misma facultad. Profesora adjunta del taller de biología de hongos, Facultad de Ciencias, UNAM. Profesora asociada del diplomado en Micología Médica, Facultad de Medicina, UNAM. Médica especialista en dermatología, Hospital General "Dr. Darío Fernández Fierro" (Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado).



Índice de contenido

Prólogo	5
Prefacio a la tercera edición	7
Autores y colaboradora	9
Autores, 9. Colaboradora, 10.	
Cap. 1. Generalidades	13
Características de los hongos, 13. Mecanismos de infección, 22. Conceptos fundamentales de la micología médica, 24. Bibliografía, 26.	
Cap. 2. Toma de especímenes	27
Principios científicos básicos derivados del conocimiento teórico, 27. Bibliografía, 31.	
Cap. 3. Micosis superficiales	33
Dermatofitosis, 33. Agentes etiológicos, 34. Pitiriasis versicolor y dermatitis seborreica, 47. Tiña negra, 50. Piedra negra, 51. Piedra blanca, 52. Otomicosis, 53. Bibliografía, 53.	
Cap. 4. Micosis subcutáneas	55
Micetoma, 55. Esporotricosis, 63. Cromoblastomycosis, 66. Lacaziosis (lobo), 71. Conidiobolomycosis, 71. Basidiobolomycosis, 73. Bibliografía, 75.	
Cap. 5. Micosis sistémicas	77
Histoplasmosis, 77. Inoculación en animales, 80. Coccidioidomycosis, 80. Paracoccidioidomycosis, 84. Blastomycosis, 87. Bibliografía, 89.	
Cap. 6. Micosis oportunistas	91
Candidosis, 91. Criptococosis, 98. Mucormycosis, 101. Aspergilosis, 105. Neumocistosis, 110. Peniciliosis por <i>Penicillium Marneffe</i> , 111. Rodotorulosis, 111. Sacaromicosis, 112. Microsporidiosis, 112. Hialohifomicosis, 113. Feohifomicosis, 121. Bibliografía, 124.	

Cap. 7. Seudomicosis	127
Seudomicosis superficiales, 127. Eritrasma, 127. Tricomycosis axilar, 128. Prototecosis, 129. Seudomicosis subcutáneas por actinomicosis, 129. Rinosporidiosis, 132. Seudomicosis sistémicas, nocardiosis, 133. Bibliografía, 134.	
Cap. 8. Hongos contaminantes comunes de laboratorio	135
Bibliografía, 141.	
Cap. 9. Procedimientos de laboratorio	143
Introducción, 143. Técnicas de montaje, 145. Técnicas de tinción, 145. Técnicas de microcultivo, 149. Técnica tradicional, 150. Medios de cultivo, 151. Preparación de levaduras para pruebas bioquímicas, 165. Medios para auxanograma, 166. Colección y conservación de cultivos, 166. Procedimientos para la extracción, visualización y cuantificación de ácidos nucleicos, 170. Cuantificación de ácidos nucleicos por espectrofotometría, 172. Inoculación en animales, 173.	
Cap. 10. Diagnóstico molecular de las micosis	175
Reacción en cadena de la polimerasa como herramienta diagnóstica, 175. Reacción en cadena de la polimerasa, 176. Ciclo de amplificación, 176. Bibliografía, 181.	
Cap. 11. Pruebas de sensibilidad antifúngica	183
Método de microdilución en caldo para levaduras (M27-A3), 183. Método de microdilución EUCAST, 186. Métodos comercializados de microdilución, 186. Métodos de difusión, 188. Método de difusión en agar con tabletas y discos, 189. Bibliografía, 191.	
Cap. 12. Medidas de seguridad	193
Riesgos biológicos, 193. Riesgos de equipo y material, 194. Manejo de las muestras de alto riesgo, 195. Control de calidad, 196. Precauciones que debe tener el personal de laboratorio, 197. Medidas preventivas que debe vigilar el jefe de sección, 197. Medidas preventivas que observará la coordinación de toma de productos, 198. Bibliografía, 198.	
Glosario	199
Índice analítico	203

Generalidades

CARACTERÍSTICAS DE LOS HONGOS

Los hongos son organismos muy abundantes y ubicuos en la naturaleza; actualmente se encuentran registradas 72 000 especies, pero se calcula que existen 1 500 000. Tienen una gran diversidad de formas y tamaños y pueden vivir en los sustratos y condiciones ambientales más variados; aprovechan los elementos nutritivos muy simples y forman parte elemental de la vida del hombre y de otros organismos.

Los hongos son heterótrofos, se alimentan por absorción, están formados por células eucariotas y pueden ser uninucleados o multinucleados; el conjunto de las hifas, el cual forma el micelio, puede ser homotático o heterotático, dicariótico y rara vez diploide. La pared celular está constituida por polisacáridos del tipo de la quitina y también se encuentran mananas, glucanas y celulosa. El principal componente lipídico de la membrana celular es el ergosterol, compuesto cuya síntesis se ve afectada por los antimicóticos azólicos. Los hongos sintetizan lisina por la vía del ácido L-aminolipídico. Son aerobios y la reproducción la efectúan ya sea por un mecanismo sexual (*teleomorfismo*) o por uno asexual (*anamorfismo*). Los hongos unicelulares están representados por las levaduras y los multicelulares por los hongos filamentosos.

TAXONOMÍA

A partir de la década de 1990, basados en la combinación de técnicas de biología molecular,

morfología, inmunología y estudios fisiológicos, algunos investigadores, como Kendrick, clasifican a los organismos vivos en siete reinos: archeabacteria, eubacteria, chromista, protozoa, fungi, plantae y animalia (cuadro 1.1).

Estas técnicas han permitido ubicar a la mayoría de los organismos, con características de

Cuadro 1.1. Clasificación de los seres vivos y phylum donde se encuentran ubicados los hongos*

<i>Tipos de células</i>	<i>Reinos</i>	<i>Phylum importantes en micología</i>
Procarionte	Archeabacteria Eubacteria	
Eucarionte	Protozoa	Plasmodiophoromycota Acrasiomycota Myxomycota Dictyosteliomycota
	Chromista	Hypochytriomycota Oomycota Labyrinthulomycota
	Fungi	Ascomycota Basidiomycota Zygomycota
	Plantae	
	Animalia	

* Tomada a partir de lo propuesto por Kendrick, B., 2002.

hongos, en el reino fungi; también han sido útiles para reclasificar organismos que erróneamente se creía que eran hongos, por ejemplo: *Phytium insidiosum* y *Rhinosporidium seeberi*, que en la actualidad se ubican en reinos diferentes; por el contrario, las especies de *Pneumocystis*, organismos que originalmente se consideraron protozoarios, hoy día se ubican dentro de los hongos.

Los trabajos de Wakefield y Eriksson demuestran que la ubicación taxonómica, basada en homologías de ácidos nucleicos, aún es confusa, pues, dependiendo del fragmento secuenciado, un organismo puede ubicarse en uno u otro reino; así, estos trabajos, a diferencia de lo propuesto por Kendrick, ubican a todos los hongos patógenos en el reino fungi (cuadro 1.2).

Los organismos del reino fungi se dividen, según su forma de reproducción sexual, en cuatro phyla: Ascomycota, Basidiomycota, Zygomycota y Chytridiomycota. En las clasificaciones antiguas se mencionaba un phylum, donde se colocaba a los hongos a los que no se les había descubierto su forma de reproducción sexual; esta categoría taxonómica, llamada Deuteromycota, no se emplea actualmente, pues se considera que con los estudios disponibles hoy día es posible agrupar a todos los hongos en alguno de los phyla antes mencionados; en todo caso, es mejor llamar *mitospóricos* a los hongos sin reproducción sexual conocida y *meiospóricos* a los hongos con reproducción sexual conocida.

Según diversas publicaciones, el número de hongos que causan o han causado enfermedades no rebasa las 300 es-

pecies, esto es, 0.41 % de las especies conocidas.

Debido a su gran número y a la diversidad de características, no es posible definir de manera precisa

Cuadro 1.2. Clasificación taxonómica de los principales agentes productores de micosis.

Phylum	Orden	Familia	Género
Ascomycota	Dithideales	Lophostomataceae	Pyrenochaeta
		Piedraiaceae	Piedraia
		Testudinaceae	Neotestudina
	Eurotiales	Trichocomaceae	Aspergillus (M)*
			Penicillium (M)
	Hipocreales	Hipocreaceae	Acremonium (M)
			Cylindrocarpum (M)
	Microascales Onygenales	Microasceae	Pseudallescheria
		Arthrodermataceae	Arthroderma Microsporum spp Epydermophyton sp Trichophyton spp Malbranchea (M)
		Onygenaceae	Ajellomyces Histoplasma Blastomyces Coccidioides (M)
Basidiomycota	Ophiostomatales	Ophiostomataceae	Sporothrix spp
	Pneumocystidales	Pneumocystidaceae	Pneumocystis**
	Saccharomycetales	Endomyces	Geotrichum
		Saccharomycetaceae	Blastoschizomyces (M) Candida
	Incierto		Cladophialophora (M)
			Exophiala (M)
			Fonsecaea (M)
			Madurella (M)
			Paracoccidioides (M)
			Phialophora (M) Wangiella (M)
	Sporidiales	Sporidiobolaceae	Filobasidiella
			Cryptococcus spp Malassezia spp
	Incierto		Trichosporon spp
Zygomycota Basidiobolus	Entomophthorales	Basidiobolaceae	Basidiobolus
		Incierta	Lacazia
	Mucorales	Mucoraceae	Rhizomucor
			Rhizopus
			Saksenaceae

*M, mitospórico.

**Hongos que, según otras clasificaciones, pertenecen a otros reinos.

Tomado y modificado de Topley & Wilson's, *Microbiology and microbial infections*, 1998.

a los hongos; se prefiere hablar de sus principales características, como son: organelos citoplásmicos, tipo de nutrición, composición bioquímica de la membrana o de la pared, y, en las últimas décadas, los estudios de biología molecular, que permiten determinar la homología que existe entre diversos fragmentos de material nuclear.

MORFOLOGÍA

La célula fúngica puede ser uninucleada o multinucleada y está rodeada por una membrana citoplasmática bilipídica que tiene una estructura semejante a la de otras membranas de los seres vivos, la cual está formada por una doble capa de lípidos que se deslizan una sobre otra. El lípido marcador de reino es el ergosterol; la membrana plasmática tiene, además, unidas diversas proteínas y azúcares.

La pared celular está compuesta por varias capas de polisacáridos ramificados, llamados de manera general quitinas, mananas y glucanas. Esta estructura protege a los hongos de cambios ambientales y les da la forma característica de cada género o especie. Se ha demostrado que las mananas de algunos hongos interfieren con la fagocitosis y, en consecuencia, se consideran entre los factores de patogenicidad.

En el citoplasma se encuentran organelos comunes a otros organismos eucariotas, como mitocondrias, ribosomas, lisosomas, retículo endoplásmico, liso o rugoso, vacuolas, microfibrillas, etc. Existen, además, algunas estructuras especiales de los hongos, como los cuerpos cisternales que liberan microvesículas y macrovesículas; estas tres últimas estructuras están implicadas en la formación de la pared y también en el crecimiento y forma de los hongos.

La mayoría de los hongos son microscópicos y la unidad anatómica fundamental es la hifa, que en los hongos unicelulares está representada por la levadura, de forma redonda u oval. En cambio, cuando son multicelulares, los hongos adoptan generalmente la forma filamentosa; los filamentos o hifas pueden ser cenocíticos, como sucede en el phylum Zygomycota; o bien, septados, como sucede en los otros phyla.

El diámetro de las hifas es de 3 a 20 μm ; el crecimiento es apical y tienden a ramificarse para formar el micelio o talo, el cual se puede observar a simple vista en medios de cultivos para hongos

o como un moho cuando los hongos se desarrollan sobre algún material orgánico. Según su forma, las hifas pueden ser vesiculosas, nodosas, pectinadas, en raqueta y en candelabro fávico (fig. 1.1).

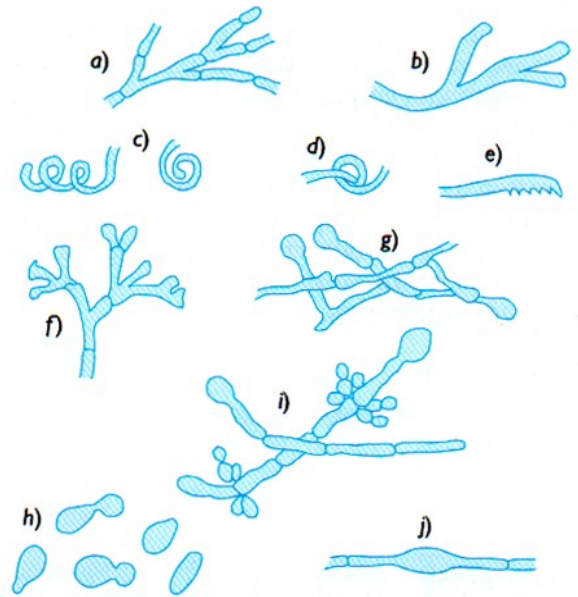


Fig. 1.1. Tipos de hifas: a) septadas; b) cenocíticas (aseptadas); c) en espiral; d) nodosas; e) pectinadas; f) en candelabro fávico; g) en raqueta; h) hifas unicelulares (levaduriformes); i) pseudohifas; j) vesiculosas.

Según su función, el micelio se divide en vegetativo y reproductor. El primero está inmerso en el sustrato y se encarga de la absorción de los nutrientes; el segundo, llamado también micelio aéreo, se encuentra libre y en él se desarrollan las estructuras de reproducción esporas, las cuales tienen la función de multiplicación y dispersión de los hongos en la naturaleza.

REPRODUCCIÓN

La reproducción en el reino Eumycota puede ser asexual o sexual; la mayoría de investigadores opina que todos los hongos tienen ambos tipos de reproducción; sin embargo, la forma más conocida es la reproducción asexual. A los hongos que se les conoce la forma sexual, de manera general se les denomina meiospóricos (realizan meiosis), mientras que aquellos de los que se conoce sólo su reproducción asexual se denominan mitospóricos.

Las estructuras de reproducción fúngica se denominan *esporas*, las cuales pueden originarse por un proceso de recombinación sexual que, de acuerdo con el phylum y la forma de la estructura que les da origen, son de tres tipos: 1. ascosporas (Ascomycota); 2. basidiosporas (Basidiomycota) y 3. cigosporas (Zygomycota) (fig. 1.2). Existen también esporas de tipo asexual las cuales se dividen en tres grandes grupos: a) taloconidios, cuando se originan por modificación del material de las hifas preexistentes; b) blastoconidios, cuando todo el material de la estructura de reproducción es de neoformación, y c) esporangiosporas, ya que son estructuras de reproducción asexual originadas en cuerpos globosos de hongos de los Zygomycota llamados esporangios.

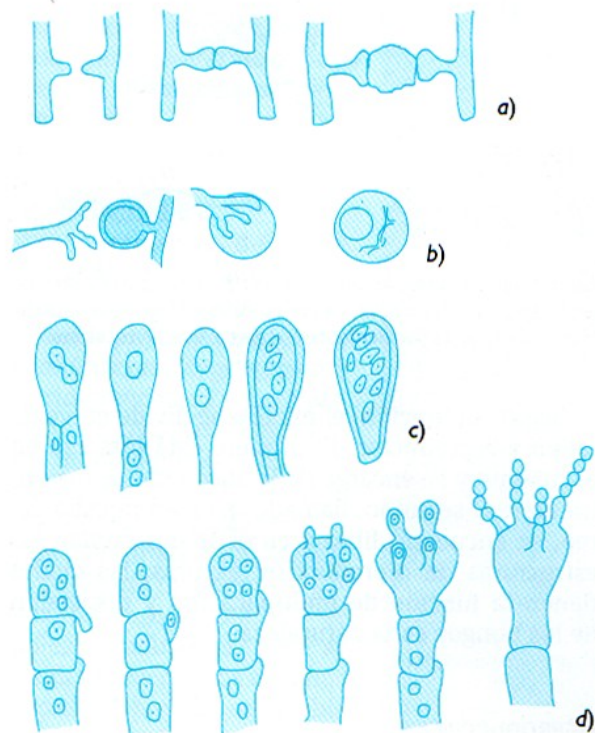


Fig. 1.2. Tipos de esporas sexuales: a) cigosporas; b) oosporas; c) ascosporas; d) basidiosporas.

Las ascosporas están contenidas en estructuras cerradas llamadas *ascas* y éstas emergen en muchas ocasiones de un estroma que forma el cuerpo de fructificación, llamado *ascocarpo*, el cual, dependiendo de su forma, puede ser apotecio, peritecio, cleistotecio, gimnotecio o seudotecio. En un grupo de hongos de este phylum, las ascas están

libres (sin cuerpo de fructificación); los hongos son conocidos como hemiascomycetos.

Las basidiosporas emergen de los esterigmas que están sobre los basidios y éstos generalmente también están contenidos en un cuerpo fructífero llamado basidiocarpo (fig. 1.3). Entre los pocos hongos invasivos que producen estas estructuras tenemos al género *Filobasidiella*, que es la forma de reproducción sexual de *Cryptococcus* spp.

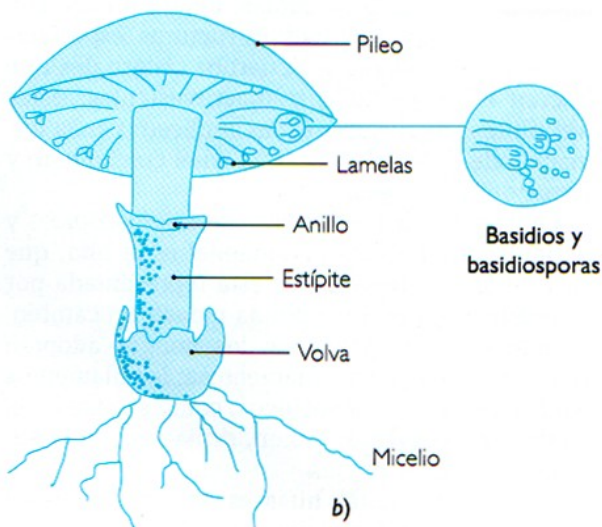
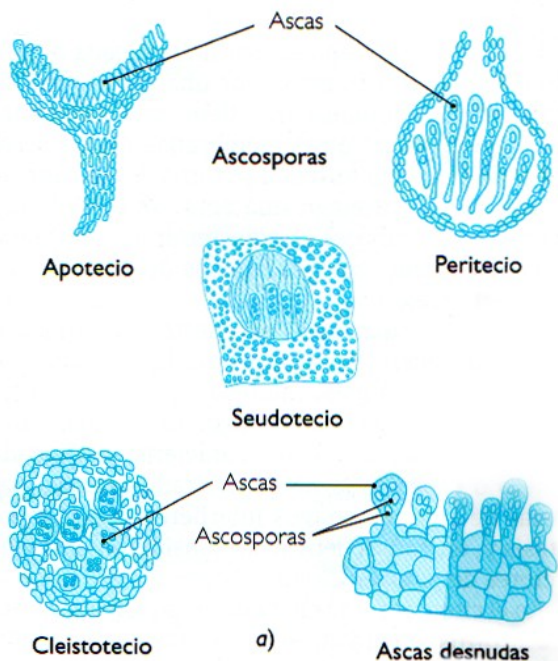


Fig. 1.3. Cuerpos fructíferos de esporas sexuales: a) ascocarpos; b) basidiocarpos.

En los hongos mitospóricos sólo se observa el tipo de reproducción asexual. Los conidios, según su forma o bien el tipo de célula conidiógena de donde proceden, son denominados artroconidios, dictioconidios, blastoconidios, clamidoco-

nidios, fialoconidios, poroconidios, aneloconidios, etcétera (fig. 1.4).

En los procesos de conidiogénesis, los conidios tienen una nomenclatura específica y pueden ser dependiendo de su origen: *blásticos* o *tálicos* (cuadro 1.3).

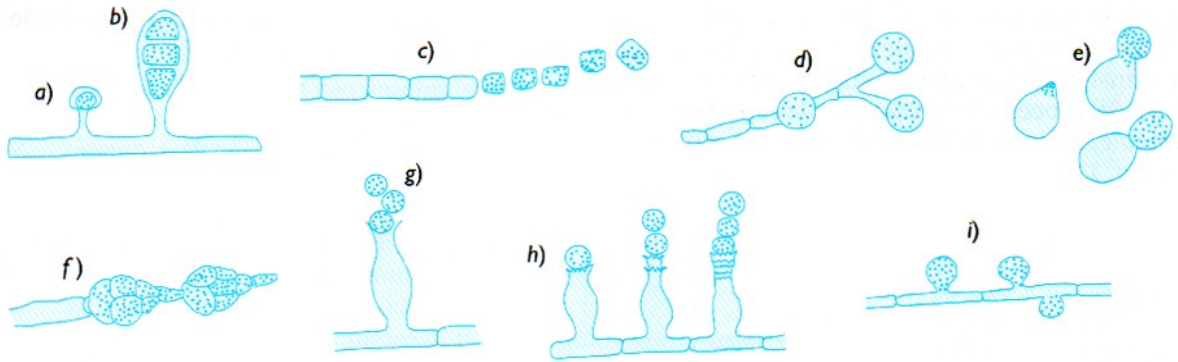


Fig. 1.4. Diversos tipos de conidios: a) microconidios; b) macroconidios; c) artroconidios; d) clamidococonidios; e) blastoconidios; f) dictioconidios; g) fialoconidios; h) aneloconidios; i) aleurioconidios.

Cuadro 1.3. Nomenclatura y categorías de los conidios y de las células conidiógenas.

Origen del conidio	Participación de la pared celular en la formación del conidio	Posición del conidio en relación con la célula conidiógena (PC)	Orden de distribución del conidio con respecto a otros conidios (OD)	Desarrollo de la célula conidiógena en la sucesión de los conidios (CC)	Tipos especiales de células conidiógenas
Blástico	Holoblástico	Intercalar	Solitario Catenulado Botrioso	Determinada Proliferativa	Porógena
		Terminal Sincronógena Basípeta Acrópeta		- Simpodial - Percurrente - Basáuxica	
	Enteroblástico	Terminal Basípeta Acrópeta	Solitario Catenulado	Retrogresiva	Fialídica Anelídica Simpodial
				Determinada Proliferativa	
Tálico	Holotálico	Terminal Intercalar	Solitario	- Percurrente	
	Holoártico	Terminal Intercalar	Catenulado	Retrogresiva	
	Enteroártico	Terminal Intercalar	Solitario Catenulado	Determinada Proliferativa Simpodial	
				Determinada Proliferativa	

En los primeros hay un proceso de neoformación por síntesis y lisis de material, y a partir de una porción de la célula conidiógena hay un agrandamiento del primordio. Posteriormente se forma el septo que va a delimitar el nuevo conidio, el cual se separa por un proceso de esquizólisis. En la formación de los conidios tálicos participa la célula conidiógena completa, dándose un proceso de transformación del material. El septo se forma antes del proceso de formación y la separación del nuevo conidio se da por rexólisis o por esquizólisis (fig. 1.5).

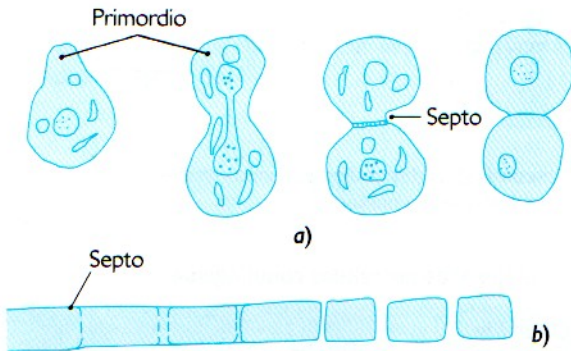


Fig. 1.5. Tipos de conidios según su origen: a) conidio blástico; el septo se forma después de iniciado el proceso de conidiogénesis; b) conidio tálico; el septo se forma antes del proceso de conidiogénesis.

Los conidios blásticos pueden ser holoblásticos si en el proceso de formación del conidio participan todas las capas de la pared de la célula conidiógena o enteroblásticos si sólo participa la capa interna de la pared (fig. 1.6). Por tanto, los conidios tálicos pueden ser holotálicos, holoártricos y enteroártricos; los conidios ártricos resultan de la fragmentación de la hifa (fig. 1.7).

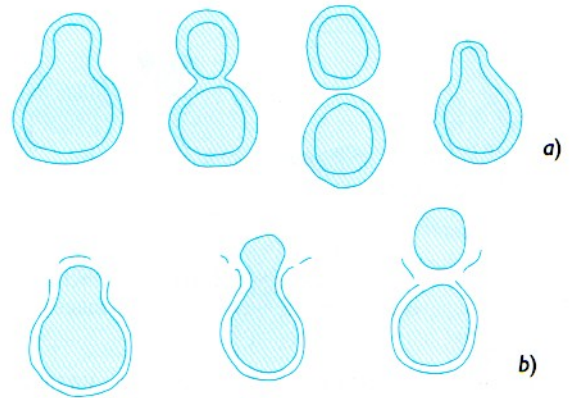


Fig. 1.6. Tipos de conidios blásticos: a) conidio holoblástico; en el proceso de formación del nuevo conidio participan las dos capas de la pared de la célula conidiógena; b) conidio enteroblástico: en el proceso de formación del nuevo conidio participa solamente la capa interna de la pared de la célula conidiógena.

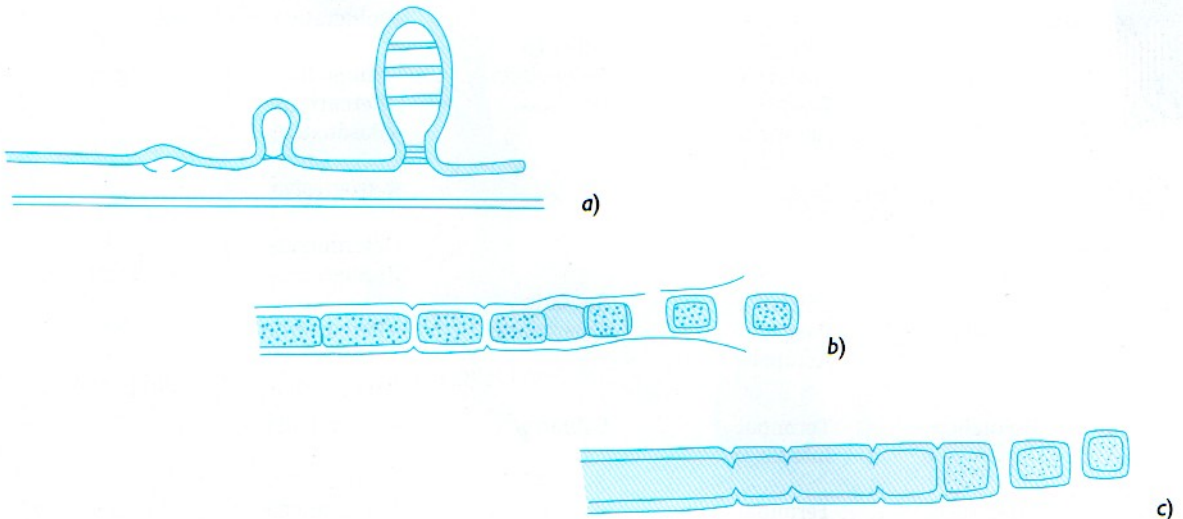


Fig. 1.7. Tipos de conidios tálicos: a) conidio holotálico, en el que participan las dos capas de la célula conidiógena; b) conidio enteroártrico, en el cual solamente participa la capa interna de la pared de la célula conidiógena; los fragmentos se separan, generalmente, por rexólisis; c) conidio holoártrico, en el que participan las dos capas de la pared de la célula conidiógena y se separan por esquizólisis.

Tomando en cuenta la posición del conidio (PC) respecto a la célula conidiógena, pueden ser de tipo: *terminal*, cuando el conidio se origina en el extremo distal de una hifa; *intercalar*, cuando el conidio se origina en algún punto a lo largo de la hifa; *basípeta* si el conidio más joven se localiza en la base de una cadena de conidios; *acrópeta*, cuando el conidio más joven se localiza en el extremo distal de una cadena de conidios, y *sincronógena*, cuando varios conidios se desarrollan al mismo tiempo a partir de la célula conidiógena (fig. 1.8).

Según el orden de distribución (OD) del conidio en relación con otros conidios puede ser: *solitario*, cuando se origina de manera aislada; *catenulado* o *en cadena*, cuando los conidios están colocados y unidos uno después de otro, y *botrioso*, cuando se originan varios conidios al mismo tiempo a partir de la misma célula conidiógena en diferentes puntos (fig. 1.9).

Según las modificaciones de tamaño que sufre la célula conidiógena (CC) en el proceso de la conidiogénesis, ésta puede ser: *determinada*, cuando el tamaño de la célula conidiógena no se modifica, y *proliferativa*, cuando, después de haber producido un conidio, la célula conidiógena

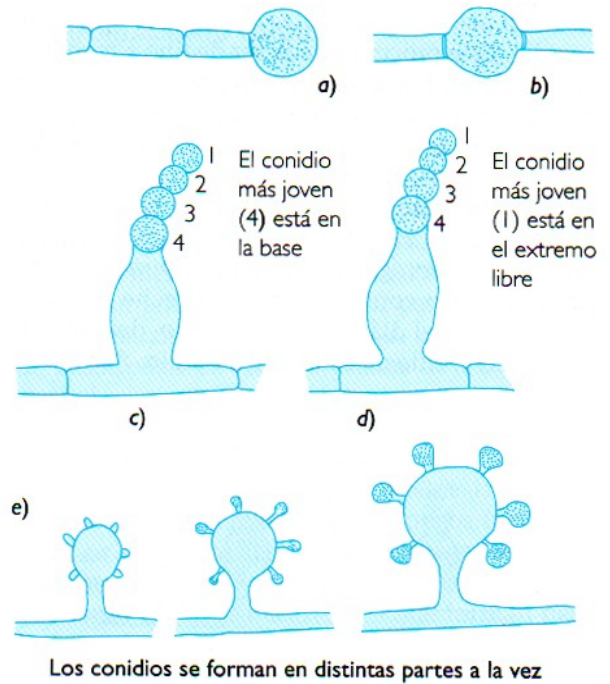


Fig. 1.8. Clasificación de los conidios en relación con la célula conidiógena: a) terminal; b) intercalar; c) basípeta; d) acrópeta; e) sincronógena.

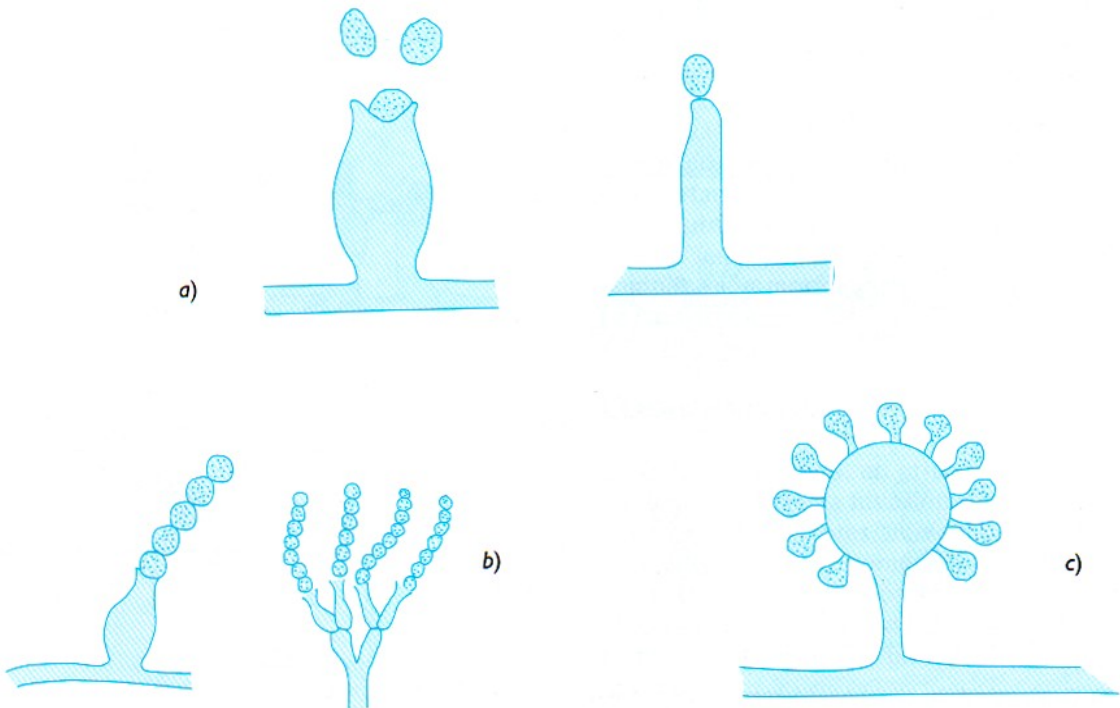


Fig. 1.9. Clasificación de los conidios de acuerdo con su disposición con respecto a otros conidios: a) solitario; b) catenulado; c) botrioso.

sufre un alargamiento antes de originar un nuevo conidio. Este proceso puede ser de tipo *simpodial*, percurrente o basáuxico; y *retrogresivo*, cuando la célula conidiógena sufre una disminución de tamaño después de la producción de cada conidio (fig. 1.10).

Las células conidiógenas pueden tener ciertas características especiales de tipo morfológico y pueden ser: *porógenas*, cuando el punto de origen del nuevo conidio es muy estrecho en comparación con el diámetro del conidio, dejando un orificio en el sitio de salida del conidio; *fialídicas*,

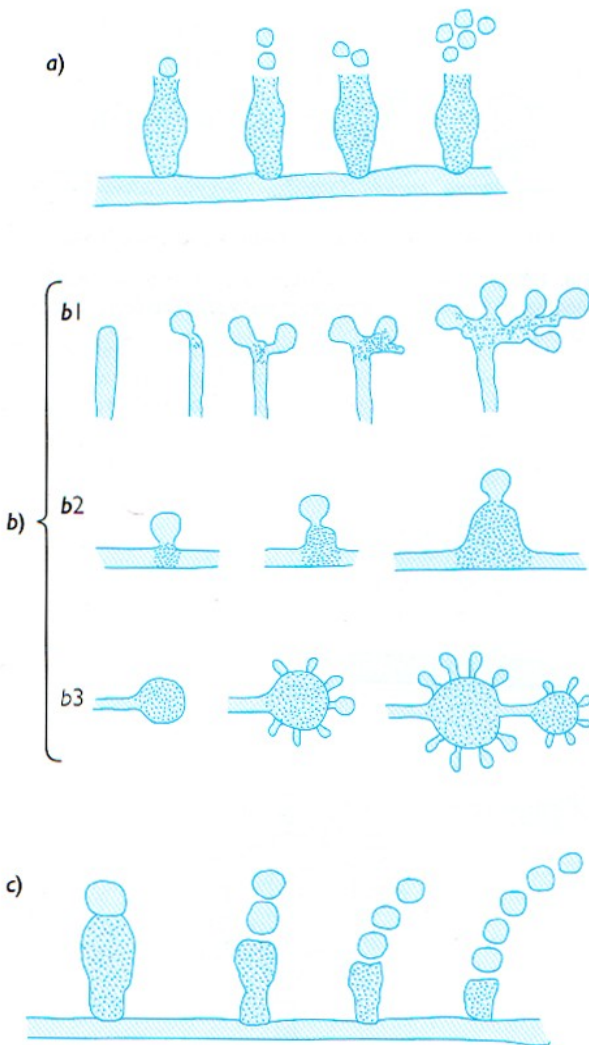


Fig. 1.10. Clasificación de las células conidiógenas de acuerdo con la modificación de tamaño o de forma que sufren durante la conidiogénesis: a) determinada; b) proliferativa: (b.1) simpodial; (b.2) basáuxica; (b.3) percurrente; c) retrogresiva.

cundo la célula conidiógena presenta una forma de florero o botella y en su extremo distal se puede observar una estructura llamada collarite; *anelídicas*, cuando la célula conidiógena tiene forma tubular y en su extremo distal se observa la formación de una cicatriz en forma de anillo después de la producción de cada conidio, y *simpodiales*, cuando son el resultado del crecimiento continuo de la célula conidiógena después de producir cada conidio. Este proceso da lugar a una célula de forma y tamaño irregular (fig. 1.11).

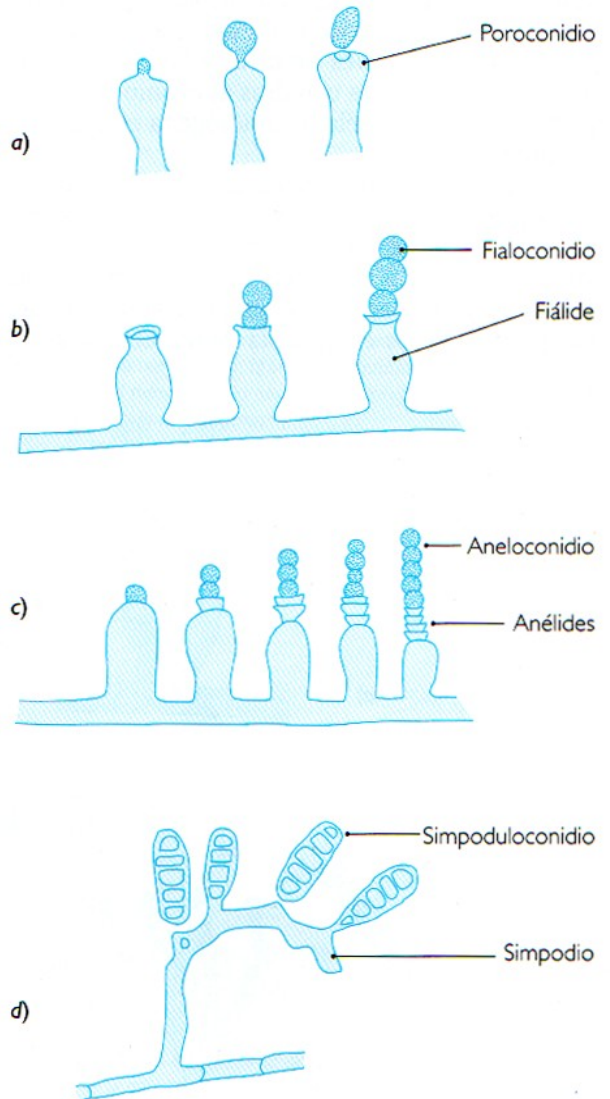


Fig. 1.11. Tipos especiales de células conidiógenas: a) porógenas; b) fialídicas; c) anelídicas; d) simpodiales.

La mayoría de los conidios se forman de manera aislada directamente de la hifa, pero también a partir de un conidióforo, que es una estructura generalmente alargada que se forma por la transformación de la hifa y en cuyo extremo se producen los conidios.

En otras ocasiones, los conidios se forman a partir de estructuras muy complejas y ornamentadas, como en el caso de *Aspergillus*, *Penicillium* o *Fonsecaea*, dando lugar a los llamados aparatos conidiales (fig. 1.12). Finalmente los conidios pueden estar contenidos en unas estructuras llamadas cuerpos fructíferos, como son los picnidios, acérulos, esporodoquios o sinemas (fig. 1.13).

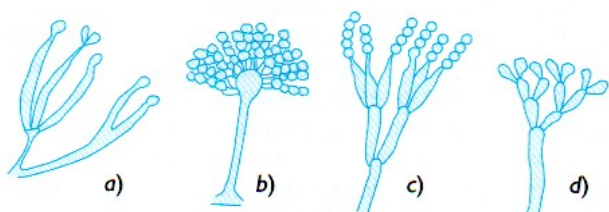


Fig. 1.12. Algunos tipos de aparatos conidiales más comunes: a) *Verticillium*; b) *Aspergillus*; c) *Penicillium*; d) *Cladosporium*.

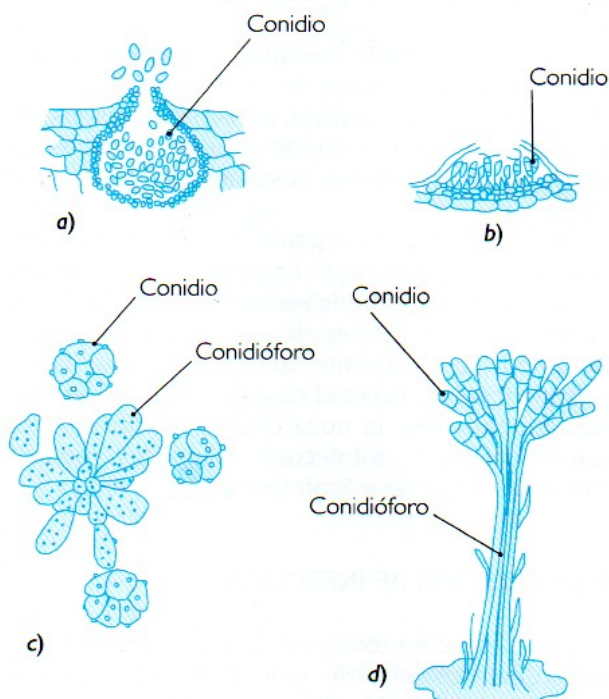


Fig. 1.13. Cuerpos fructíferos de conidios (asexuales): a) picnidio; b) acérvulo; c) esporodoquio; d) sinema.

COMPORTAMIENTO FISIOLÓGICO

Aun cuando los hongos pueden subsistir en rangos de pH muy amplios, la mayoría vive en medios ligeramente ácidos, entre 6.0 y 6.5. La temperatura más adecuada para su desarrollo es de 20 a 25 °C (mesófilos); sin embargo, algunos se conservan viables a temperaturas de congelación (psicrófilos); finalmente, aquellos que resisten hasta 55 °C se llaman termófilos. La mayor parte de los hongos necesitan oxígeno para vivir, aunque algunos se desarrollan en tensiones altas de CO₂. La humedad relativa alta también es importante para su desarrollo y fructificación; sin embargo, algunos conidios se conservan viables a la desecación.

La humedad relativa de 60 a 80 % favorece el desarrollo de la mayoría de los hongos filamentosos. Los hongos no tienen grandes exigencias nutricias, pues además de poseer enzimas constitutivas presentes en otros eucariontes que forman parte de los ciclos biológicos como el de Krebs o ciclo de las pentosas, tienen la capacidad de sintetizar gran número de enzimas inducidas, las cuales les permiten aprovechar gran cantidad de sustratos y pueden degradar la mayoría de los azúcares y almidones, así como los aminoácidos más comunes y algunos compuestos lipídicos. Las vitaminas y minerales pueden ser aprovechados por algunas especies particulares de hongos, pero son muy pocos los que tienen requerimientos estrictos de nutrición y de vitaminas.

Muchos hongos cambian su morfología y su comportamiento fisiológico cuando varían los factores nutriciales. Entre estos cambios se encuentran los fenómenos de pleomorfismo, dimorfismo, complicación morfológica y reducción morfológica parasitaria.

CLASIFICACIÓN CLÍNICA DE LA MICOSIS

Todas las micosis, en principio, requieren factores que faciliten la invasión y son oportunistas; además de los factores ambientales y los factores inherentes al agente como son patogenicidad, dimorfismo, temperatura óptima de desarrollo, etc., el estado inmunológico del paciente del hospedero también es determinante en la gravedad de la infección.

Existen muchas formas de ordenar a las micosis, debido a la facilidad de comprensión y a lo extendido de su uso. En este libro se empleará la

clasificación propuesta por la OMS, que divide a las micosis en: superficiales, subcutáneas, sistémicas y oportunistas (cuadro 1.4).

En esta clasificación predomina un criterio topográfico; sin embargo, las micosis oportunistas aquí incluidas pueden localizarse en cualquiera de las regiones corporales.

Los hongos que producen las micosis superficiales generalmente se adquieren por contacto directo y tienen capacidad únicamente para afectar algunas capas de la epidermis, pelos y anexos, pues dependen de los sustratos presentes en esos tejidos. Los más importantes por su frecuencia son los dermatofitos, que pueden ser antropofílicos, zoofílicos o geofílicos, los cuales utilizan la queratina de la piel y anexos para su desarrollo; otros, como las levaduras del género *Malassezia* que causan la pitiriasis versicolor, se alimentan de los ácidos grasos presentes en la piel.

Cuadro 1.4. Clasificación clínica de las micosis.

Superficiales	Dermatofitosis Pitiriasis versicolor Piedras Tiña negra
Subcutáneas	Esporotricosis Cromoblastomicosis Eumicetoma Basidiobolomicosis Conidiobolomicosis Lobomicosis
Sistémicas	Histoplasmosis Coccidioidomicosis Paracoccidioidomicosis Blastomicosis
Oportunistas	Candidiosis Aspergilosis Mucormicosis Criptococosis Feohifomicosis Hialohifomicosis Neumocistosis
Seudomicosis	Eritrasma Queratólisis plantar Tricomycosis Dermatofilosis Prototecosis Actinomicetoma Nocardiosis Actinomicosis

Las micosis subcutáneas son causadas generalmente por hongos saprófitos ampliamente distribuidos en la naturaleza y son frecuentes en países donde los campesinos realizan las actividades agrícolas sin protección adecuada y con escaso desarrollo tecnológico.

Afectan a la piel como puerta de entrada, extendiéndose al tejido subcutáneo, donde pueden permanecer por meses o años, pero también tienen capacidad para invadir tejidos más profundos, como el muscular y el óseo. Tienden a afectar los tejidos de las regiones corporales, donde penetran sin que se observen comúnmente diseminaciones de tipo hematógeno o linfático.

Las micosis sistémicas se adquieren vía respiratoria y se localizan principalmente de inicio en los pulmones y posteriormente tienden a diseminarse vía hematógena a diferentes sistemas, órganos y tejidos del cuerpo; éstas suelen ser las micosis más graves. Los hongos que producen las micosis sistémicas viven libres en la naturaleza, pero están restringidos a regiones geográficas específicas, por ejemplo, la coccidioidomicosis es frecuente en el sur de Estados Unidos de América (EUA) y norte de México, la histoplasmosis americana en el este de EUA, Centroamérica y Sudamérica o la blastomicosis que se presenta en el este de EUA y Canadá.

Existen otros padecimientos causados por algunas bacterias del orden de los Actinomycetales y diversos *Corynebacterium*, así como también ciertas algas aclorofílicas que se estudian en micología médica y se denominan falsas micosis oseudomicosis.

Muchos de estos organismos fueron erróneamente clasificados como hongos y, a pesar de que su ubicación taxonómica actual está bien definida dentro de los Eubacteriales, por tradición siguen ocupando un lugar entre los contenidos de la micología médica. Tal es el caso del actinomicetoma, la actinomicosis, la nocardiosis, el eritrasma, la tricomycosis y la prototecosis, esta última causada por algas del género *Prototheca*.

MECANISMOS DE INFECCIÓN

Prácticamente todos los mecanismos de infección descritos en otras enfermedades están presentes en las micosis. El contacto directo es el mecanismo de infección más común en las micosis superficiales y se establece a través del contacto

de la piel con personas y animales enfermos, o con el suelo u objetos que contienen los hongos patógenos.

La penetración de los hongos a través de heridas en la piel constituye el principal mecanismo de infección de las micosis subcutáneas, y la inhalación de los hongos lo es para las micosis sistémicas. No obstante, pueden existir otros mecanismos de infección menos comunes, como la ingestión, la implantación en cavidades o la inoculación directa, generalmente accidental, de los hongos.

Las micosis oportunistas tienen mecanismos de infección más diversos, ya que, una vez localizado el hongo oportunista en cualquier parte del cuerpo humano, es indispensable que el paciente tenga uno o varios de los factores de oportunismo que median en este grupo de micosis para que se desarrolle la enfermedad (cuadro 1.5).

Cuadro 1.5. Principales mecanismos de infección en las micosis.

I.	Contacto directo	Hombre a hombre Ej. <i>Trichophyton tonsurans</i>
	Micosis superficiales	Animales a hombre Ej. <i>Microsporum canis</i>
		Suelo a hombre Ej. <i>Microsporum gypseum</i>
II.	Penetración a través de heridas en la piel	Ej. <i>Fonsecaea pedrosoi</i> <i>Sporothrix schenckii</i>
	Micosis subcutánea	
III.	Inhalación	Ej. <i>Histoplasma capsulatum</i> <i>Coccidioides immitis</i>
	Micosis sistémica	
IV.	Penetración a través de venoclisis, inyecciones e implantaciones directas	Ej. <i>Candida</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Malassezia</i> spp
	Micosis oportunistas	
V.	Autoinfección	Ej. <i>Trichophyton rubrum</i> <i>Malassezia furfur</i> <i>Actinomyces israelii</i>
	Diversas micosis	

FRECUENCIA Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Las micosis superficiales y oportunistas son universales y de alta frecuencia; los hongos que las producen están ampliamente distribuidos en la naturaleza. En cambio, las micosis subcutáneas y sistémicas son en general menos frecuentes; tienen una distribución geográfica limitada a las regiones donde habitan en forma de vida libre los hongos causantes, los cuales viven bajo ciertas condiciones biológicas, sobre diversos sustratos, como tierra, vegetales, detritus orgánicos, guano de murciélago, etc. Estas micosis son de mayor gravedad que las micosis superficiales.

Países como México y los que forman Centroamérica constituyen lo que se llama un *ecotomo*, que se refiere al sitio de unión de dos ecosistemas, es decir, esta región geográfica une el ecosistema de América del Norte (Canadá y EUA) con el ecosistema de América del Sur. El ecotomo se caracteriza por compartir características de los ecosistemas que une; por esa razón, en México se han diagnosticado prácticamente todas las micosis; esta es una razón más para que los médicos amplíen sus conocimientos de micología médica.

EDAD, SEXO Y OCUPACIÓN

Con excepción de algunas micosis que predominan en ciertos grupos de edad, como la tiña de la cabeza y la basidiobolomicosis en los niños, o la tiña inguinal y la cromoblastomicosis en los adultos, la mayoría de las micosis tiene una distribución más o menos uniforme en todos los grupos de edad. No obstante, las micosis sistémicas y subcutáneas tienen una frecuencia mayor en el adulto, probablemente por razones ocupacionales y hormonales.

En cuanto al sexo, se observa predominio de las micosis en el sexo masculino, acentuándose más en las infecciones subcutáneas y sistémicas, donde la proporción de hombres respecto de las mujeres es aproximadamente de 4:1. En la paracoccidioidomicosis esta proporción se eleva a 10:1.

Este predominio en el hombre está dado tanto por factores ocupacionales como hormonales, ya que diversos estudios han mostrado la importancia de las hormonas sexuales humanas en patologías como la coccidioidomicosis, en la que los andrógenos producidos diariamente en el hombre

de la piel con personas y animales enfermos, o con el suelo u objetos que contienen los hongos patógenos.

La penetración de los hongos a través de heridas en la piel constituye el principal mecanismo de infección de las micosis subcutáneas, y la inhalación de los hongos lo es para las micosis sistémicas. No obstante, pueden existir otros mecanismos de infección menos comunes, como la ingestión, la implantación en cavidades o la inoculación directa, generalmente accidental, de los hongos.

Las micosis oportunistas tienen mecanismos de infección más diversos, ya que, una vez localizado el hongo oportunista en cualquier parte del cuerpo humano, es indispensable que el paciente tenga uno o varios de los factores de oportunismo que median en este grupo de micosis para que se desarrolle la enfermedad (cuadro 1.5).

Cuadro 1.5. Principales mecanismos de infección en las micosis.

I.	Contacto directo Micosis superficiales	Hombre a hombre Ej. <i>Trichophyton tonsurans</i> Animales a hombre Ej. <i>Microsporum canis</i> Suelo a hombre Ej. <i>Microsporum gypseum</i>
II.	Penetración a través de heridas en la piel Micosis subcutánea	Ej. <i>Fonsecaea pedrosoi</i> <i>Sporothrix schenckii</i>
III.	Inhalación Micosis sistémica	Ej. <i>Histoplasma capsulatum</i> <i>Coccidioides immitis</i>
IV.	Penetración a través de venoclisis, inyecciones e implantaciones directas Micosis oportunistas	Ej. <i>Candida</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Malassezia</i> spp
V.	Autoinfección Diversas micosis	Ej. <i>Trichophyton rubrum</i> <i>Malassezia furfur</i> <i>Actinomyces israelii</i>

FRECUENCIA Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Las micosis superficiales y oportunistas son universales y de alta frecuencia; los hongos que las producen están ampliamente distribuidos en la naturaleza. En cambio, las micosis subcutáneas y sistémicas son en general menos frecuentes; tienen una distribución geográfica limitada a las regiones donde habitan en forma de vida libre los hongos causantes, los cuales viven bajo ciertas condiciones biológicas, sobre diversos sustratos, como tierra, vegetales, detritus orgánicos, guano de murciélago, etc. Estas micosis son de mayor gravedad que las micosis superficiales.

Países como México y los que forman Centroamérica constituyen lo que se llama un *ecotomo*, que se refiere al sitio de unión de dos ecosistemas, es decir, esta región geográfica une el ecosistema de América del Norte (Canadá y EUA) con el ecosistema de América del Sur. El ecotomo se caracteriza por compartir características de los ecosistemas que une; por esa razón, en México se han diagnosticado prácticamente todas las micosis; esta es una razón más para que los médicos amplíen sus conocimientos de micología médica.

EDAD, SEXO Y OCUPACIÓN

Con excepción de algunas micosis que predominan en ciertos grupos de edad, como la tiña de la cabeza y la basidiobolomicosis en los niños, o la tiña inguinal y la cromoblastomicosis en los adultos, la mayoría de las micosis tiene una distribución más o menos uniforme en todos los grupos de edad. No obstante, las micosis sistémicas y subcutáneas tienen una frecuencia mayor en el adulto, probablemente por razones ocupacionales y hormonales.

En cuanto al sexo, se observa predominio de las micosis en el sexo masculino, acentuándose más en las infecciones subcutáneas y sistémicas, donde la proporción de hombres respecto de las mujeres es aproximadamente de 4:1. En la paracoccidioidomicosis esta proporción se eleva a 10:1.

Este predominio en el hombre está dado tanto por factores ocupacionales como hormonales, ya que diversos estudios han mostrado la importancia de las hormonas sexuales humanas en patologías como la coccidioidomicosis, en la que los andrógenos producidos diariamente en el hombre

estimulan el desarrollo del agente; por el contrario, los estrógenos impiden en *Paracoccidioides brasiliensis* la transformación de la forma filamentosa de vida libre a la forma levaduriforme, quedando en la fase parasitaria.

Pocas micosis predominan en la mujer; la más conocida es la tiña negra, en la que la frecuencia es mayor en la mujer en una proporción de 3:1.

Muchas de las micosis son consideradas de tipo ocupacional, como la histoplasmosis en los mineros, los micetomas y la cromoblastomicosis en los campesinos, la esporotricosis en los alfareros y floricultores y la candidosis o candidiasis ungueal e intertriginosa en las lavanderas y mondadores de frutas.

Es importante considerar que en la producción de las micosis entran en juego, además de las condiciones de edad, sexo y ocupación, los factores de patogenicidad y virulencia de los hongos, así como los factores del hospedero, como los inmunológicos, genéticos, nutricionales, pH, humedad, maceración de la piel y biota bacteriana asociada. El grado de participación de estos factores determina que haya o no infección, así como la benignidad o gravedad de la micosis.

DIAGNÓSTICO

La metodología diagnóstica en las micosis incluye los mismos criterios y procedimientos que se emplean en otras enfermedades infecciosas. Es importante señalar que en el diagnóstico de una micosis es indispensable la participación de un equipo multidisciplinario de profesionales, en el que, por su parte, el médico estudia la sintomatología atribuible a la micosis y los antecedentes epidemiológicos.

Posteriormente la comprobación diagnóstica se efectúa en el laboratorio de micología médica, en donde se procede a realizar los exámenes directos, frotis, aislamiento e identificación de los hongos causales. Otros importantes auxiliares en el diagnóstico de las micosis son los procedimientos histopatológicos, inmunológicos y diversos estudios de gabinete (cuadro 1.6) y recientemente los procedimientos de biología y genética molecular, como PCR, hibridaciones de ADN, etcétera.

CONCEPTOS FUNDAMENTALES DE LA MICOLOGÍA MÉDICA

Existen ciertos criterios y conceptos cuyo conocimiento es de gran utilidad para el mejor manejo y comprensión del comportamiento biológico de los hongos patógenos, en función de las relaciones hospedero-parásito. Algunos de éstos se prestan a controversias; sin embargo, son de uso cotidiano en la micología médica:

Pluralidad etiológica. Este concepto se refiere a un cuadro clínico que puede ser originado por varios agentes etiológicos, por ejemplo: el micetoma, las tiñas y la cromoblastomicosis.

Polimorfismo lesional. Es la formación de varios cuadros clínicos originados por un solo agente etiológico, por ejemplo: *Nocardia asteroides* (micetoma y nocardiosis), *Aspergillus flavus* (aspergilosis, alergias y micotoxicosis) y *Alternaria alternata* (feohifomicosis, alternariosis e hipersensibilidad).

Complicación morfológica. Se da cuando una misma especie de hongo se siembra en medios de cultivo y condiciones ambientales diferentes (temperatura, concentración de CO₂, pH, etc.), pudiendo desarrollar estructuras morfológicas diferentes. Por ejemplo: *Pyrenochaeta romeroi* cultivado en extracto de malta, y en la oscuridad produce peritecios y, cultivado en medio de agar dextrosa Sabouraud y a la luz sólo produce micelio.

Monomorfismo. Este término se utiliza para referirse a un hongo que no cambia su morfología cuando se encuentra ya sea en vida libre, como comensal o como parásito. Por ejemplo: *Cryptococcus neoformans*, que se presenta en forma de levadura con cápsula en todas las condiciones referidas.

Reducción morfológica parasitaria. Los hongos pierden sus características morfológicas; generalmente pierden los conidios y conservan las hifas cuando pasan de su forma de vida libre en la naturaleza a parásito. Por ejemplo: los dermatofitos, *Aspergillus* spp o agentes de mucormicosis.

Dimorfismo. Es un proceso a través del cual los hongos cambian completamente su forma cuando pasan de vida libre a parásitos en el hospedero, en donde adquieren una morfología totalmente diferente. Por ejemplo: *Paracoccidioides brasiliensis*, que de ser hongo filamentosos en vida libre se convierte en levadura como parásito, o *Coccidioides immitis*, que como parásito se reproduce por la

formación de esférulas con endosporas, en tanto que en vida libre es un hongo filamentosos.

Oportunismo. Es un concepto convencional que se refiere a la capacidad que tienen algunos

hongos, habitualmente no patógenos, de producir infección en pacientes con inmunosupresión. Por ejemplo: *Rhodotorula*, *Aspergillus* y *Rhizopus*.

Cuadro 1.6. Procedimientos de diagnóstico en las micosis.

I. Epidemiológicos		Edad Sexo Ocupación Lugar de procedencia Otros casos similares Mecanismo de infección
II. Clínicos		Aspecto de las lesiones Tiempo de evolución Órganos afectados Signos y síntomas Factores de oportunismo
III. De laboratorio	Observación y aislamiento	Toma de muestra Examen microscópico directo Frotis Cultivo Inoculación en animales
	Identificación	Requerimientos nutricionales Asimilaciones Fermentación Hidrólisis Reducción de sales Termotolerancia
	Inmunológicos	Inmunofluorescencia Precipitación en tubo capilar Inmunodifusión Contrainmuno-electroforesis Aglutinación de látex Reacción de fijación de complemento Western blot ELISA Intradermorreacciones
	Técnicas moleculares	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) Transcripción reversa-PCR (RT-PCR) PCR anidada PCR en tiempo real
IV. Histológicos		Biopsia y tinciones para tejidos y tinciones especiales
V. De gabinete		Radiografías Tomografía axial computada Resonancia magnética Ecograma Luz de Wood

BIBLIOGRAFÍA

- Bonifaz, A., "Aspectos epidemiológicos de las micosis más frecuentes en México", *Medicine*, **19**:2380, 1988.
- Campbell, C. K., "Conidiogenesis of fungi pathogenic for man", *CRC Critical Reviews in Microbiology*, **12**:321, 1986.
- Cole, G. T., "Conidium and sporangiospore formation in pathogenic microfungi", *Fungi Pathogenic for Humans and Animals*, Marcel Dekker, Nueva York, 1983.
- Drouhet, E. Y. y Dupont, B., "Micosis in AIDS patients. An overview", Proceedings of 3th. Symposium Topics in Mycology. *Mycoses in AIDS Patients*, Institut Pasteur, Janssen Research Council, ISHAM, Francia, págs. 36 a 38, 1989.
- Eriksson, O. E., "*Pneumocystis carinii*, a parasite in lung of mammals referred to a new family and order (Pneumocystidaceae Pneumocystidiales, Ascomycota)", *Sist. Ascom.*, **13**:165, 1994.
- Hawksworth, D. L., "The fungal dimension of biodiversity: Magnitude significance and conservation", *Mycol. Res.*, **95**:295, 1991.
- Howard, D., "Nutrition physiology and metabolism of zoopathogenic fungi", *Fungi Pathogenic for Humans and Animals*, Marcel Dekker, Nueva York, págs. 3 a 56, 1985.
- Kendrick, B., "Kingdom, classification and biodiversity" (cap. 1), *The Fifth Kingdom*, on line <http://www.mycology.com>, 2002.
- López-Martínez, R. y Méndez-Tovar, L. J., "Técnicas de diagnóstico en micología cutánea", *Dermatología Rev. Mex.*, **43**:546, 1999.
- Méndez Tovar, L. J., "Estructura y fisiología de los hongos patógenos", en Méndez-Tovar, L. J., López-Martínez, R. y Hernández-Hernández, F. (dirs.), *Actualidades en micología médica*, Facultad de Medicina, UNAM, México, 2010, págs. 9-16.
- Mitchell, T. G., "Kingdom fungi: Fungal phylogeny and systematic", *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, Medical Mycology, Arnold, 2005.
- Suttons, B. C., "Mitosporic fungi (deuteromycetes)", en Reynolds, D. R. y Taylor, J. W. (dirs.), *The dictionary of the fungi. The fungal holomorph mitotic, meiotic and pleomorphic*, *Fungal Syst.*, CAB International, Wallingford.
- Szániszlaó, P. J., Jacobs, C. W. y Geis, P.A., "Fungi pathogenic for humans and animals", *Dimorphism. Morphological and Biochemical Aspects*, Marcel Dekker, Nueva York, pág. 328, 1998.

Toma de especímenes

En este capítulo se dan las pautas más sobresalientes de los procedimientos de la toma, transporte y conservación de especímenes biológicos para el diagnóstico de las micosis humanas. El diagnóstico de una micosis se hace, fundamentalmente, por la demostración del parásito en las muestras biológicas y su posterior identificación taxonómica mediante el estudio de sus características diferenciales. En consecuencia, el diagnóstico de una micosis depende, en gran parte, de la toma correcta del espécimen o muestra patológica, por lo que hay que poner especial atención en su obtención.

Por toma de espécimen debe entenderse una metodología llevada a cabo bajo los criterios siguientes:

PRINCIPIOS CIENTÍFICOS BÁSICOS DERIVADOS DEL CONOCIMIENTO TEÓRICO

Selección apropiada de muestras clínicas. En el cuadro 2.1 se presentan las infecciones micóticas más comunes y los especímenes de los cuales se recuperan los agentes etiológicos, así como las estructuras fúngicas que suelen observarse en el estudio microscópico de las muestras patológicas.

Rechazo de los especímenes inadecuados. Cada laboratorio debe elaborar una lista de los diferentes criterios por los cuales las muestras pueden ser rechazadas, por ejemplo:

- La saliva no debe ser considerada como esputo.
- Las escamas de piel o los pelos no deberán ser colectados al azar o casualmente.
- La sangre periférica o aspirado de médula ósea sin anticoagulante.
- Las muestras congeladas o almacenadas en hielo seco por más de un día.

Datos clínicos orientadores de las micosis. El conocimiento de algunas características clínicas específicas de las micosis es de gran ayuda para decidir el tipo de muestra y el sitio de donde se obtienen, por ejemplo:

- Lesiones cutáneas circinadas.
- Lesiones cutáneas descamativas, pruriginosas y eritematosas.
- Zonas pseudoalopécicas.
- Aspecto y crecimiento anormal del pelo.
- Cuadros respiratorios.
- Trastornos del sistema nervioso central o tumores fistulizados.

Cantidad de muestra. En micología, la presencia del hongo se detectará más fácilmente cuando la muestra se obtenga en cantidad abundante.

Tiempo. El transporte rápido de los especímenes clínicos hacia el laboratorio es importante para la recuperación de los agentes etiológicos de las infecciones micóticas, sobre todo porque, generalmente, en la muestra existe una mezcla de

Cuadro 2.1. Productos biológicos utilizados en el diagnóstico micológico.

	Pelos	Escamas de piel	Escamas de uñas	Lavado bronquioalveolar	Exudados diversos	Materia fecal	Orina	Médula ósea	Líquido cefalorraquídeo	Tejidos	Sangre	Estructuras parasitarias
Dermatofitosis	*	*	*									Filamentos y artroconidios
Pitiriasis versicolor		*										Levaduras y filamentos cortos no ramificados
Dermatitis seborreica		*										Levaduras unigemantes
Tiña negra		*										Filamentos pigmentados
Piedra negra	*											Hifas pigmentadas y ascas con ascosporas
Piedra blanca	*											Artroconidios que forman masas
Eritrasma		*			*							Bacilos filamentosos
Tricomycosis axilar	*											Bacilos filamentosos
Prototecosis		*										Estructuras redondas con células en su interior
Micetoma					*					*		Granos
Esporotricosis				*	*					*		Levaduras alargadas y "cuerpos asteroides"
Cromoblastomycosis		*								*		Células fumagoides
Lacaziosis		*			*					*		Levaduras unigemantes en cadena
Conidiobolomycosis					*					*		Hifas gruesas, no septadas, hialinas
Basidiobolomycosis										*		Hifas gruesas, no septadas, hialinas
Hialohifomycosis				*	*					*		Hifas hialinas septadas
Feohifomycosis				*	*					*		Hifas pigmentadas, septadas
Nocardiosis				*	*					*		Bacilos que forman seudofilamentos
Actinomycosis				*	*					*		Bacilos agrupados en "granos"
Histoplasmosis				*	*			*		*	*	Levaduras intracelulares
Coccidioidomycosis				*	*				*	*	*	Esférulas con endosporas
Paracoccidioidomycosis				*	*					*	*	Levaduras multigemantes
Blastomycosis				*	*					*		Levaduras unigemantes
Candidosis		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	Levaduras ovales en gemación o formando filamentos
Aspergilosis				*	*					*		Filamentos septados dicotomizados
Mucormycosis					*					*		Hifas gruesas, hialinas, sin septos
Criptococosis				*	*		*		*	*	*	Levaduras capsuladas
Neumocistosis				*	*					*		Formas tróficas y quísticas

bacterias y de otros hongos que interfieren en la sobrevivencia del hongo patógeno. El camino que hay que seguir es disminuir la posibilidad de no recuperar el hongo por retardo en el transporte del espécimen; además, el proceso de la muestra deberá hacerse lo más pronto posible.

Transporte y almacenamiento. A partir de los exudados, con base en la toma directa del espécimen, debe practicarse un frotis sobre un portaobjetos limpio y desengrasado y, si es posible, proceder a la siembra inmediata en los medios de cultivo de agar dextrosa Sabouraud. Si lo anterior no es posible, las muestras deben ser transportadas en recipientes estériles que provean un ambiente húmedo. Si es necesario, puede agregarse solución salina isotónica estéril (SSIE) y, en el caso de exudados y secreciones en los que existan bacterias en grandes cantidades, se deben agregar a la SSIE penicilina (500 UI/ml), estreptomycin (500 µg/ml) o cloramfenicol (500 µg/ml). Si se sospecha que la lesión es causada por actinomicetales, no es conveniente el uso de antibióticos, ya que éstos inhiben el crecimiento de esos organismos. En el caso de que se sospeche de organismos anaerobios, la muestra debe ser puesta en medios de transporte anaeróbicos, como el medio de tioglicolato.

Cuando no se puedan procesar inmediatamente las muestras patológicas, se almacenarán en las condiciones siguientes:

1. Los pelos, las escamas de piel y las uñas pueden permanecer almacenados a temperatura ambiente en cajas de Petri o entre dos portaobjetos durante varias semanas sin peligro de deterioro; sin embargo, *Malassezia* spp pierde viabilidad con el almacenamiento, por lo que en caso de requerirse aislamiento del agente, la siembra en medios adecuados debe ser inmediata.

2. El esputo, el líquido de broncoaspiración, los cepillados bronquiales, la orina, la sangre, la materia fecal y los exudados diversos deben permanecer a 4 °C por no más de 24 horas.

3. El líquido cefalorraquídeo, la médula ósea y los fluidos torácicos y abdominales se mantienen a temperatura ambiente o, de preferencia, en incubación a 30 °C por no más de 24 horas.

A pesar de estas medidas, debe tomarse en cuenta que pueden presentarse márgenes de error, por lo que se recomienda procesar las muestras inmediatamente después de la toma.

Indicaciones para el paciente. Una de las más importantes, en el caso de las micosis superficiales, es evitar que el paciente se aplique tópicamente algún medicamento, por lo menos tres días antes de la toma del espécimen. Por otro lado, se hacen indicaciones específicas para cada caso, por ejemplo: se debe recomendar al paciente que se lave la boca antes de una toma transbronquial, mientras que para la ejecución de un estudio de exudado faríngeo no debe hacerlo.

TÉCNICAS DE TOMA DE MUESTRAS

Escamas. Se limpia la lesión ligeramente con alcohol, se toman escamas de la periferia con ayuda de un bisturí de hoja fija y con el filo mellado o el borde de un portaobjetos. Las escamas se colectan en una caja de Petri o en un portaobjetos, colocándolas debajo del área afectada. En el caso de que se recolecten en un portaobjetos, sobre éste se coloca otro y ambos se envuelven en una hoja de papel, en la cual se anotan los datos del paciente.

Cuando las lesiones no son muy descamativas, se procede a frotar la lesión vigorosamente con la parte afelpada de un cuadro de alfombra estéril de 5 × 5 cm (*moqueta*), la cual debe estar envuelta en un papel en el que se guardará la alfombra después de tomada la muestra.

Las muestras de lesiones cutáneas exudativas se toman con un hisopo humedecido en SSIE. Si no se procesa inmediatamente la muestra, el hisopo se coloca en el tubo de ensayo para transportarse rápidamente al laboratorio.

El procedimiento de la cinta adhesiva transparente se puede emplear en el caso de que se sospeche de pitiriasis versicolor o dermatitis seborreica asociada a *Malassezia* spp. Éste consiste en presionar el lado engomado de la cinta sobre la lesión y pegarlo posteriormente sobre un portaobjetos para su observación.

Pelos. Es necesario tomar los pelos enfermos utilizando una pinza para depilar, debido a que éstos están rotos y dañados inmediatamente después de la emergencia del folículo piloso, que es en donde se establece la infección. Los pelos deben desprenderse desde la raíz y colocarse en una caja de Petri o entre dos portaobjetos. Para estos casos, también se puede utilizar un cepillo de dientes esterilizado, el cual, después de frotarlo sobre la lesión, se siembra directamente sobre cajas de Petri con medio de cultivo o se sacude

vigorosamente sobre una caja de Petri vacía para obtener escamas y pelos.

Uñas. La uña enferma debe ser raspada, ayudándose con una hoja de bisturí sin filo, y las escamas útiles deben colectarse por el lado del lecho ungueal, o sea, por la superficie que está en contacto directo con el dedo. Cuando existe ataque periungueal, se colocan las escamas de los surcos periungueales. Si las lesiones son supurativas, se extrae el pus por presión y se colecta con pipeta Pasteur o con hisopo. Si resulta difícil raspar la uña, se procede a cortarla para posteriormente rasparla. Los especímenes deben colectarse en caja de Petri o entre dos portaobjetos.

Exudado de mucosas (cavidad bucal, vaginal, faríngea, conjuntival y nasal). Se requiere una exploración de la región afectada y la toma de espécimen debe hacerse con un hisopo, frotando repetidamente las lesiones eritematosas, ulcerosas o donde existan placas blanquecinas. En estos casos, la realización del frotis y la siembra inmediata son de mucha importancia. Para el transporte de los exudados se recomienda el uso de SSIE con antibióticos.

Exudado ótico. Con ayuda del otoscopio se inspecciona el conducto auditivo externo para localizar las lesiones o las colonias de los hongos. A través del otoscopio se introduce un hisopo fino dirigido directamente al sitio afectado y se hace un ligero raspado para obtener la muestra. El envío de este espécimen comparte las mismas condiciones que los de exudados de mucosas.

Especímenes del tracto respiratorio. Básicamente son: el esputo y la muestra bronquial que se obtiene por aspiración transtraqueal.

Esputo. Antes de recolectarlo se hace limpieza bucal con algún desinfectante local; no conviene hacer gargarismos. El esputo se colecta en un recipiente de boca ancha estéril y debe permanecer el menor tiempo posible a temperatura ambiente. El esputo tiene que ser el primero de la mañana, obtenido durante un acceso de tos profunda. Si el paciente no puede expectorar, se introducirá SSIE en el árbol bronquial con el uso de un equipo de aspiración intermitente, lo cual generalmente produce espasmos y tos, o también se puede inducir la expectoración por medio de nebulizaciones. Una muestra de 5 a 10 ml será suficiente, debiendo colectarse tres muestras seriadas.

Muestra bronquial y aspiración transtraqueal. Estas técnicas son realizadas por el médico y se

recomienda en pacientes que están débiles o no pueden expectorar y en quienes se sospeche de micosis pulmonar. La biopsia por broncoscopia está particularmente indicada cuando se encuentran lesiones localizadas periféricamente en uno o más lóbulos de los pulmones.

Orina. La muestra se colecta, cuando es posible, a través de punción suprapúbica hecha por el urólogo. En caso de que esto no sea posible se hará por la técnica del chorro medio, previa asepsia y antisepsia de la región genital; la orina debe ser la primera de la mañana, colectada en frascos de vidrio de boca ancha y estériles. No deben tomarse las muestras de orina en bolsas o recipientes no estériles.

Pus. Debe ser recolectado, previa antisepsia de la región afectada, puncionando el absceso para evitar contaminaciones bacterianas. En el caso de que drene espontáneamente por fístulas, se hace antisepsia de la región y se procede a tomar la secreción con ayuda de una pipeta Pasteur estéril.

Líquido cefalorraquídeo. Lo obtiene el médico utilizando la técnica de punción lumbar. Conviene que, al tomar la muestra, ésta se divida en tres tubos estériles: el primero, para el análisis citoquímico; el segundo, para el cultivo bacteriológico y el tercero, para el examen micológico. Es preferible obtener de 3 a 5 ml de líquido cefalorraquídeo para su estudio.

Médula ósea. Se puede tomar por punción con una aguja adecuada, usualmente a partir de la cresta iliaca y en todos los casos debe ser obtenida por un médico experto. El material de la punción será depositado en gasas estériles humedecidas en SSIE y puestas en recipientes bien cerrados para evitar la contaminación y la desecación.

Biopsias diversas. Las piezas de biopsia o de necropsia deben ser divididas en dos fragmentos: uno se fija para estudio histopatológico y el otro se coloca en un frasco estéril con SSIE para su posterior proceso en exámenes en fresco, improntas, frotis y cultivo micológico.

Sangre. La muestra debe ser tomada con jeringa estéril y depositada en tubos que contengan anticoagulante (EDTA), en la proporción que se utiliza para la biometría hemática. Se deben obtener, por lo menos, 3 ml de sangre para su estudio.

Suero. Para su obtención se requieren 10 ml de sangre total, la cual se deposita en tubos de ensayo sin anticoagulante. Una vez separado el suero, se debe conservar en congelación a 0 °C, o prefe-

rentemente a -70°C . Otras temperaturas de congelación obligarán a usar el suero en un tiempo más corto, ya que los niveles de antígenos o anticuerpos pueden alterarse. Es conveniente agregar a la muestra de suero dos gotas de timerosal por ml, a una concentración de 1: 2000.

EQUIPO Y MATERIAL

Para que una toma de espécimen sea eficaz, deberá disponerse del siguiente material mínimo:

- Tubo de ensayo de 15×150 mm, estéril y seco con tapón de algodón.
- Tubo de ensayo de 15×150 mm, estéril con SSIE.
- Tubo de ensayo de 15×150 mm, estéril con SSIE más antibióticos.
- Frascos de boca ancha estériles.
- Pipetas Pasteur estériles con bulbos de goma.
- Portaobjetos y cubreobjetos limpios y desengrasados.
- Cajas de Petri estériles.
- Hisopos y cuadros de alfombra estériles.
- Jeringas de 10 y 20 ml.
- Estuche de diagnóstico clínico.
- Estuche de disección.
- Hojas de bisturí con el filo mellado.
- Espejo vaginal.

- Anticoagulante.
- Etanol en diferentes concentraciones.
- Torundas.
- Refrigerador.
- Mecheros.
- Medios de cultivo de agar dextrosa Sabouraud con y sin antibióticos y medio de tioglicolato.
- Mesa de exploración.

La toma debe hacerse en un lugar bien iluminado.

Envío

Los especímenes biológicos deben empacarse con cuidado para evitar la ruptura de los frascos o tubos de vidrio y la diseminación del material patológico. El paquete debe contener una ficha con los siguientes datos: nombre del paciente, tipo de espécimen, fecha de la toma, un resumen de los informes epidemiológicos, clínicos y de laboratorio del caso por estudiar. En el remitente se anotan los datos del médico tratante o del laboratorio que envía las muestras. Con excepción de las muestras de pelos, escamas y uñas, todos los demás especímenes biológicos se deberán recibir en el laboratorio de micología para su procesamiento en un término no mayor de 24 horas.

BIBLIOGRAFÍA

- Fegeler, W., Kappe, R., Müller, J. y cols., "Démarche Diagnostique", *Cas de Suspicion D'endomycoses*, La Roche & Cie., Bale, Suiza, 1986.
- Konemann, R. y Roberts, D. G., *Practical Laboratory Mycology*, Williams and Wilkins, Baltimore, 1985.
- López-Martínez, R. y Méndez-Tovar, L. J., "Técnicas de diagnóstico en micología cutánea", *Dermatología, Rev. Méx.*, 43:540, 1999.
- Mariat, F. y Adan-Campos, C., "La Technique du Carré de Tapis, Méthode simple de Prélèvement dans les mycoses Superficielles", *Ann. L Institut Pasteur*, 113:666, 1967.
- Pfaller, M. A. y McGinnis, M. R., "The laboratory and clinical mycology", en Anaissie, E. J., McGinnis, M. R. y Pfaller, M. A., *Clinical Mycology* (2a. ed.), Churchill-Livingstone, China, 2009.
- Segretain, G., Drouhet, E. y Mariat, F., "Diagnostic de Laboratoire", *Mycologie Medicale* (5a. ed.), Maloine, París, 1987.

Micosis superficiales

DERMATOFITOSIS

DESCRIPCIÓN

Las dermatofitosis son infecciones causadas por un grupo de hongos filamentosos queratinofílicos llamados *dermatofitos*, los cuales tienen tendencia a invadir la piel y sus anexos (pelos, pestañas, cejas y uñas). Son las micosis más frecuentes y constituyen aproximadamente de 20 a 25 % de los diagnósticos de la consulta dermatológica. A estas infecciones también se les conoce como tiñas; la palabra *tinea* en latín significa apolillado y, de acuerdo con las primeras descripciones, es el aspecto que tienen los pelos afectados por los dermatofitos. Por extensión, se llamó tiña a todas las infecciones por dermatofitos, aunque no afectaran la piel cabelluda.

El mecanismo de infección es por contacto directo con el agente infeccioso, aunque se requieren ciertas condiciones que favorezcan su desarrollo, como el contacto estrecho durante varias horas, la humedad, el calor y la maceración local. En la piel lampiña de personas con inmunidad aparentemente normal se caracteriza clínicamente por la tríada de eritema, descamación y prurito.

Las dermatofitosis se clasifican de acuerdo con su topografía, en:

Dermatofitosis de la cabeza (tiña de la cabeza). Afecta a la piel cabelluda y a los pelos. La

infección puede localizarse en la capa externa del pelo (ectotrix), en la capa interna (endotrix) o en ambas (endoectotrix). Clínicamente se caracteriza por placas pseudoalopécicas, únicas o múltiples, o bien, por la presencia de pelos blanquecinos cortados a escasos milímetros de su salida.

La descripción anterior comprende las dos variedades principales de tiña capitis: la descamativa, que puede ser poco inflamatoria y que incluye las tiñas tonsurante y microspórica (endotrix y ectotrix respectivamente); la de tipo inflamatorio, menos frecuente que la no inflamatoria, se caracteriza por lesiones eritematosas y descamativas, y áreas de alopecia severamente inflamadas con ulceraciones profundas, constituyendo el querión de Celso o tiña supurativa.

En México es causada principalmente *Microsporum canis*, que es el agente etiológico más frecuente; otro agente importante es *T. mentagrophytes* var. *granulosum*, cuyos antígenos inducen de manera habitual una respuesta inflamatoria intensa.

En esta forma clínica hay inflamación del folículo piloso, adenopatías regionales y dolor intenso. Normalmente tiende hacia la curación espontánea en dos a tres meses, pero deja lesiones fibróticas y alopécicas permanentes en el área afectada. Otra variedad menos frecuente es la tiña fávica producida por *T. schoenleinii*, caracterizada por la presencia de masas densas de micelio y desechos epiteliales que forman costras cupuliformes amarillentas. Estas costras, al desprenderse, dejan una

base eritematosa y exudativa, que con el paso de los años da lugar a áreas alopecicas y cicatrizales.

Dermatofitosis del cuerpo. Generalmente presenta lesiones pruriginosas descamativas, en forma circular, de bordes inflamatorios, y algunas veces se aprecian pápulas o vesículas. Al extenderse la lesión, la piel del centro adopta un aspecto normal. Una variedad importante es el *granuloma tricoftico*, causado por la invasión de los dermatofitos al folículo piloso y al tejido subcutáneo, formando pequeños granulomas perifoliculares con numerosos nódulos y abscesos subcutáneos.

En personas con inmunosupresión se observan lesiones descamativas extensas, con bordes no bien definidos y escama gruesa del tipo de la observada en la psoriasis o fina, como la de la pitiriasis versicolor.

Dermatofitosis de los pies. Es favorecida por el uso de calzado cerrado y de tenis durante muchas horas cada día. Puede presentarse en tres variedades: intertriginosa, vesiculosa e hiperqueratósica. La vesiculosa afecta principalmente la zona del arco del pie, donde los pacientes desarrollan vesículas muy pruriginosas. La variedad intertriginosa se caracteriza por maceración, descamación, prurito, eritema y fisuras. Generalmente afecta la piel situada entre el cuarto y quinto dedos de los pies.

La forma hiperqueratósica (en mocasín) afecta el área cubierta por el calzado; en esta variedad, el paciente presenta una descamación fina que se acumula en los pliegues normales del pie haciéndolos más aparentes y la piel tiene un aspecto brillante y seco; esta variedad clínica generalmente es asintomática. A partir de cualquiera de las tres variedades puede haber infección bacteriana agregada que ocasiona dolor e incapacidad física; a este cuadro dermatofítico infectado con bacterias se le conoce como complejo de tiña de los pies.

Dermatofitosis de las uñas. Se clasifica en: a) onicomycosis subungueal distal y/o lateral; b) onicomycosis blanca superficial; c) onicomycosis proximal blanca subungueal, y d) onicomycosis distrófica total. La más frecuente es la primera y afecta generalmente la uña del primer dedo de los pies. En ésta, las manifestaciones clínicas son: discromías, engrosamiento, onicólisis y, finalmente, destrucción del anexo. Es una patología frecuente, favorecida en gran medida por el uso de calzado cerrado, que ocasiona aumento de temperatura y humedad por largos periodos; también es impor-

tante el antecedente de dermatofitosis de los pies, ya que las escamas que se desprenden de la piel, pueden quedar atrapadas en el tejido periungueal y éstas, al estar en contacto durante varias horas con la uña, pueden invadirla.

Dermatofitosis inguinal. Es más frecuente en el hombre y se asocia con actividades que impliquen varias horas de estar sentado, por ejemplo, los choferes. Generalmente tiene el antecedente de una dermatofitosis en otra región corporal. Las lesiones se localizan en la ingle, perineo y región perianal. A menudo se trata de lesiones bilaterales, bien delimitadas, con borde elevado, eritematoso y fino, con descamación epidérmica; la mayoría de los pacientes refiere prurito intenso.

Tiña imbricata. Se conoce también como tiña concéntrica o Tokelau. Esta dermatofitosis presenta descamación en anillos concéntricos o arabescos, es pruriginosa y con tendencia a diseminarse. Aunque en México se presenta principalmente en los estados de Puebla y Oaxaca y su frecuencia es baja, debido a los movimientos migratorios intensos, también se debe tener en cuenta ante los casos de lesiones descamativas y pruriginosas.

Granuloma dermatofítico. En algunos pacientes, espontáneamente, las lesiones de dermatofitosis del cuerpo pueden originar invasiones profundas y formación de nódulos firmes, únicos o múltiples, poco dolorosos con tendencia a la cronicidad. Histológicamente presentan la estructura de lesiones granulomatosas. Estas lesiones fueron denominadas como granuloma de Majocchi y los primeros casos fueron causados únicamente por algunas especies de *Trichophyton*, como *T. violaceum*, *T. soudanense* y *T. rubrum*; actualmente se han descrito granulomas dermatofíticos causados por otros géneros de dermatofitos. Algunos pacientes cursan con inmunosupresiones de diversos grados; otros, con inmunidad aparentemente normal.

AGENTES ETIOLÓGICOS

Se han descrito aproximadamente 40 especies de dermatofitos distribuidos en tres géneros: *Microsporum*, *Epidermophyton* y *Trichophyton*. De acuerdo con el hábitat de preferencia para su desarrollo, se clasifican en tres grupos: geofílicos, zoofílicos y antropofílicos. La mayoría de las especies geofílicas y algunas especies zoofílicas desarrollan estructuras sexuales ascosporadas, clasificándose

taxonómicamente en los Ascomycota y dentro del género *Arthroderma*.

Aunque la mayoría de los dermatofitos tienen una distribución mundial amplia, algunos están limitados geográficamente. En Latinoamérica predominan *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *T. tonsu-*

rans, *Microsporum canis*, *M. gypseum* y *Epidermophyton floccosum*.

En la figura 3.1 se muestran las principales características microscópicas de los géneros y especies de dermatofitos más comunes en nuestro medio.

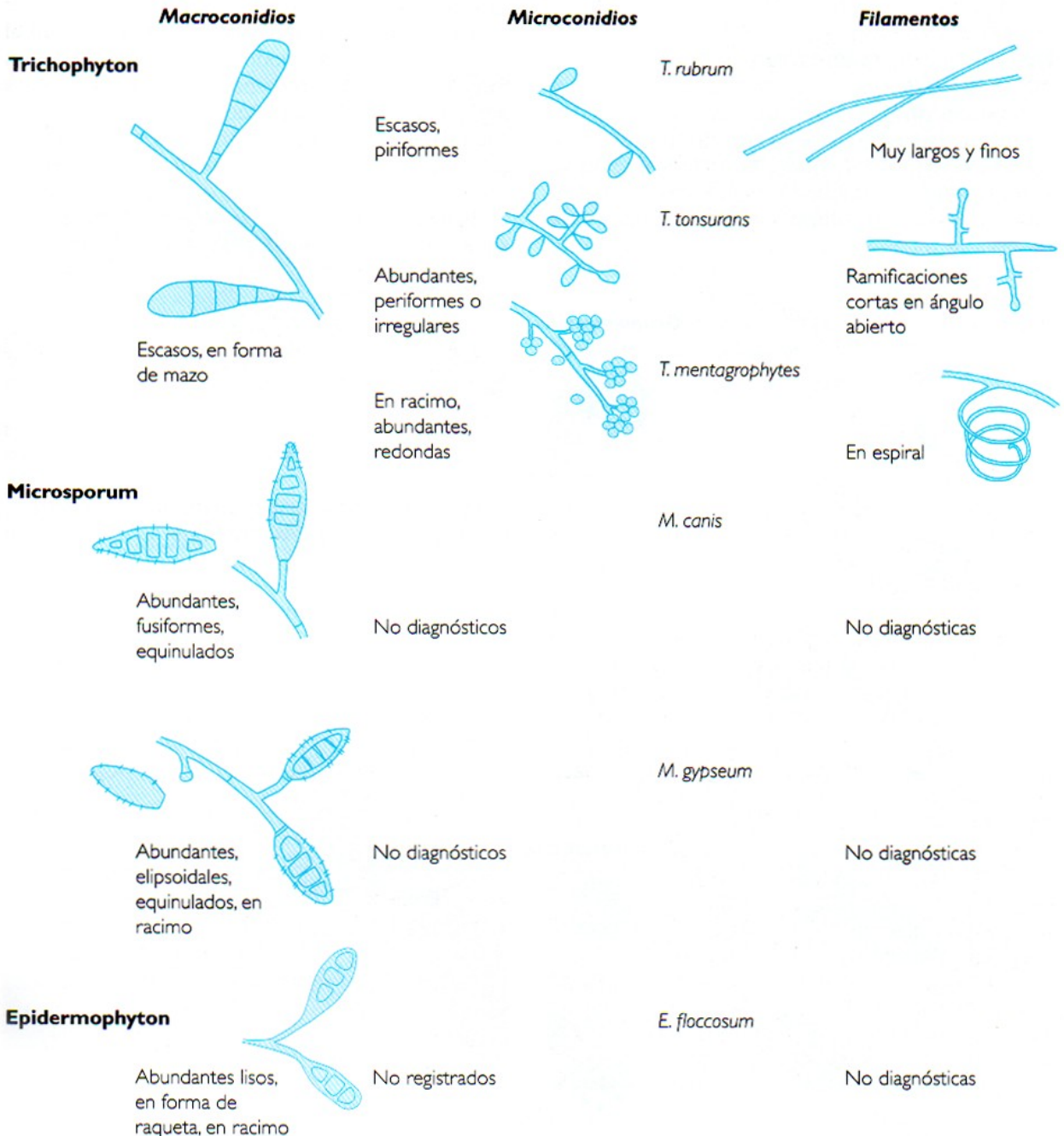


Fig. 3.1. Características microscópicas de los seis dermatofitos más comunes en nuestro medio.

ESPECÍMENES BIOLÓGICOS

- Pelos.
- Uñas.
- Escamas.
- Exudados.
- Material de biopsia.

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Examen directo. Los pelos, las uñas y las escamas se procesan en solución de hidróxido de potasio (KOH) al 15 o 20 %. En la preparación ya montada entre portaobjeto y cubreobjeto se deja que actúe la potasa durante 5 o 10 minutos y se observa al microscopio con el objetivo de 10X y

40X. Si se desea conservar durante periodos largos los especímenes infectados, en lugar del KOH sólo, éstos se pueden aclarar utilizando una solución de KOH al 60 % y dimetilsulfóxido (DMSO) al 40 %; con esta solución se prepara la solución final con 20 % de glicerina; el DMSO evita que se destruyan las escamas y la glicerina retarda la desecación de las preparaciones.

También se puede emplear como colorante el lactofenol azul de algodón. Si se dispone de un microscopio de fluorescencia, a las escamas se les agrega blanco de calcoflúor y se observan bajo fluorescencia. Existen dos tipos de examen directo: el de pelos y el efectuado en uñas y escamas de piel.

Pelos. En la figura 3.2 se observan los distintos tipos de parasitación del pelo.

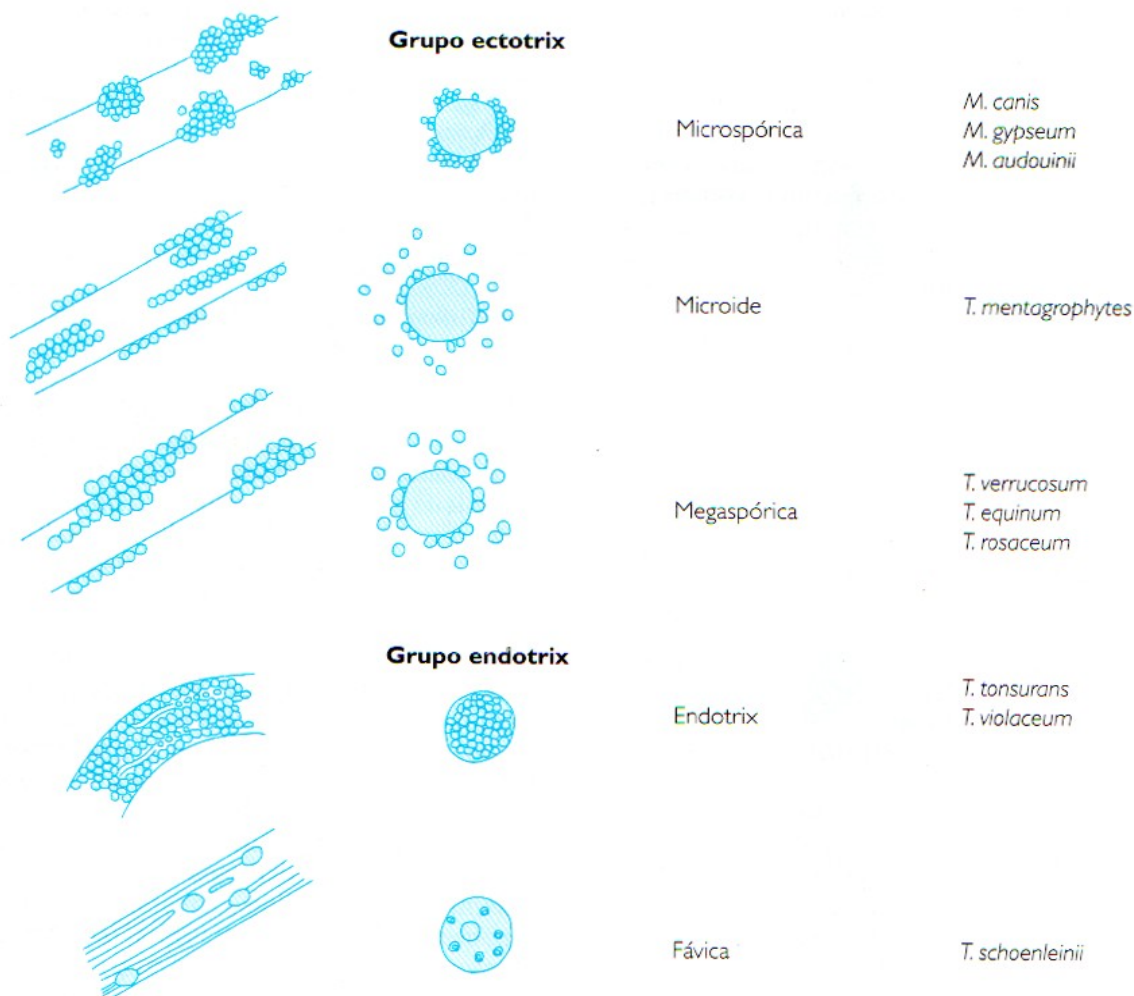


Fig. 3.2. Tipos de parasitación de los dermatofitos en el pelo.

Infección ectotrix. Se observan conidios en la superficie del pelo; existen dos tipos de infección:

Microspórica. Se observan pequeños conidios ($2\ \mu\text{m}$ de diámetro), en masa, a escasos milímetros de la emergencia del pelo, formando vainas.

Microide. Se observan cadenas de pequeños conidios (de 2 a $4\ \mu\text{m}$ de diámetro) en la superficie del pelo (fig. 3.3).

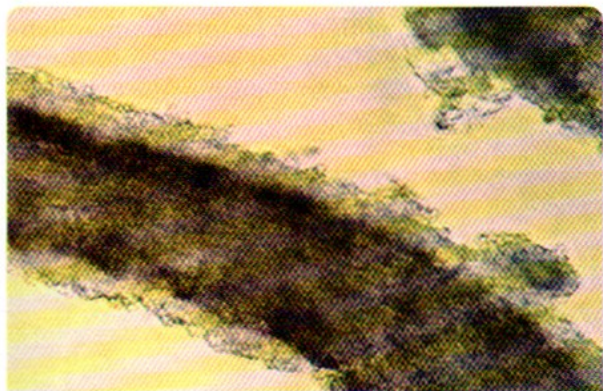


Fig. 3.3. Parasitación ectotrix del pelo. Se observa gran cantidad de microconidios en el exterior del pelo formando una vaina (16X).

Infección endotrix. Se observan conidios y/o filamentos en el interior del pelo ($4\ \mu\text{m}$ de diámetro).

Megaspórica. Se observan cadenas de grandes conidios (de 4 a $5\ \mu\text{m}$ de diámetro) en el exterior del pelo (fig. 3.4).

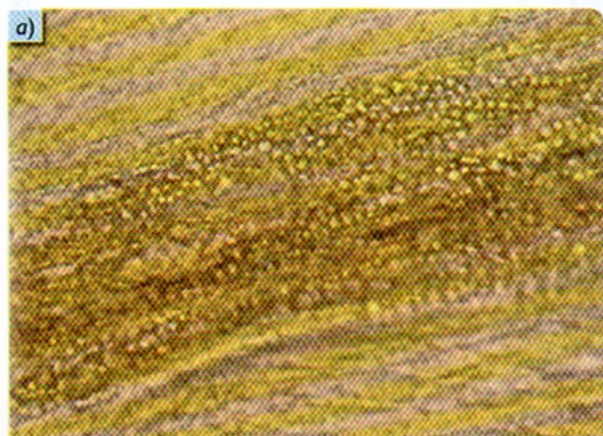
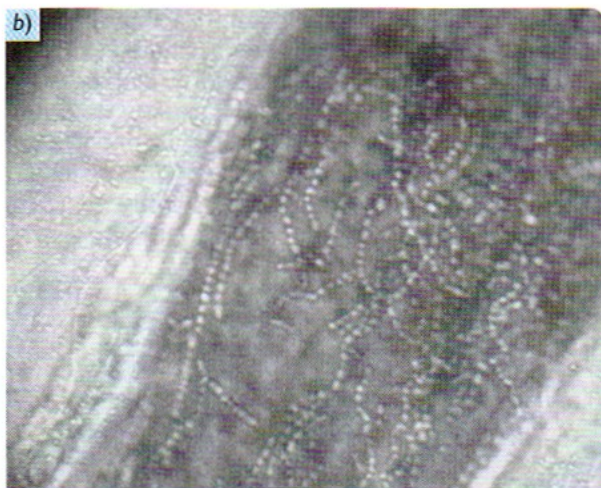


Fig. 3.4. Parasitación endotrix del pelo: a) se observan microconidios en gran cantidad en el interior del pelo; b) acercamiento del espécimen; los filamentos fragmentados en arthroconidios invaden y destruyen el interior del pelo (40X).



Escamas de piel y uñas. Se observan filamentos septados, ramificados y/o fragmentados en arthroconidios rectangulares o redondos, distribuidos irregularmente en las escamas (fig. 3.5).

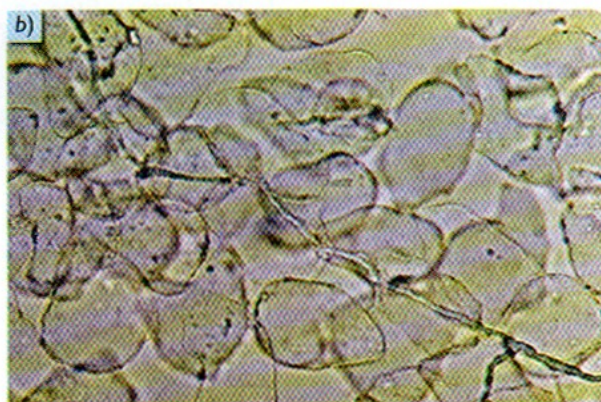
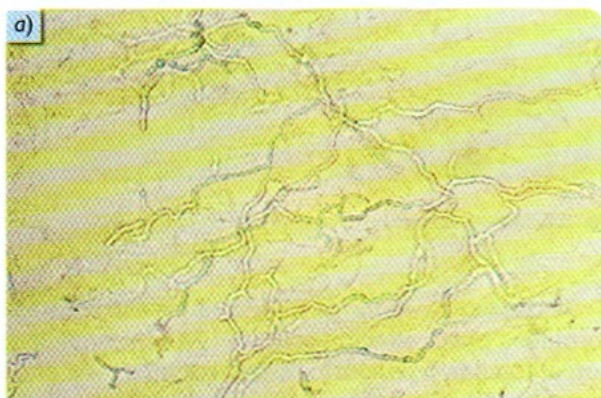


Fig. 3.5. Dos aspectos de dermatofitos en escamas de piel: a) filamentos flexuosos ramificados; b) acercamiento de los filamentos y las células que formaban la uña.

En ocasiones es difícil la identificación de los filamentos, sobre todo cuando el paciente está bajo algún tratamiento tópico o general. También suelen observarse hifas en vías de desnaturalización hialinas, irregulares y fragmentadas. Es importante diferenciar los filamentos de dermatofitos de los filamentos de hongos contaminantes y de artefactos como fibras o mosaico fúngico (fig. 3.6).

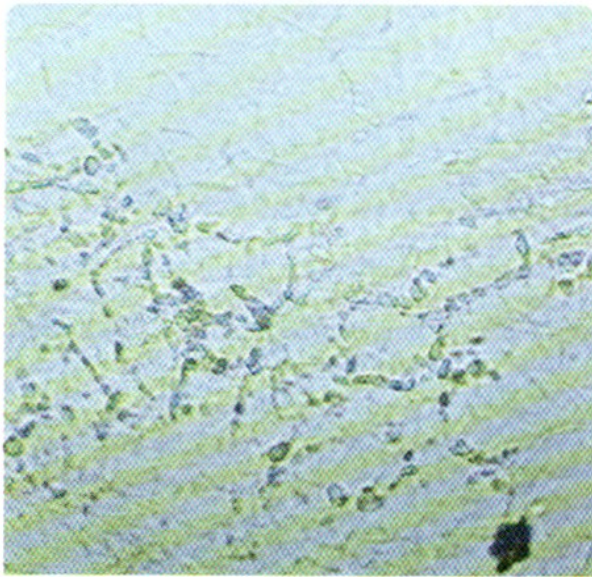


Fig. 3.6. Mosaico fúngico en escamas de piel.

Se denomina *mosaico fúngico* a las estructuras formadas por la precipitación del KOH, las cuales son alargadas o poliédricas, refringentes y de diámetro más o menos irregular.

Cultivo. Para el cultivo de los dermatofitos se utiliza el agar dextrosa Sabouraud adicionado con cloramfenicol y ciclohexamida. De acuerdo con las necesidades específicas de cada dermatofito, se pueden hacer modificaciones a este medio, como la adición de extracto de levadura para obtener un mejor crecimiento de la colonia, o la disminución de la concentración de dextrosa para disminuir el pleomorfismo. Para estimular la conidiación se recomienda el medio de harina de arroz; este medio también disminuye el pleomorfismo.

El crecimiento de las colonias de dermatofitos es lento, de ocho a 20 días, a una temperatura de 25 °C. A continuación se describen las características morfológicas básicas para la identificación taxonómica de los dermatofitos más comunes.

TRICHOPHYTON MENTAGROPHYTES

Morfología macroscópica. La variedad granulosa desarrolla colonias de crecimiento rápido en un plazo de ocho a 10 días, planas, de color crema o amarillentas, de aspecto pulverulento y con anillos concéntricos. Se observa un color marrón claro en el reverso, aunque algunas cepas presentan un color rojo y oscuro. La variedad interdigitale desarrolla colonias planas y blancas, que con el tiempo se tornan amarillentas, pudiendo ser el reverso amarillento o marrón. Tienen un aspecto densamente veloso o algodonoso (fig. 3.7a).

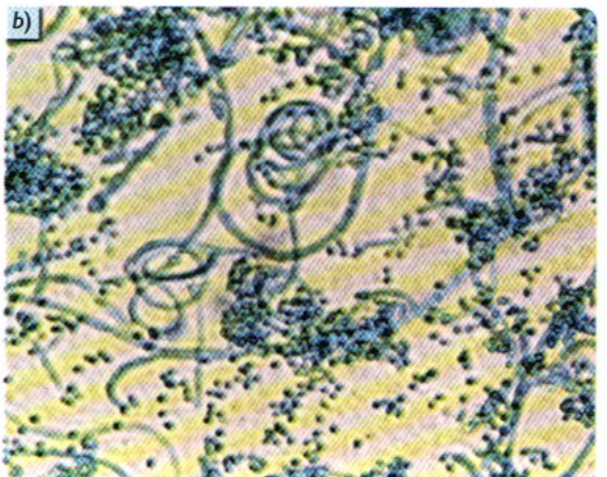


Fig. 3.7. *Trichophyton mentagrophytes*: a) colonias blanquecinas, planas y pulverulentas; b) hifas en espiral, microconidios redondos, abundantes y en grandes agrupaciones.

Morfología microscópica. Se observan hifas septadas, con formaciones en espiral, pequeños microconidios esféricos de 2 a 3 μm de diámetro, agrupados, que semejan racimos de uvas. Los macroconidios tienen forma de lápiz, de tres a seis septos. En la variedad granulosa los microconidios y las hifas en espiral son abundantes y los macroconidios de 30 a 60 μm tienen de cuatro

a seis septos y son escasos. En la variedad interdigitale los microconidios redondos o en forma de lágrima, difíciles de distinguir de los de *T. rubrum*, son menos abundantes que en la variedad granulosa. En algunas cepas se presentan macroconidios en forma de mazo o cigarro, de dos a cuatro septos; tienen una unión estrecha a la hifa vegetativa (fig. 3.7b).

Cuadro 3.1. Características generales de los principales dermatofitos.

Dermatofitos	Invasión a pelo	Requerimientos nutricionales específicos	Perforación del pelo in vitro	Fluorescencia con luz de Wood
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Ectotrix y endotrix. Cadenas de conidios de 2 a 4 μm	No reportados	Sí	Ausente
<i>Trichophyton rubrum</i>	Ectotrix y endotrix. En la primera, cadenas de conidios grandes; en la segunda, conidios más pequeños	No reportados	No	Ausente
<i>Trichophyton schoenleinii</i>	Endotrix. Hifas con burbujas aéreas en el pelo; conidios escasos o ausentes	No reportados	No	Frecuentemente azul pálida
<i>Trichophyton tonsurans</i>	Endotrix. Abundantes cadenas de conidios	Crece mejor en presencia de tiamina	No	Ausente
<i>Trichophyton verrucosum</i>	Ectotrix. Grandes conidios en cadenas de 4 a 5 μm de diámetro	Todas las cepas requieren tiamina	No	Ausente
<i>Trichophyton violaceum</i>	Endotrix de 4 a 5 μm de diámetro	Tiamina e inositol. El crecimiento aumenta a 37 °C	No	Ausente
<i>Trichophyton concentricum</i>	No se conoce	Tiamina	No	Ausente
<i>Trichophyton soudanense</i>	Endotrix como <i>T. tonsurans</i> <i>T. violaceum</i>	No reportados	No	Ausente
<i>Microsporum canis</i>	Ectotrix. Masas de conidios pequeñas	No reportado	No	Verde brillante
<i>Microsporum gypseum</i>	Principalmente ectotrix. Conidios dispersos y en cadenas	No reportados	Sí	Ausente o débil
<i>Microsporum fulvum</i>	Ectotrix. Similar a <i>M. gypseum</i>	No reportados	Sí	Ausente o débil

TRICHOPHYTON RUBRUM

Morfología macroscópica. Kaminsky propone la existencia de dos tipos: a) granular, y b) velloso. El granular tiene, a su vez, dos variedades: var. *rhodanii* y var. *africana*. El tipo velloso presenta siete variedades: var. Y, var. *flava*, var. P, var. *melanoide*, var. *hiperpigmentada*, var. *incolora* y var. *disgónica* (fig. 3.8a).

Morfología microscópica. La colonia presenta hifas largas y delgadas, con pequeños microconidios laterales en forma de lágrima o pera, de $2 \times 3 \mu\text{m}$. En la mayoría de cultivos su número es escaso. Los macroconidios grandes, alargados, de pared lisa y con varios septos son raros o incluso pueden estar ausentes. Las colonias de tipo granular generalmente son muy esporuladas con gran cantidad de microconidios y macroconidios en racimos semejantes a los de *Epidermophyton floccosum*, dermatofito con el que se pueden confundir.

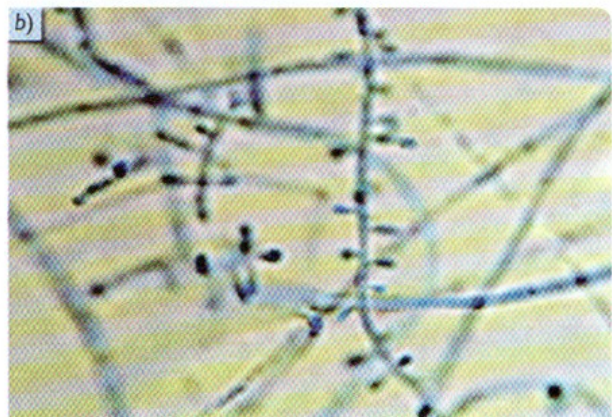
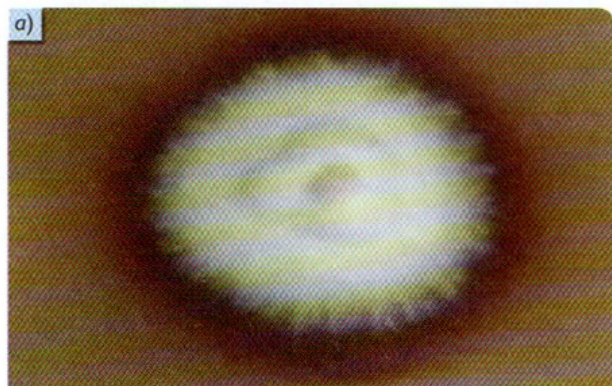


Fig. 3.8. *Trichophyton rubrum*: a) colonias blancas algodonosas en cuyo reverso aparece un pigmento rojizo; b) microconidios piriformes escasos, de 2 a $3 \mu\text{m}$, dispuestos en forma irregularmente alterna.

Las cepas muy esporuladas y las de tipo velloso, var. *incolora*, pueden confundirse con *T. tonsurans* o con *T. mentagrophytes*. Cuando se tiene duda, el aislado debe sembrarse en medio de harina de maíz, en la que *T. rubrum* generalmente produce pigmento rojo (fig. 3.8b).

TRICHOPHYTON TONSURANS

Morfología macroscópica. Al inicio forma una colonia plana, poco pulverulenta, amarillenta en el anverso y color rojizo en el reverso. Después de 8 a 10 días se vuelve plegada, de superficie con aspecto de ante de color crema grisáceo o marrón claro. Al reverso presenta un pigmento ocre rojizo oscuro, que difunde el medio. Algunos aislados son menos pulverulentos y pueden originar colonias de color blanquecino, amarillo claro o amarillo intenso (fig. 3.9a).

Morfología microscópica. Se observan microconidios, generalmente abundantes y de tamaño variable entre 2 y $5 \mu\text{m}$, tienen forma de mazo, de lágrima o irregular y son de pared gruesa; estos conidios nacen de hifas ramificadas o terminales y que se disponen en ángulo recto con respecto a éstas. Tienen tendencia a aumentar de tamaño, dando lugar a estructuras en forma de clava o de balón. Los macroconidios son menos frecuentes y están menos diferenciados que los de *T. mentagrophytes* y más romos que los de *T. rubrum*. Los artroconidios son frecuentes.

Pueden encontrarse hifas en espiral, clamidoconidios e hifas en raqueta. Las hifas que se observan en un campo microscópico generalmente tienen diámetros variables que van de 2 a $10 \mu\text{m}$ (fig. 3.9b).

TRICHOPHYTON VERRUCOSUM

Morfología macroscópica. La colonia es generalmente blanca, de crecimiento muy lento, rugosa, en forma de botón o ligeramente plegada. Alguna variedad puede ser plana, amarilla y plegada, o bien, plana y ligeramente vellosa, de color blanco grisáceo.

Morfología microscópica. En agar dextrosa Sabouraud se observan hifas tortuosas, con ramificaciones en forma de asta, semejantes a las de *T. schoenleinii*, pero con los extremos menos abultados. En medios enriquecidos con tiamina

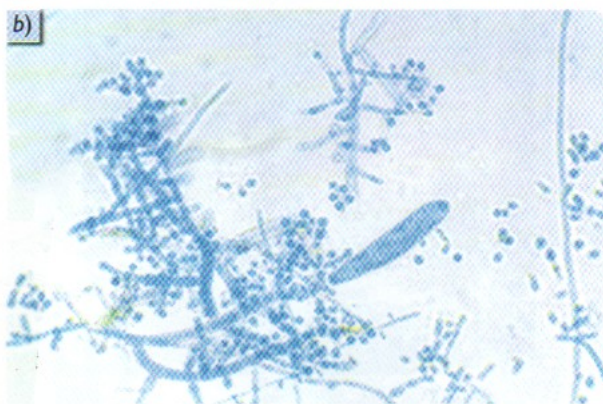
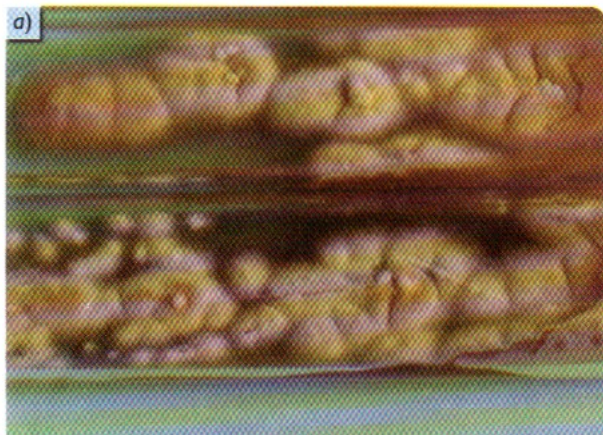


Fig. 3.9. *Trichophyton tonsurans*: a) colonia blanco-amarillenta de aspecto pulverulento, aterciopelado y rugoso; b) abundantes microconidios, redondos y/o alargados, de tamaño variable; hifas de diámetro irregular y macroconidios en forma de mazo y pared lisa.

se observan microconidios en forma de lágrima y, en ocasiones, macroconidios con una forma muy característica de “cola de rata” o “habichuela” (fig. 3.10).

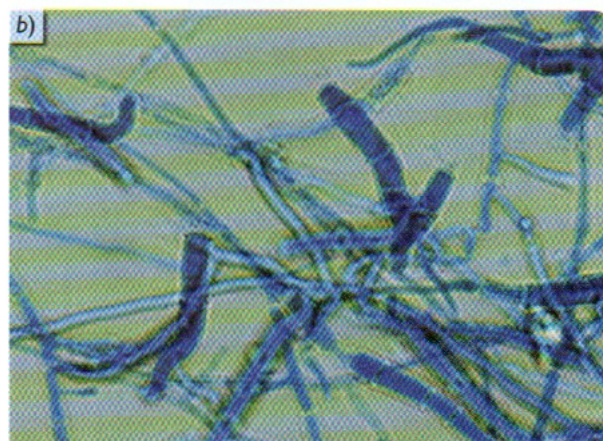
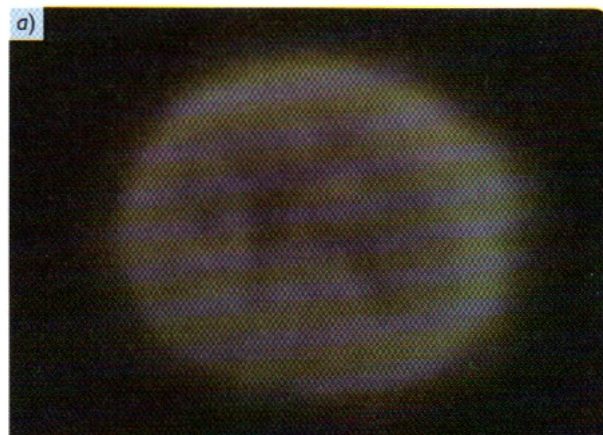


Fig. 3.10. *Trichophyton verrucosum*: a) cultivo en medio de agar dextrosa Sabouraud; b) aspecto microscópico del cultivo teñido con azul de algodón.



Fig. 3.11. *Trichophyton concentricum*. Hifas septadas con abundantes vesículas de diámetro variable.

TRICHOPHYTON CONCENTRICUM

Morfología macroscópica. La colonia es de crecimiento lento, al principio blanca y después ámbar, marrón o rojo coral, que tiende a hacerse rugosa con los subcultivos. La colonia es muy similar a la de *T. schoenleinii*, pero un poco más rugosa y oscura.

Morfología microscópica. Se observan hifas tortuosas y ramificadas sin microconidios ni macroconidios, ramificaciones terminales, generalmente sin abultamiento apical (fig. 3.11).

TRICHOPHYTON SOUDANENSE

Morfología macroscópica. La colonia es de crecimiento lento, plana o plegada, de color amarillo, con consistencia de chicle. El reverso es amarillo intenso o violeta y los bordes son radiados.

Morfología microscópica. Se observan hifas segmentadas en artroconidios y con ramificaciones invertidas o en ángulo recto. Se pueden encontrar microconidios piriformes a lo largo de la hifa (fig. 3.12).



Fig. 3.12. *Trichophyton soudanense*. Aspecto macroscópico en medio de Sabouraud con pigmento amarillo al reverso.

TRICHOPHYTON SCHOENLEINII

Morfología macroscópica. Colonia de aspecto céreo o ligeramente vellosa, blanca, de superficie elevada o rugosa, con aspecto de cera de abeja. Los primoaislamientos se presentan con consistencia de levadura y microscópicamente se asemejan a la fase de levadura de *Blastomyces dermatitidis*. Los subcultivos tienden a hacerse cada vez más vellosos y dispersos. Algunas cepas tienden a crecer por debajo de la superficie y provocan depresiones en la superficie del medio de cultivo.

Morfología microscópica. Generalmente no se observan microconidios ni macroconidios. Inmediatamente por debajo de la superficie se producen las hifas características en forma de asta o cuerno.

Las ramas terminales en forma de cuerno son frecuentes en otros dermatofitos, pero solamente en *T. schoenleinii* se observan extremos hifales abultados. Los cultivos directos de material clínico consisten en artroconidios en forma de levaduras esféricas (fig. 3.13).

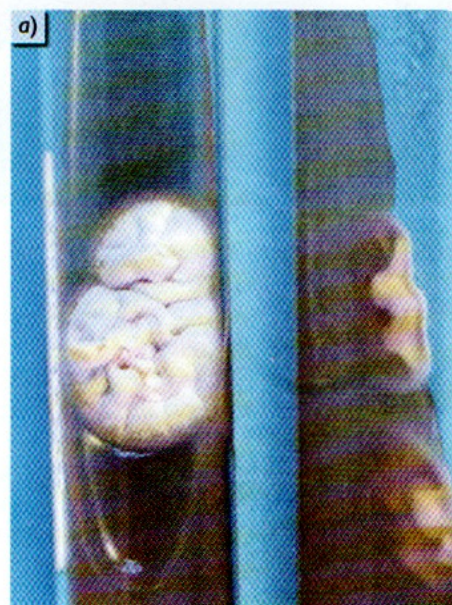


Fig. 3.13. *Trichophyton schoenleinii*: a) colonia en medio de Sabouraud que crece por debajo del medio; b) ramificaciones hifales características en forma de cuerno de reno.

TRICHOPHYTON VIOLACEUM

Morfología macroscópica. El cultivo es de crecimiento muy lento: algunas veces demora tres semanas su desarrollo. La superficie es elevada en

forma cónica o plegada, glabra o cérea y de color violeta intenso. Este dermatofito se pleomorfisa rápidamente, dando lugar a zonas que van desde el micelio violeta pálido hasta el blanco, que después cubren toda la colonia original. Los cultivos viejos de colección se vuelven planos, blancos y vellosos. El reverso de la colonia también presenta color púrpura (fig. 3.14).

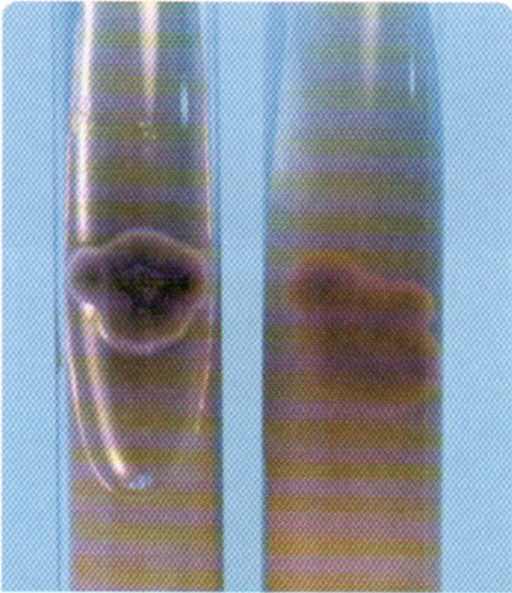


Fig. 3.14. *Trichophyton violaceum*. En el medio de Sabouraud se observa el color violáceo de este hongo.

Morfología microscópica. En los medios habituales son características las hifas tortuosas y la ausencia de conidios. En el interior de las hifas se encuentran gránulos citoplásmicos. Para las resembras se deben utilizar medios enriquecidos con tiamina (agar *Trichophyton* núm. 4), donde se pueden observar algunos microconidios en forma de clava y macroconidios alargados; además, la tiamina evita el pleomorfismo rápido de esta especie.

EPIDERMOPHYTON FLOCCOSUM

Morfología macroscópica. Se observan colonias granulares y bordes radiados, aterronadas o dispersas, de un color que va del amarillo mostaza al gris olivo. Algunas colonias son rugosas, con aspecto de ante, radiadas, de color verde olivo al reverso (fig. 3.15a).

Morfología microscópica. Se observan macroconidios con paredes lisas, generalmente abundantes en forma de mazo o raqueta, agrupados en racimos; presentan dos o cuatro septos. En las colonias viejas abundan los clamidoconidios, redondeados y de pared gruesa. No se observan microconidios (fig. 3.15b).

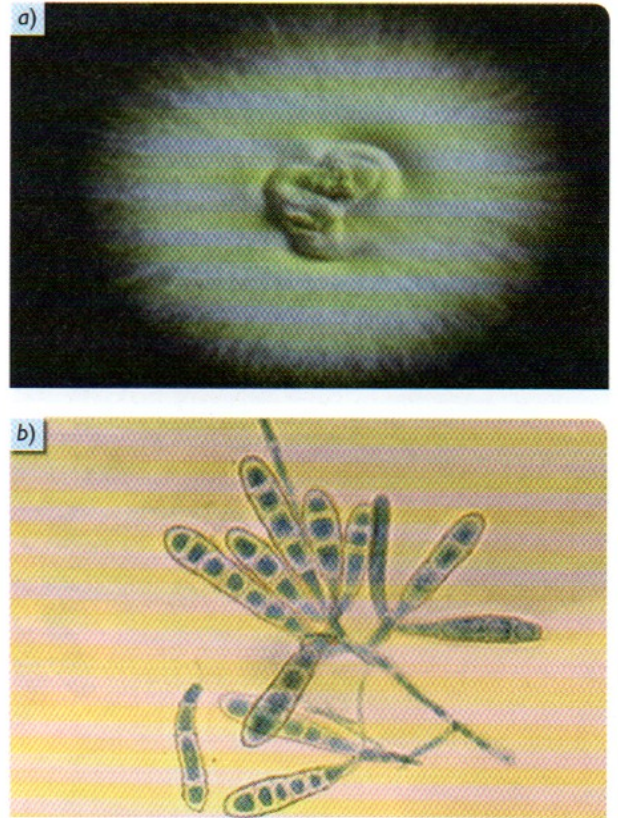


Fig. 3.15. *Epidermophyton floccosum*: a) colonia plana, radiada o rugosa; cuando se observa a contraluz es de color verde amarillenta, pulverulenta en el centro; b) macroconidios abundantes, lisos, en forma de raqueta y en racimo (en los cultivos viejos se observan clamidoconidios).

MICROSPORUM CANIS

Morfología macroscópica. La colonia es de crecimiento rápido, con tendencia a ser plana, blanca o amarillenta, toscamente vellosa o algodonosa, dispersa, con bordes radiales y con un color amarillo intenso o anaranjado al reverso (fig. 3.16a).

Morfología microscópica. Se encuentran macroconidios en abundancia, largos, en forma de huso, de paredes gruesas, con una prominencia

asimétrica apical en donde es más evidente la superficie rugosa (espículas) de estas estructuras, y casi siempre con más de seis compartimientos. Hay escasos microconidios piriformes o en forma de clava, no diagnósticos de la especie. También pueden observarse hifas en raqueta, cuerpos pectinados y clamidoconidios (fig. 3.16b).

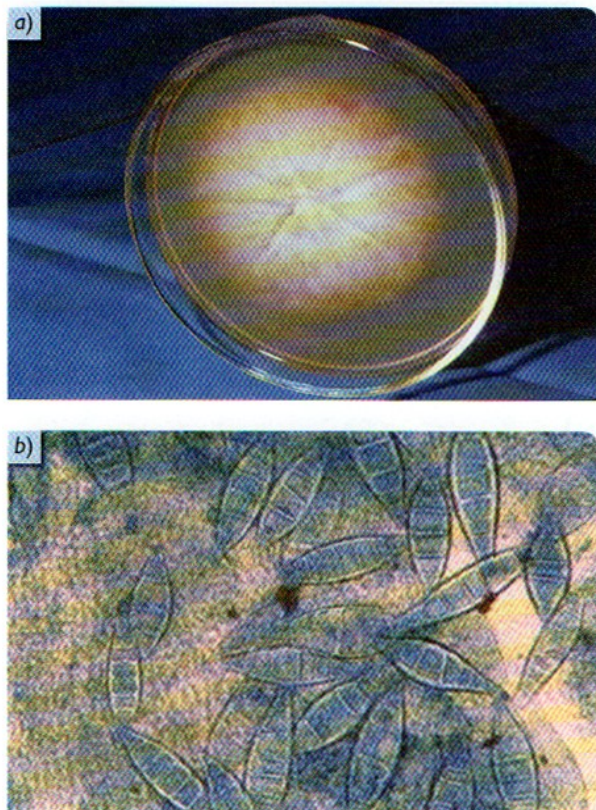


Fig. 3.16. *Microsporium canis*: a) colonias vellosas, radiadas, con pigmento naranja en el reverso; b) macroconidios fusiformes, equinulados y abundantes.

MICROSPORIUM GYPSEUM

Morfología macroscópica. La colonia es de crecimiento rápido, plana, pulverulenta, con aspecto y textura de piel de ante, de color variable beige, canela y algunas veces con tonos de color violeta. El reverso puede o no presentar pigmento de color rojizo o beige (fig. 3.17a).

Morfología microscópica. Se observan macroconidios en abundancia, simétricos, elipsoidales, de superficie rugosa o equinulada, con paredes relativamente delgadas, de cuatro a siete compar-

timientos y agrupados en racimos. Pueden encontrarse microconidios en forma de mazo, pero no son diagnósticos (fig. 3.17b).

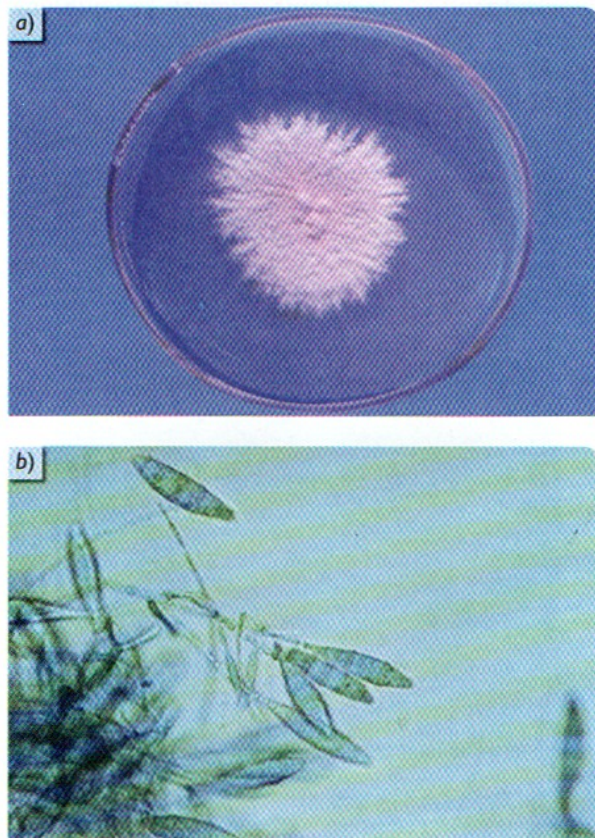


Fig. 3.17. *Microsporium gypseum*: a) colonia de color marrón claro con aspecto de ante muy pulverulento; b) macroconidios abundantes en racimos, fusiformes y equinulados.

MICROSPORIUM FULVUM

Morfología macroscópica. La colonia es de crecimiento rápido, plana, de superficie pulverulenta, con aspecto de piel de ante, de color canela o rosa, cuya periferia frecuentemente es blanca. Puede observarse un color rojo oscuro al reverso (fig. 3.18a).

Morfología microscópica. Presenta macroconidios en abundancia, muy semejantes a *M. gypseum*, pero más largos o en forma de bala, frecuentemente laterales y menos agrupados. Se observan hifas en espiral, abundantes y ramificadas. También se producen microconidios, pero son indistinguibles de los de otras especies de dermatofitos (fig. 3.18b).

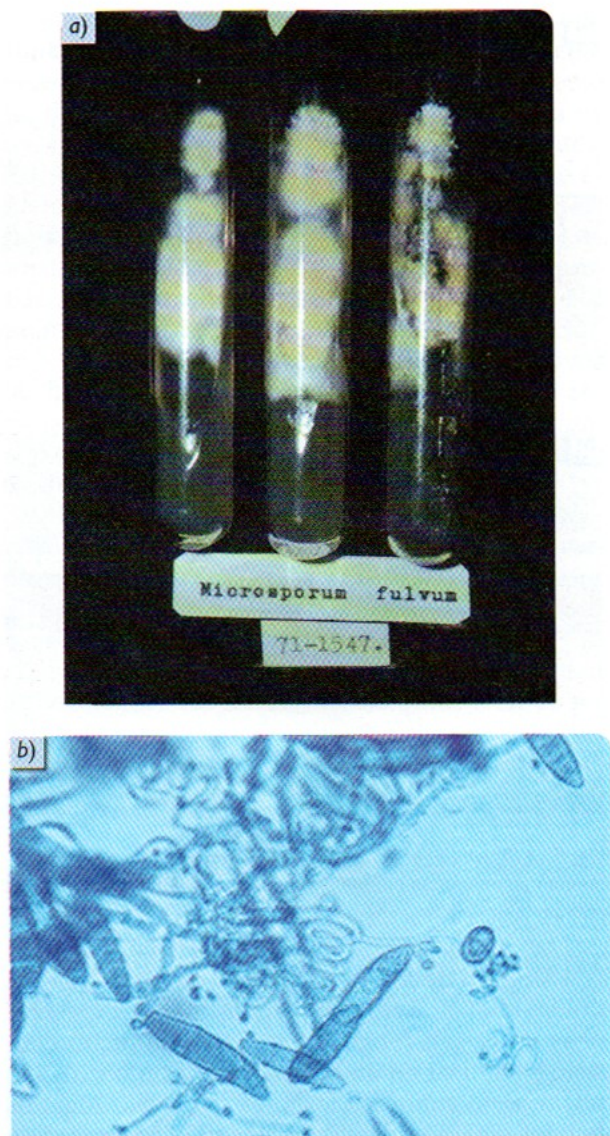


Fig. 3.18. *Microsporium fulvum*: a) aspecto macroscópico, muy semejante a las de *M. gypseum*; b) macroconidios fusiformes, en racimos, microconidios redondos e hifas en espiral.

MICROSPORIUM PERSICOLOR

Morfología macroscópica. La colonia es de crecimiento rápido, plana o ligeramente plegada, vellosa, pulverulenta o con aspecto de ante, frecuentemente con bordes radiados y de superficie de color amarillo pálido o rosáceo, con diversos tonos ocre al reverso. En medios sin azúcar, la superficie y la parte inmediatamente por debajo desarrolla un tono rosa o vino intenso.

Morfología microscópica. Es muy parecida a la de *T. mentagrophytes*, con grandes grupos de microconidios esféricos o piriformes. Son comunes las hifas en espiral, los macroconidios dispersos, angostos, en forma de huso o de mazo, generalmente de seis septos y con equínulas en su superficie (fig. 3.19).



Fig. 3.19. *Microsporium persicolor*: a) aspecto macroscópico de la colonia, donde se observa micelio compacto blanquecino tipo granular; b) aspecto microscópico, hifas cortas en espiral; macroconidios en forma de mazo, con espinulas que predominan en el extremo distal; microconidios piriformes, redondos y abundantes.

MICROSPORIUM NANUM

Morfología macroscópica. La colonia es de crecimiento rápido, finamente dispersa, de superficie pulverulenta de color ante oscuro, semejante

a *M. gypseum*. El reverso frecuentemente presenta un color blanco amarillento o rosado (fig. 3.20a).

Morfología microscópica. Los macroconidios son abundantes, con paredes relativamente delgadas, equinuladas, de forma oval o elipsoidal, generalmente con uno o dos septos. Los microconidios tienen forma de clava, no específicos de la especie (fig. 3.20b).

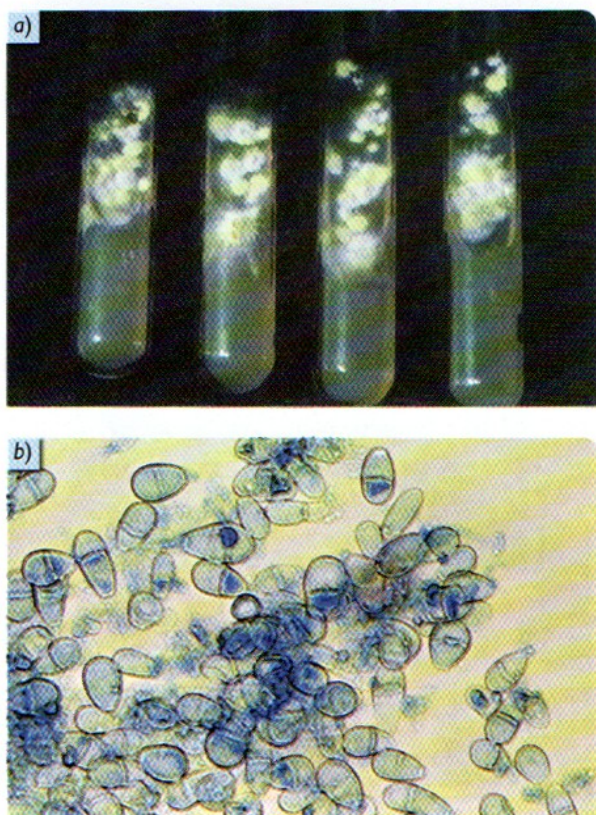


Fig. 3.20. *Microsporium nanum*: a) cultivo en Sabouraud, donde se observan colonias pulverulentas, planas, de color canela claro; b) abundantes macroconidios ovoides, con uno o dos septos y espículas finas en la superficie.

PRUEBAS ESPECIALES

Perforación del pelo in vitro. Muchos dermatofitos geófilos y zoófilos característicamente perforan el pelo in vitro por medio de estructuras hifales especiales llamadas órganos perforantes. Esta es una prueba confiable para diferenciar algunas especies como *T. mentagrophytes* de *T. rubrum*, en la que solamente el primero perfora el pelo (fig. 3.21).

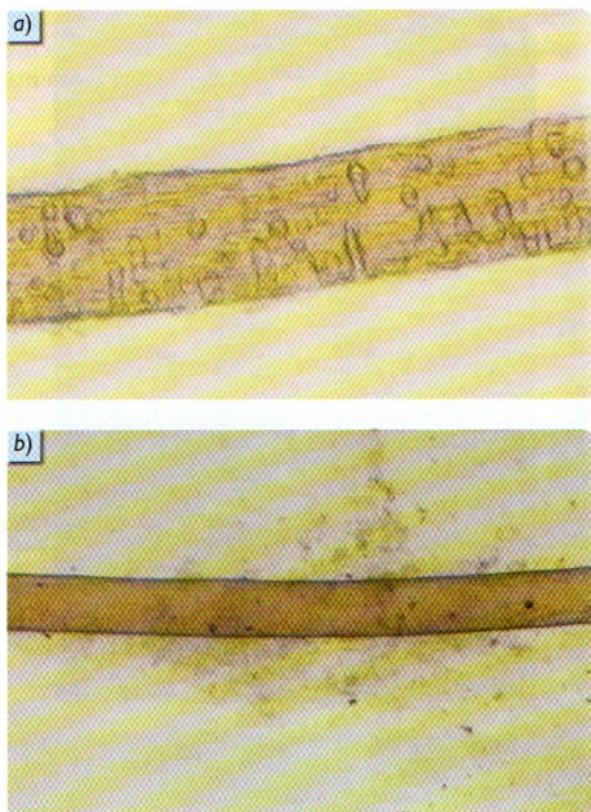


Fig. 3.21. Prueba de perforación del pelo in vitro: a) órganos perforantes cónicos producidos por *T. mentagrophytes*; b) ausencia de órganos perforantes cuando se prueba *T. rubrum*.

Lámpara de luz de Wood. Es una herramienta útil en el diagnóstico de algunas infecciones cutáneas de origen fúngico. Este procedimiento consiste en aplicar en un cuarto oscuro un haz de luz ultravioleta sobre las lesiones cutáneas. Algunos hongos y algunas bacterias tienen la propiedad de fluorescer en diferentes tonalidades de color. Se utiliza comúnmente para demostrar la infección por *M. canis*.

Las escamas y los pelos infectados muestran una fluorescencia verde brillante. La luz de Wood también produce una fluorescencia amarillo oro en las lesiones de pitiriasis versicolor causadas por *Malassezia*, un verde brillante en las lesiones infectadas por *Pseudomonas* y un tono rosa en el eritema que es causado por *C. minutissimum*. Este procedimiento no es diagnóstico definitivo, ya que diversos medicamentos tópicos pueden dar fluorescencia inespecífica. El diagnóstico definitivo siempre debe sustentarse con el examen microscópico directo y el cultivo.

Medio de prueba para dermatofitos (dermatophytes test medium, DTM). Este es un medio selectivo que sustituye a otros para el aislamiento de dermatofitos, ya que excluye a la mayoría de las bacterias y a muchos hongos contaminantes. Contiene un indicador de pH que rápidamente es afectado por los dermatofitos, variando el color del medio de amarillo a rojo. Una vez inoculado este medio con la cepa o producto biológico por probar, se incuba a una temperatura de 28 a 30 °C por no más de dos semanas. Un periodo de incubación más largo propicia los resultados falsos positivos de hongos contaminantes morfológicamente semejantes a los dermatofitos como *Chrysosporium* spp y no aumenta la posibilidad de recuperación de dermatofitos.

Algunos hongos contaminantes como *Cladosporium* o *Penicillium* spp también cambian el medio a rojo; sin embargo, son fáciles de diferenciar de los dermatofitos por el rápido crecimiento y aspecto morfológico de estos contaminantes. Se considera que este medio tiene 98 % de seguridad en el diagnóstico de las dermatofitosis en el ser humano (fig. 3.22).



Fig. 3.22. Prueba para diferenciación de dermatofitos (DTM). En la prueba positiva, los dermatofitos hacen cambiar la coloración del medio del amarillo al rojo.

Prueba de la ureasa. Es útil para diferenciar *T. rubrum* de *T. mentagrophytes*. En los medios de urea, *T. rubrum* presenta una actividad de ureasa débil o ausente antes de 14 días; en cambio, *T. mentagrophytes* demuestra una fuerte actividad de ureasa antes de 7 días.

Intradermorreacción (IDR). Prueba inmunológica a base de tricotina, que es un filtrado de cultivo de *T. mentagrophytes* utilizado como prueba de hipersensibilidad celular tardía, y no procede para el diagnóstico; sin embargo, se utiliza para valorar estados de hipersensibilidad a los dermatofitos. Por la alta frecuencia de positividad de la tricotina en las personas, ésta forma parte de la batería de antígenos utilizados para valorar en términos generales las condiciones de la inmunidad celular en pacientes, en quienes generalmente se aplican: tricotina, candidina, PPD y varidasa.

Histopatología. No constituye un procedimiento de elección para el diagnóstico de las dermatofitosis, salvo en las formas inflamatorias y granulomatosas profundas, donde se observan reacciones histopatológicas características y la presencia de filamentos de dermatofitos en los tejidos. Los cortes deben ser teñidos con hematoxilina-eosina y con la tinción de PAS para observar tanto la reacción inflamatoria como las hifas teñidas en rojo.

Una reacción alérgica exagerada da lugar a la foliculitis y perifoliculitis, formando el *querion de Celso*, que inicialmente consiste en una reacción leucocítica aguda en la dermis profunda y en el tejido subcutáneo. Gradualmente el infiltrado celular se convierte en un infiltrado de tipo crónico que altera totalmente la arquitectura normal del tejido.

En la perifoliculitis nodular y en el granuloma de Majocchi o tricofítico, generalmente causado por *T. rubrum*, se observan conidios y micelio en el folículo piloso y en el infiltrado inflamatorio de la dermis. En ocasiones se observan estructuras semejantes a conidios, de forma irregular, que pueden medir 6 µm de diámetro y que corresponden a la presencia de conidios y micelio liberados por la ruptura de la pared del folículo, producida por la reacción de un cuerpo extraño y la formación de granulomas. Se observan leucocitos, histiocitos, células epitelioides y algunas células gigantes.

PITIRIASIS VERSICOLOR Y DERMATITIS SEBORREICA

DESCRIPCIÓN

La pitiriasis versicolor es una infección micótica del estrato córneo de la piel, caracterizada por manchas hipercrómicas o hipocrómicas, de forma irregular y que presentan una descamación fina. Se localiza con mayor frecuencia en el tronco, el

cuello y los brazos. Las lesiones son asintomáticas y pueden confluir formando manchas extensas y abarcar toda la cara anterior o posterior del tórax.

Los agentes etiológicos son levaduras del género *Malassezia*, hongos dimórficos que forman parte de la biota comensal humana, y se localizan en las zonas seboreicas de la piel, como son: la piel cabelluda, las regiones retroauriculares, las alas de la nariz y la parte superior del manubrio del esternón.

En la actualidad, el género *Malassezia* está compuesto por 13 especies; las siete primeras: *M. furfur*, *M. pachydermatis*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. slooffiae*, *M. restricta* y *M. obtusa*, se establecieron tomando como base la morfología y diversas pruebas fisiológicas. Las otras seis especies: *M. dermatis*, *M. japonica*, *M. yamatoensis*, *M. equi*, *M. caprae* y *M. nana*, se establecieron con base en estudios moleculares con ADN y ARN. En las infecciones cutáneas, las especies implicadas con mayor frecuencia son *M. globosa*, *M. sympodialis* y *M. furfur*.

La micosis es más frecuente en las personas que habitan en lugares de clima cálido y húmedo,

como son las regiones costeras tropicales, en donde la frecuencia llega a ser hasta de 50 %. No existe predominio de sexo y es más frecuente en los adultos jóvenes.

Además del clima, se han señalado otros factores predisponentes a la infección: aplicación local de corticosteroides, desnutrición, cambios lentos de la epidermis y predisposición genética.

En otra entidad clínica, la dermatitis seboreica también se asocia con frecuencia a *Malassezia* spp. El cuadro clínico se caracteriza por placas eritematosas, descamativas y pápulas, que son pruriginosas. Se localizan principalmente en áreas seboreicas como la piel cabelluda y región centrofacial. En la piel cabelluda, a esta descamación se le conoce como caspa, en tanto que en la cara puede producir lesiones que semejan a "alas de mariposa" y debe hacerse diagnóstico diferencial con otras dermatosis como rosácea y demodectosis. Actualmente se ha demostrado que la patología se debe a hipersensibilidad a los metabolitos de levaduras de *Malassezia* spp (cuadro 3.2).

Cuadro 3.2. Especies de *Malassezia* identificadas por pruebas bioquímicas y fisiológicas.

Especie	Características	Patologías
<i>M. furfur</i>	Colonias convexas, de superficie lisa o rugosa, color crema Levaduras alargadas de hasta 6 µm de diámetro Contenido de G + C, 66.4 %	Se asocia con infecciones sistémicas
<i>M. sympodialis</i>	Colonias planas, de superficie lisa y brillante Levaduras pequeñas de 2 a 5 µm Contenido de G + C, 62.2 %	Pitiriasis versicolor Dermatitis seboreica Otitis
<i>M. globosa</i>	Colonias de superficie rugosa, marrón claro Levaduras esféricas de 6 a 8 µm, en cuyos cultivos se observan algunos filamentos Contenido de G + C, 53.3 %	Pitiriasis versicolor Dermatitis seboreica Foliculitis
<i>M. slooffiae</i>	Colonias con pliegues muy finos, de color crema u ocre y textura quebradiza Levaduras cilíndricas de 1.5 a 3.5 µm Contenido de G + C, 68.7 %	Pitiriasis versicolor
<i>M. obtusa</i>	Levaduras cilíndricas de 2 × 6 µm	Pitiriasis versicolor
<i>M. restricta</i>	Levaduras esféricas u ovoides de 2 × 4 µm Prueba de catalasa negativa	Dermatitis seboreica
<i>M. pachydermatis</i>	Especie no lipofílica que se aísla de cánidos y rinocerontes	Foliculitis Infecciones sistémicas

Datos tomados de:

Crespo, E. V. y Delgado, F. V., *Curr. Op. Infect., Dis.*, 15:133, 2002.

Guillot, J., Guého, E., Lesourd, M. y cols., *J. Mycol., Med.*, 6:103, 1996.

Maenza, J. R. y Merz, W. G., *Clinical Mycology*, Churchill Livingstone, 2003.

ESPECÍMENES BIOLÓGICOS

- Escamas de lesiones superficiales para ambos cuadros clínicos.

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Examen directo

Pitiriasis versicolor. Las escamas aclaradas con KOH al 15 % o teñidas con azul de metileno muestran levaduras redondas de 4 a 8 μm de diámetro, agrupadas en racimos. Estas estructuras están mezcladas con filamentos gruesos, cortos, rectos o ligeramente angulados y sin ramificaciones. A esta forma se le conocía como *Pityrosporum orbiculare* y se decía que era la forma parasitaria; actualmente es incorrecto nombrar así a los agentes etiológicos de esta micosis (fig. 3.23).

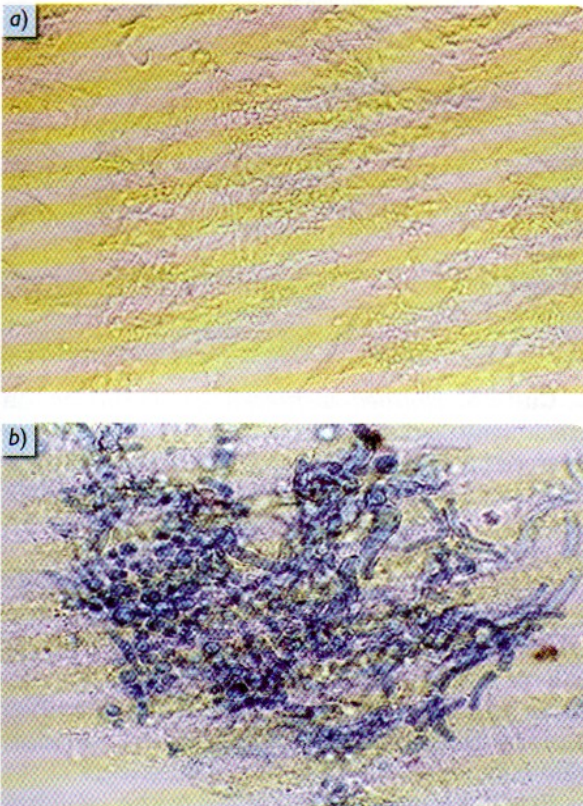


Fig. 3.23. Examen directo de escamas de piel parasitadas por *Malassezia* spp. Levaduras redondas, abundantes y en agrupaciones, con filamentos cortos, gruesos y angulados: a) preparación con KOH; b) preparación con azul de algodón lactofenol y contraste de fases.

Dermatitis seborreica. Es suficiente hacer un examen directo de escamas y aplicarles una gota de azul de metileno. Se observan a 100X, con lo cual se detectan fácilmente levaduras alargadas en forma de botella de 3 a 5 micras de diámetro; a esta forma del hongo se le llamaba *Pityrosporum ovale* y se decía que era la forma no parásita del hongo. Actualmente las dos formas de *Pityrosporum*: orbiculare y ovale, son sinónimos de *Malassezia* spp (fig. 3.24).

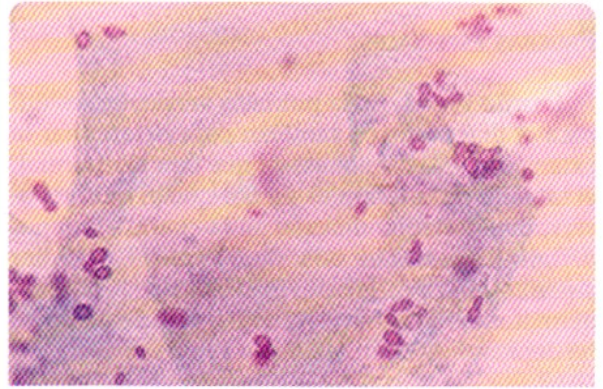
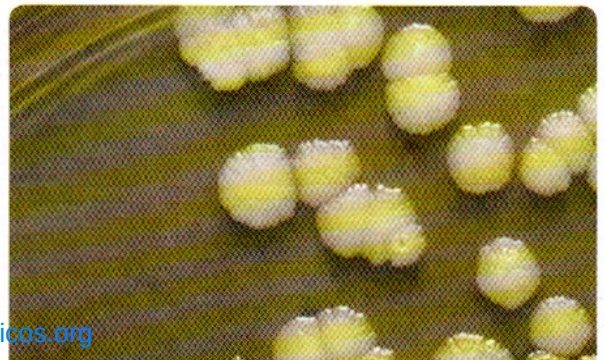


Fig. 3.24. *Malassezia* spp (*P. ovale*). Levaduras alargadas (forma de botella) en escamas, obtenidas de una lesión de dermatitis seborreica (tinción con azul policromo.)

Cultivo. No es un procedimiento que se practique rutinariamente en el laboratorio, ya que para establecer el diagnóstico, basta con la observación microscópica directa; sin embargo se pueden obtener los cultivos a partir de las muestras de cualquiera de los dos cuadros clínicos. Las escamas se siembran en ADS con antibióticos y 2 % de aceite de oliva o mejor aún en agar Dixon se incuban a 37 °C, con lo que se obtiene desarrollo de las colonias en cinco a siete días (fig. 3.25).

Fig. 3.25. *Malassezia* spp. Colonias redondas, levaduriformes, blanco-amarillentas, de consistencia cremosa en agar Dixon.



El examen directo del cultivo con azul de algodón muestra levaduras alargadas en forma de botella, redondas o cilíndricas y en algunos casos también muestran filamentos.

PRUEBAS INMUNOLÓGICAS

Aún no existen técnicas adecuadas para el diagnóstico, aunque se está valorando la efectividad de la prueba de ELISA en la dermatitis seborreica.

PRUEBAS ESPECIALES

Luz de Wood. En la pitiriasis versicolor, es útil para el diagnóstico y también para determinar la extensión de las lesiones, ya que con luz normal, el tamaño de la lesión es menor que el que se observa bajo esta iluminación en la cual las lesiones dérmicas presentan una fluorescencia de color amarillo o naranja (véase "Pruebas especiales para dermatofitos"). En la dermatitis seborreica no se ha demostrado la utilidad de este tipo de luz.

TIÑA NEGRA

DESCRIPCIÓN

Es una infección del estrato córneo de la piel, causada por un hongo saprofita llamado *Hortaea werneckii*. Se desconoce el mecanismo de infección, pero al parecer se produce por el contacto directo con el hongo que vive en el suelo y en detritus vegetales. Es más frecuente en el sexo femenino en una relación de 3:1 y en personas menores de 30 años. No se conocen los factores predisponentes, aunque muchos de los pacientes refieren hiperhidrosis. La micosis es más frecuente en zonas tropicales, siendo América Central, América del Sur y el Caribe las regiones donde con mayor frecuencia el padecimiento se presenta en las personas. En el contexto general de las micosis, se puede considerar a la tiña negra como poco frecuente.

Las lesiones clínicas se localizan principalmente en las palmas, aunque pueden presentarse también en los dedos y el dorso de la mano, así como en los brazos y plantas. Generalmente son lesiones únicas, maculares, muy superficiales, de color marrón oscuro o negro, de forma irregular y bordes precisos, poco descamativas y no pruriginosas.

ESPÉCIMEN BIOLÓGICO

- Escamas de piel.

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Examen directo. En las escamas aclaradas con KOH al 15 % se observan hifas con trayectos tortuosos, de color marrón, de aproximadamente 5 μm de diámetro, con gran número de ramificaciones. Las hifas están formadas por células redondas u ovales. El extremo distal de las hifas es hialino (fig. 3.26).

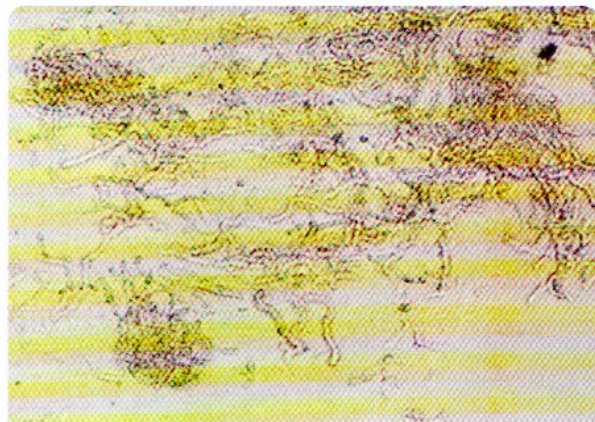


Fig. 3.26. *Hortaea werneckii*. Presencia de filamentos dematiáceos en escamas de piel, aclaradas con KOH.

Cultivo. *Hortaea werneckii* es un hongo de crecimiento lento; en un periodo de 15 a 21 días aparece una colonia blanca-grisácea, de superficie brillante, con bordes irregulares y que finalmente adquiere un aspecto veloso de color verde oscuro o negro (fig. 3.27a).

En el examen microscópico se observan células de tipo levadura, con un tabique central y con los extremos terminados en punta. A partir de la colonia verde oscuro o negro y vista por el microscopio, se observan hifas tortuosas, con numerosos septos y anélices que producen conidios ovalados, aglomerados y bicelulares (fig. 3.27b).

Pruebas bioquímicas. *Hortaea werneckii* hidroliza la caseína, prueba que permite diferenciarlo de *Exophiala jeanselmei* y de *Wangiella dermatitidis*, hongos con los que se puede confundir fácilmente.

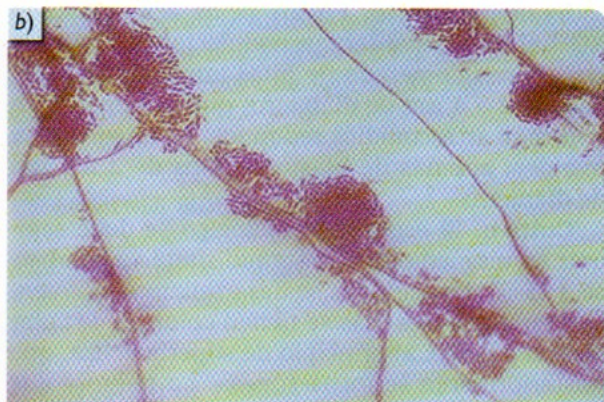
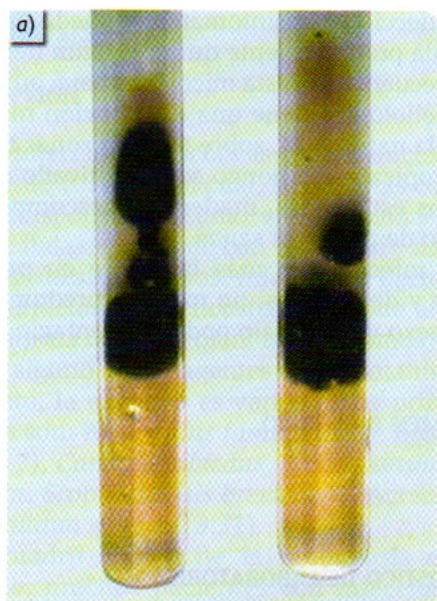


Fig. 3.27. *Hortaea werneckii*: a) en medio de Sabouraud, colonias negras, vellosas, circunscritas, de bordes bien definidos; b) filamentos pigmentados, con microconidios alargados, bicelulares, agrupados, que se originan a partir de filídes.

PIEDRA NEGRA

DESCRIPCIÓN

Es una micosis que afecta principalmente los pelos de la cabeza. Clínicamente se caracteriza por la presencia de nodulaciones duras, muy adherentes, de 1 o 2 mm de diámetro, de color marrón oscuro o negro; no hay invasión en el interior del pelo. El padecimiento es asintomático y sólo es importante para el paciente desde el punto de vista estético.

El agente etiológico es *Piedraia hortae*, un Ascomycete marrón oscuro de la subclase Loculoascomycetes. La enfermedad predomina en jóvenes del sexo masculino que habitan en zonas tropicales. El mecanismo de infección es por contacto directo, o bien, por fomites como peines, sombreros u otros objetos que deben ser de uso personal. Esta micosis está poco extendida a nivel mundial, aunque existen informes de algunos brotes epidémicos.

ESPÉCIMEN BIOLÓGICO

- Pelo.

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Examen directo. En los pelos aclarados con KOH al 15 % se observan nodulaciones superficiales, formadas por filamentos ramificados, unidos fuertemente por un cemento de color negro. En el interior de las nodulaciones se observan cavidades que contienen ascas que poseen cuatro u ocho ascosporas, además de algunas estructuras levaduriformes (fig. 3.28).



Fig. 3.28. Piedra negra. Aspecto macroscópico de un pelo parasitado por *Piedraia hortae*. Las nodulaciones negras están formadas por micelios y ascas con ascosporas. (Cortesía de F. Mariat.)

Cultivo. El agente etiológico es de crecimiento lento. Se observan colonias de color marrón oscuro o negro, dos o tres semanas después de la inoculación en los medios de Sabouraud simple y Sabouraud antibiótico incubados a 25 °C. Se encuentran, vistas por el microscopio, hifas septadas y

ramificadas, con clamidoconidios abundantes. En el centro de la colonia se pueden observar los lóculos dentro de los cuales se desarrollan las ascas.

PIEDRA BLANCA

DESCRIPCIÓN

Es una afección micótica de los pelos de la cabeza, bigote, barba o pubis, causada por hongos del género *Trichosporon*: *T. ovoides* y *T. inkin*. Aunque no se ha obtenido su forma de reproducción sexual, estudios morfológicos y de secuencia de ARN permiten ubicarlos en los basidiomicetos.

Clínicamente la micosis se caracteriza por la presencia de nodulaciones de 1 a 2 mm de diámetro, de color blanco-amarillento, adheridas firmemente a los pelos de la región afectada. Las nodulaciones forman cadenas irregulares que son más abundantes en el extremo distal del pelo afectado (fig. 3.29).

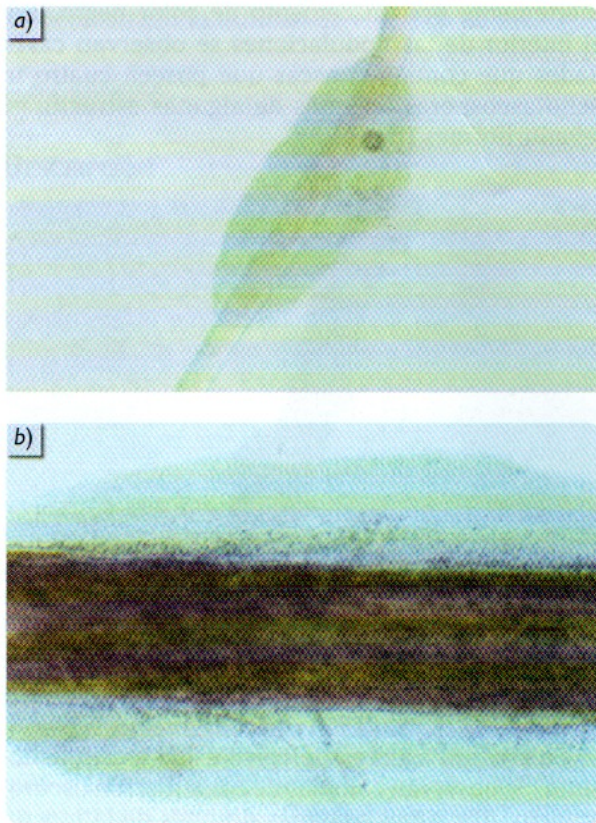


Fig. 3.29. Piedra blanca: a) conrecciones blandas alrededor del pelo, sin destrucción de la cutícula (10X) (Cortesía de R. Arenas); b) acercamiento que muestra los elementos levaduriformes (40X).

La infección es asintomática y puede pasar inadvertida por el paciente durante algún tiempo.

La frecuencia de esta micosis es baja, aunque el agente etiológico tiene una distribución muy amplia en la naturaleza, sobre todo en zonas templadas y tropicales. El hongo se ha cultivado a partir de aguas estancadas, madera en descomposición y esputo de personas sanas.

Esta infección es más frecuente en personas jóvenes y desaseadas; no muestra predominio de raza o sexo y es de bajo poder de contagio.

ESPÉCIMEN BIOLÓGICO

- Pelo.

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Examen directo. En los pelos aclarados con KOH al 15 % se observan nodulaciones formadas por un conglomerado de hifas ramificadas, hialinas, de 2 a 4 μm de diámetro, que se fragmentan y forman artroconidios redondos, rectangulares u ovoides, además de blastoconidios de 2 a 4 μm de diámetro.

Cultivo. El espécimen biológico se debe sembrar en un medio de Sabouraud simple e incubarse a 25 °C. Los cultivos se desarrollan rápidamente y en dos o tres días se tienen colonias de color blanco o beige, al principio de superficie lisa, que posteriormente se torna rugosa. La microscopía de luz muestra hifas hialinas con gran cantidad de artroconidios y escasos blastoconidios (fig. 3.30).

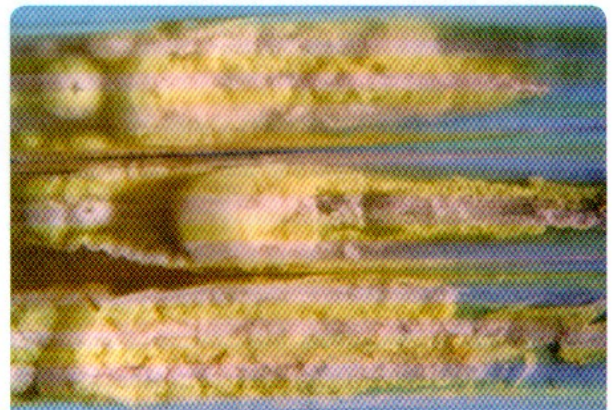


Fig. 3.30. Piedra blanca. Aspecto de la colonia de *Trichosporon* sp., colonias blanquecinas, de aspecto levaduriforme, en ocasiones vellosas.

OTOMICOSIS

DESCRIPCIÓN

Son infecciones micóticas del conducto auditivo externo (CAE) en el cual, bajo ciertas condiciones predisponentes (como vivir en zonas húmedas y cálidas, practicar con frecuencia natación, uso de prótesis auditivas, infecciones bacterianas, administración de corticosteroides y de antibióticos en forma tópica, o bien, traumatismos) se desarrolla alguno de los agentes de la biota micótica; por tanto, la etiología es variada. Los principales agentes son: *Aspergillus fumigatus*, *A. niger* (véase cap. 7), *Candida albicans*, *Scedosporium apiospermum*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Acremonium* y *Penicillium* spp (fig. 3.31).

El cuadro clínico de la otomicosis es muy variable; muchos pacientes con infecciones del CAE sólo refieren prurito e hipoacusia; otros, en cambio, refieren prurito intenso o incluso dolor. La exploración física muestra en muchos casos colonias del agente que tapizan la superficie del CAE.

ESPECÍMENES BIOLÓGICOS

- Exudado del conducto.
- Material de raspado del conducto.

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Examen directo. Se coloca la muestra entre el portaobjetos y el cubreobjetos, agregando dos gotas de KOH al 15 %. La observación microscópica pone de manifiesto los elementos fúngicos, que pueden ser levaduras, filamentos y conidios aislados, o bien cabezas aspergilaras o aparatos conidiales de *Aspergillus* o *Penicillium*, respectivamente.

BIBLIOGRAFÍA

- Arenas, R., "Dermatofitosis en México", *Rev. Iberoam. Micol.*, **19**:63, 2002.
- Arenas, R., García, J. A. y Estrada, R., "Pitiriasis versicolor: Étude de 100 cas mexicains", *Bull. Soc. Fr. Mycol. Med.*, **11**:65, 1982.
- Bonifaz, A., Gómez-Daza, F., Paredes, V. y Ponce R. M., "Tinea versicolor, tinea nigra, white piedra and black piedra", *Clin. Dermatol.*, **28**:140, 2010.
- Crespo, E. V. y Delgado, V. F., "Malassezia species in skin diseases. Curr Opinión", *Infect. Dis.*, **15**:133, 2002.
- English, M. P., "Nails and Fungi", *Brit. Dermatol.*, **94**:697, 1976.
- Guého, E., Midgley, G. y Guillot, J., "The genus *Malassezia* with description of four new species", *Antonie van Leeuwenhoek*, **69**:337, 1996.

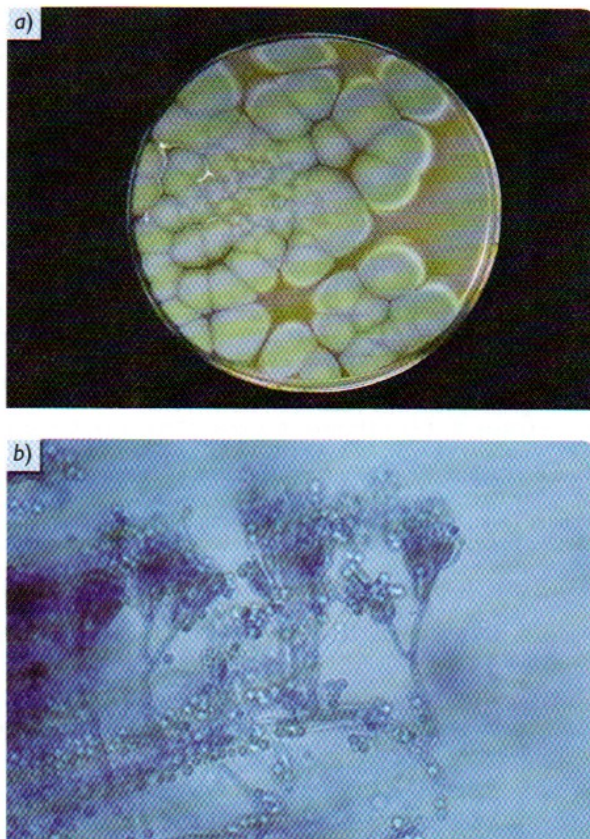


Fig. 3.31. *Penicillium* aislado de una otomicosis: a) colonias de superficie aterciopelada o pulverulenta, plana, de color verde metálico; b) micelio hialino, con conidióforos ramificados que dan lugar a metulas y sucesivamente a fiáldes con filaloconidios.

Cultivo. El producto se siembra en medio de agar dextrosa Sabouraud sin antibióticos, incubándolo a 26 °C durante un periodo de tres a cinco días, al cabo de los cuales se observan las colonias de morfología característica correspondiente a los hongos causantes de estas micosis (véase cap. 9).

Es conveniente hacer estudios seriados para evitar la confusión con una contaminación ambiental del medio de cultivo.

- Guillot, J., Guého, E., Midgley y cols., "Identification of *Malassezia* species. A practical approach", *J. Mycol. Med.*, 6:103, 1996.
- Hay, R. J., "Cutaneous and subcutaneous mycoses", en Anaisse, E. J., McGinnis, M. R. y Pfaller, M. A., *Clinical Mycology*, capítulo 22, Churchill Livingstone, EUA, 1996, pág. 456.
- Hiruma, M. y Yamaguchi, H., "Dermatophytes", en Anaisse, E. J., McGinnis, M. R. y Pfaller, M. A., *Clinical Mycology*, Churchill Livingstone, EUA, 1996, pág. 370.
- Hoog, G. S. y Guého, E., "Agents of white piedra, black piedra and tinea nigra", *Topley & Wilson's. Microbiology and Microbial Infections*, vol. IV (9a. ed.), Arnold, 2000, pág. 191.
- Kurnatowsky, P. y Filipiak, A., "Otomycosis prevalence, clinical symptoms, therapeutic procedure", *Mycoses*, 44:472, 2001.
- López-Martínez, R., "Investigación de algunas fuentes de infección en las dermatofitosis. Estudio de suelos, animales y hombres", *Gac. Méd.*, 122:167, 1986.
- López-Martínez, R., Castañón Olivares, L. R. y Rodríguez Hernández, R., "Algunos aspectos epidemiológicos de las dermatofitosis, frecuencia de infección", *Rev. Mex. Mic.*, 1:29, 1985.
- López-Martínez, R. y Rivera-Lona, M., "Investigación de dermatofitos en la piel sana de diversas regiones corporales", *Rev. Latinoamer. Microbiol.*, 26:365, 1984.
- Macotela-Ruiz, E., López-Martínez, R. y cols., "Papel patógeno de *Pityrosporum ovale* en la dermatitis seborreica y pitiriasis versicolor", *Gac. Méd.*, 123:187, 1987.
- Macotela-Ruiz, E., López-Martínez, R. y cols., "Tiña negra. A propósito de un caso diagnosticado como melanoma maligno", *Prensa, Méd.*, 43:110, 1978.
- Manzano-Gayosso, P., Méndez-Tovar, L. J., Hernández-Hernández, F. y López-Martínez, R., "Dermatophytosis in Mexico City", *Mycoses* 37:49, 1994.
- Méndez-Tovar, L. J., "Pathogenesis of dermatophytosis and tinea versicolor", *Clin. Dermatol.*, 28:185, 2010.
- Méndez-Tovar, L. J., Rangel-Piza, T. y Vega-López, F., "Piedra blanca: caso clínico", *Med. Cutan. Iber. Lat. Am.*, 24:26, 1996.
- Moyer, M. D., Balboa, C. Z. y Keller, C., "Note on culture of black piedra for cosmetic reasons", *Arch. Derm.*, 89:436, 1964.
- Núñez, E. N. y Díaz, N. C., "Otitis externa micótica. Dos esquemas terapéuticos", *Rev. Med. IMSS*, 38:467, 2000.
- Stenderup, A., Schonheyder, H., Ebbesen, P. y Melbye, M., "White piedra and *Trichosporum beigelii* carriage in homosexual men", *J. Med. Vet. Mycol.*, 24:401, 1986.
- Vaffe, A. S., "Tinea nigra palmaris resembling malignant melanoma", *New Engl. J. Med.*, 283:1112, 1970.
- Zaias, N., "Onychomycosis", en *Dermatologic clinical Symposium on the nail*, W. B. Saunders, Filadelfia, 1985, págs. 445-460.

Micosis subcutáneas

MICETOMA

DESCRIPCIÓN

El micetoma es una infección crónica de la piel y de los tejidos subyacentes con tendencia a afectar los huesos. Se caracteriza por un aumento de volumen relativamente indoloro y fístulas a través de las cuales se eliminan pus y granos, constituidos por filamentos. Los agentes causales son de origen exógeno y pueden ser hongos (eumicetoma) o bacterias (actinomicetoma).

La infección se produce por la penetración del agente etiológico a través de heridas en la piel; los agentes son saprobios y se aíslan con facilidad a partir de tierras de cultivo. Por esta característica, el padecimiento es más frecuente en jóvenes o adultos jóvenes que desempeñan actividades agrícolas, en quienes puede causar invalidez y aun la muerte en caso de no ser diagnosticados y tratados adecuadamente.

La infección puede localizarse en cualquier segmento corporal, pero se presenta con mayor frecuencia en los miembros inferiores, debido al gran número de traumatismos que sufren los campesinos en los pies por trabajar descalzos, o con calzado descubierto, durante las faenas del campo.

El micetoma es de distribución mundial; sin embargo, predomina en los países situados en el cinturón intertropical. En América se ha observado en casi todos los países, principalmente en

Brasil, Colombia y Venezuela. En México se tiene la frecuencia más elevada del continente, siendo el actinomicetoma el más comúnmente observado (97.7 %).

Los actinomicetales, causantes de micetoma, se agrupan en tres géneros con diferentes especies: *Nocardia brasiliensis*, *N. caviae*, *N. asteroides*, *Actinomyces madurae*, *A. pelletieri* y *Streptomyces somaliensis*.

El número de hongos que pueden causar micetoma es muy grande, pero los principales agentes etiológicos del eumicetoma son los siguientes: *Madurella mycetomatis*, *M. grisea*, *Pyrenochaeta romeroi*, *Scedosporium apiospermum*, *Leptosphaeria senegalensis*, *Acremonium kiliense*, *A. recifei* y *A. falciforme*.

ESPECÍMENES BIOLÓGICOS

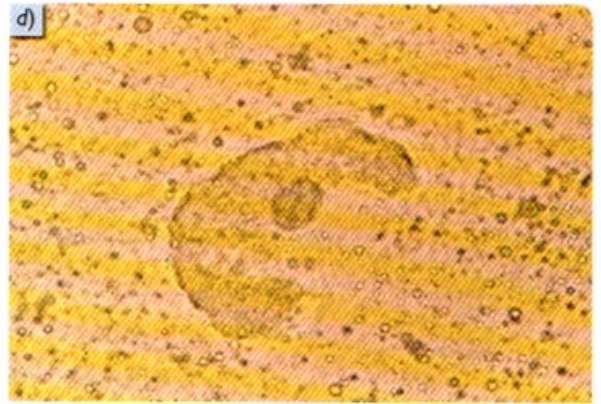
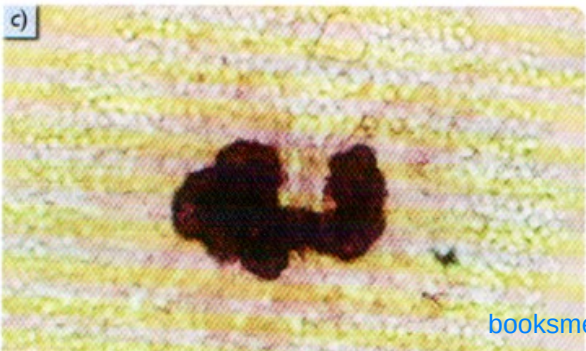
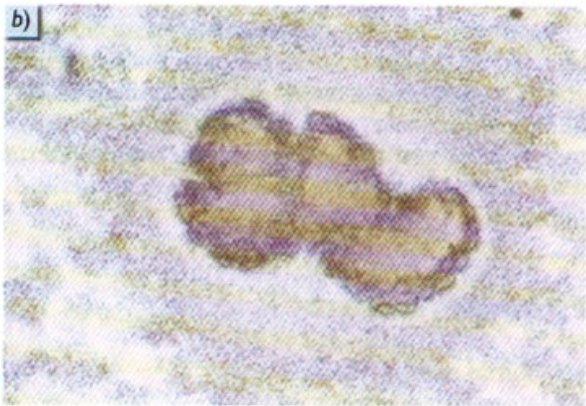
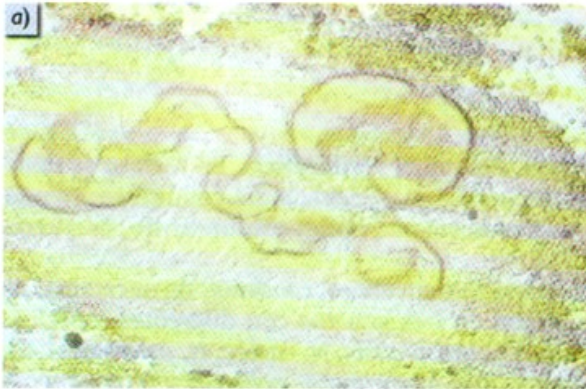
- Material seropurulento.
- Material obtenido por biopsia.

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Examen directo. Se realiza a partir del material que drena por la fístula, el cual contiene los granos que, dependiendo del género y la especie, presentan características que permiten determinar el tipo de micetoma y una aproximación taxonómica del

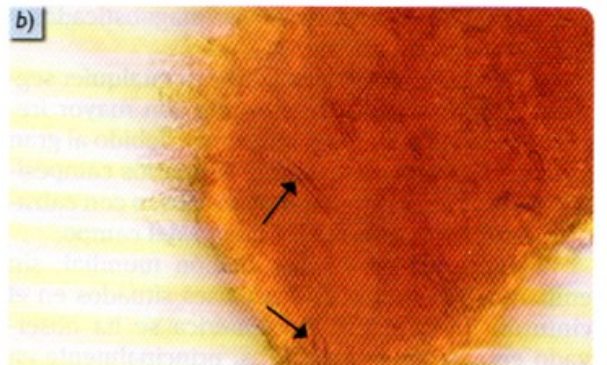
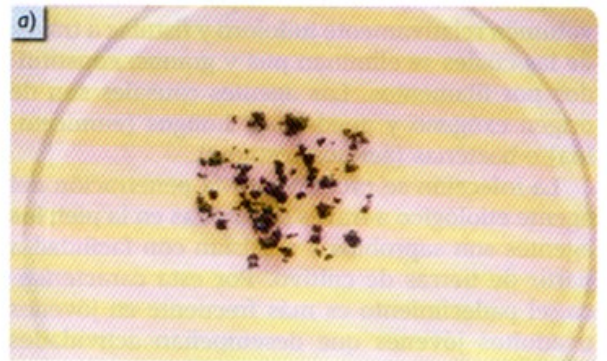
agente etiológico. En la mayoría de los casos, los granos son microscópicos, por lo que para visualizarlos mejor se agrega una gota de solución de KOH al 15 % o cualquier colorante simple, como la eritrosina o azul de algodón. Los granos del género *Nocardia* son de color amarillento en forma de riñón constituidos por elementos bacilares finos y rodeados de clavos, en la mayoría de los casos (fig. 4.1).

Fig. 4.1. Granos de micetoma por *Nocardia* sp. Examen directo: a) granos de color amarillento, en forma de riñón, rodeados de gran cantidad de piocitos (25X); b) granos con clavos periféricos (40X); c) grano teñido con eritrosina; d) grano observado a través de un filtro de color en el que se aprecian claramente las clavos en la periferia.



Los granos eumicéticos son de mayor tamaño que los actinomicéticos, pueden ser observados a simple vista en el material patológico y están constituidos por hifas gruesas y vesiculosas; la mayoría de ellos están unidos por un cemento intersticial, como los de *M. mycetomatis*, *M. grisea*, *S. apiospermum*, *P. romeroi*, *A. kiliesi* y otros (fig. 4.2).

Fig. 4.2. Granos eumicéticos (*Madurella mycetomatis*): a) aspecto macroscópico donde se ven granos grandes, de color oscuro; b) aspecto microscópico donde se observan los filamentos gruesos y septados que lo forman.



Algunos agentes de actinomicetoma producen también granos macroscópicos; tal es el caso de los micetomas por *Actinomadura madurae*. Se debe poner especial atención en el diámetro de los filamentos, pues cuando este es menor de 1 micra, se trata de un actinomicetoma y, cuando el diámetro del filamento es de 3 micras o más, es un grano de eumicetoma; esto es muy importante, ya que los medios de cultivo y el tratamiento serán diferentes para cada tipo de micetoma.

Frotis. Se realiza a partir de los exudados, los cuales, en caso de contener granos demasiado grandes, deben fragmentarse con ayuda de un mortero y solución salina, o bien, a partir de los cultivos. Esta técnica permite conocer la afinidad tintorial del agente etiológico y visualizar con mayor detalle los filamentos que constituyen los granos. Las técnicas de tinción más empleadas para los actinomicetales son las de Fite de Kinyoun y la de Gram para todo tipo de agentes.

Cultivo. En el caso de que los granos hayan sido obtenidos del exudado de las fístulas, éstos deberán lavarse con solución salina isotónica varias veces, hasta limpiarlos, para poder sembrarlos, aunque siempre será preferible realizar el cultivo a partir de los granos obtenidos del centro de una pieza de biopsia, los cuales no necesitarán ser lavados para obtener un cultivo puro. Los granos formados por actinomicetales se deben sembrar en uno o varios de los siguientes medios: agar sangre, infusión cerebro-corazón, medio de Lowenstein Jensen y Sabouraud simple con extracto de levadura; los cultivos se incubarán en aerobiosis a 37 y 25 °C (figs. 4.3 y 4.4).

Fig. 4.3. Colonias de actinomicetales causantes de micetoma. De izquierda a derecha: *A. madurae*, *A. pelletieri* y *S. somaliensis*. Se observa la variabilidad de color, forma y aspecto de la colonia.

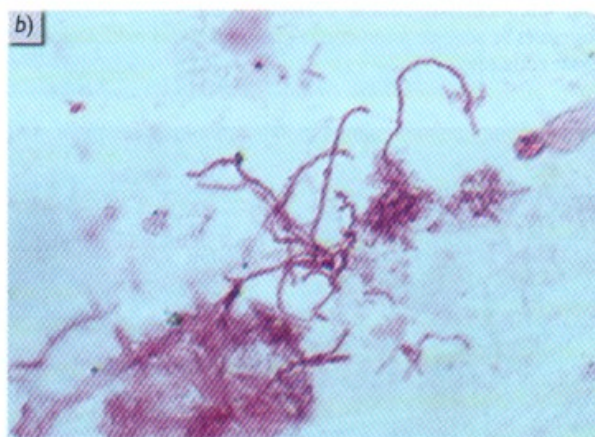
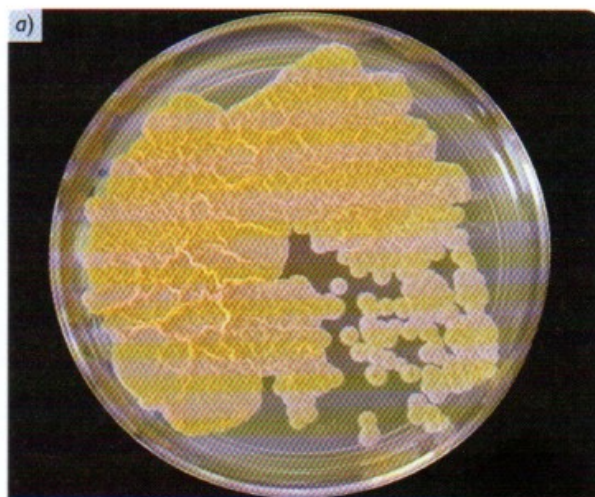
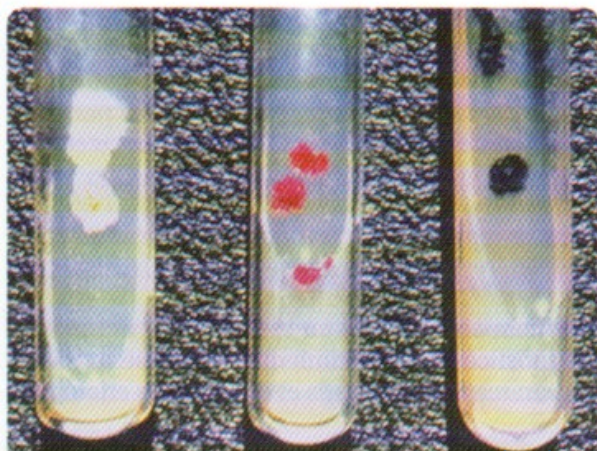


Fig. 4.4. *Nocardia brasiliensis*: a) colonia de aspecto ceráceo, de superficie rugosa, blanca amarillenta o naranja; b) bacilos filamentosos, finos, a partir de una colonia (tinción de Fite).

En la figura 4.3 se muestran los diferentes aspectos y coloraciones de los actinomicetales patógenos. *Nocardia brasiliensis*, el más frecuente de los agentes de actinomicetoma, se muestra en la figura 4.4. Si los granos provienen de un caso de eumicetoma, se sembrarán en medios de Sabouraud simple y con antibióticos y se incubarán a 25 °C en aerobiosis. La morfología colonial de estos hongos es muy variable (fig. 4.5); *M. mycetomatis* es uno de los principales agentes de eumicetoma (fig. 4.6).

Pruebas especiales. En los casos de actinomicetoma, el estudio de las características macroscópicas y microscópicas de los granos y de los cultivos no conduce a un diagnóstico etiológico preciso de género y especie. Para diferenciar *N. brasiliensis*



Fig. 4.5. Aspecto colonial de diferentes agentes de eumicetoma, en los cuales se pone de manifiesto la gran variabilidad morfológica que existe entre ellos.

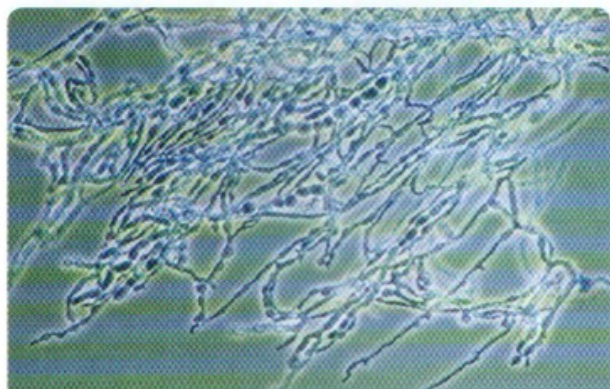


Fig. 4.6. *Madurella mycetomatis*. Aspecto microscópico del cultivo en Sabouraud simple. Se observa micelio de hifas tortuosas, con gran cantidad de células vesiculosas y algunos clamidoconidios.

sis de *N. asteroides* son de gran utilidad las pruebas de hidrólisis de la caseína (fig. 4.7) y de crecimiento en gelatina al 0.4 % (fig. 4.8). Para el resto de los actinomicetos se recurre a estas pruebas, así como a la descomposición de la xantina, hipoxantina y tirisona.

En el cuadro 4.1 se presentan las principales pruebas fisiológicas empleadas para diferenciar a los más importantes géneros y especies de actinomicetales.

En el caso de los agentes de eumicetoma, el estudio morfológico nos permite identificar claramente las diferentes especies. Cuando existen dudas, se puede recurrir a otras pruebas como el API-20, el

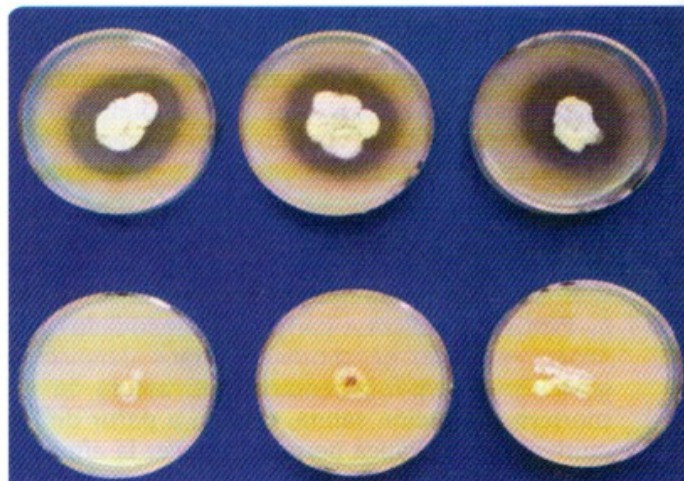


Fig. 4.7. Hidrólisis de caseína. En la parte superior se observan pruebas positivas en *N. brasiliensis* y en la parte inferior pruebas negativas en *N. asteroides*.

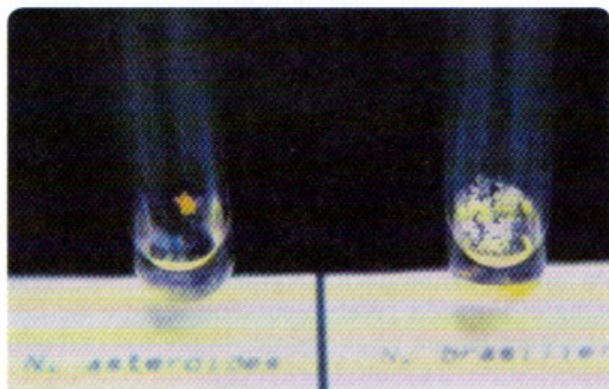


Fig. 4.8. Crecimiento en gelatina al 0.4%: a la derecha, prueba positiva en la que se muestra crecimiento de *N. brasiliensis*; a la izquierda, prueba negativa con *N. asteroides*.

API-32 y VITEK (utilización de azúcares). Se ha probado también la utilidad del sistema API-ZYM, el cual consiste en una galería de sustratos que pone en evidencia la presencia de 19 enzimas diferentes en un cultivo; la lectura se hace por comparación del cambio de color de cada pozo con un patrón proporcionado por el fabricante (fig. 4.9).

Serología. En la actualidad es de poca utilidad para el diagnóstico, ya que no se ha logrado la obtención de buenos antígenos para realizar las pruebas.

Histopatología. Es un estudio muy útil para el diagnóstico del padecimiento: con él se logra, en la gran mayoría de casos el diagnóstico etiológico,

Cuadro 4.1. Pruebas de laboratorio empleadas para la clasificación taxonómica de los actinomicetales.

Actinomicetal	Crecimiento en gelatina	Hidrólisis de la gelatina	Ácido resistencia	Descomposición de:				Ácido a partir de:		
				Caseína	Tirosina	Xantina	Hipoxantina	Lactosa	Xilosa	Arabinosa
<i>N. brasiliensis</i>	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
<i>N. asteroides</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>N. caviae</i> ***	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-
<i>A. madurae</i>	NU*	+	-	+	++	-	+	+	+	+
<i>A. pelletieri</i>	NU	+	-	+	+	-	+	-	-	-
<i>S. somaliensis</i>	NU	+	-	+	+	-	-	-	-	-

*No utilizado.

**Más de 25 % de las cepas.

***Complejo *N. Otitidiscaviarum*.

Tomado y modificado de Bert, D. (1) y de González-Mendoza y F. Mariat (11).

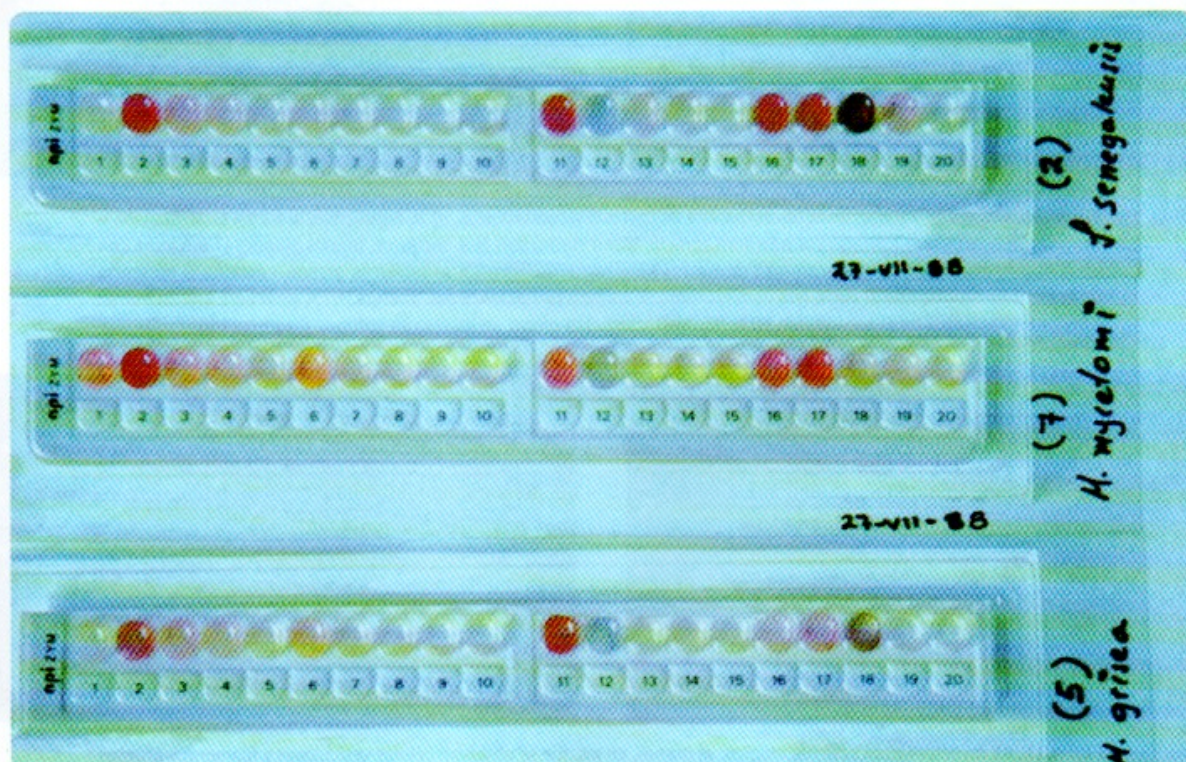


Fig. 4.9. Prueba de API-ZYM. Patrones enzimáticos característicos en algunos agentes de eumicetoma.

ya que muchos de los agentes del micetoma presentan una morfología y afinidad tintorial características (fig. 4.10).

En los cuadros 4.2 y 4.3 se presentan las principales características de las bacterias y de los hongos causantes de micetoma.

En el caso de los eumicetomas, el diagnóstico etiológico preciso en ocasiones no es posible realizarlo debido a que existe un gran número de agentes con gran variedad en la morfología de los granos, y en muchos casos el cultivo suele ser negativo (figs. 4.11).

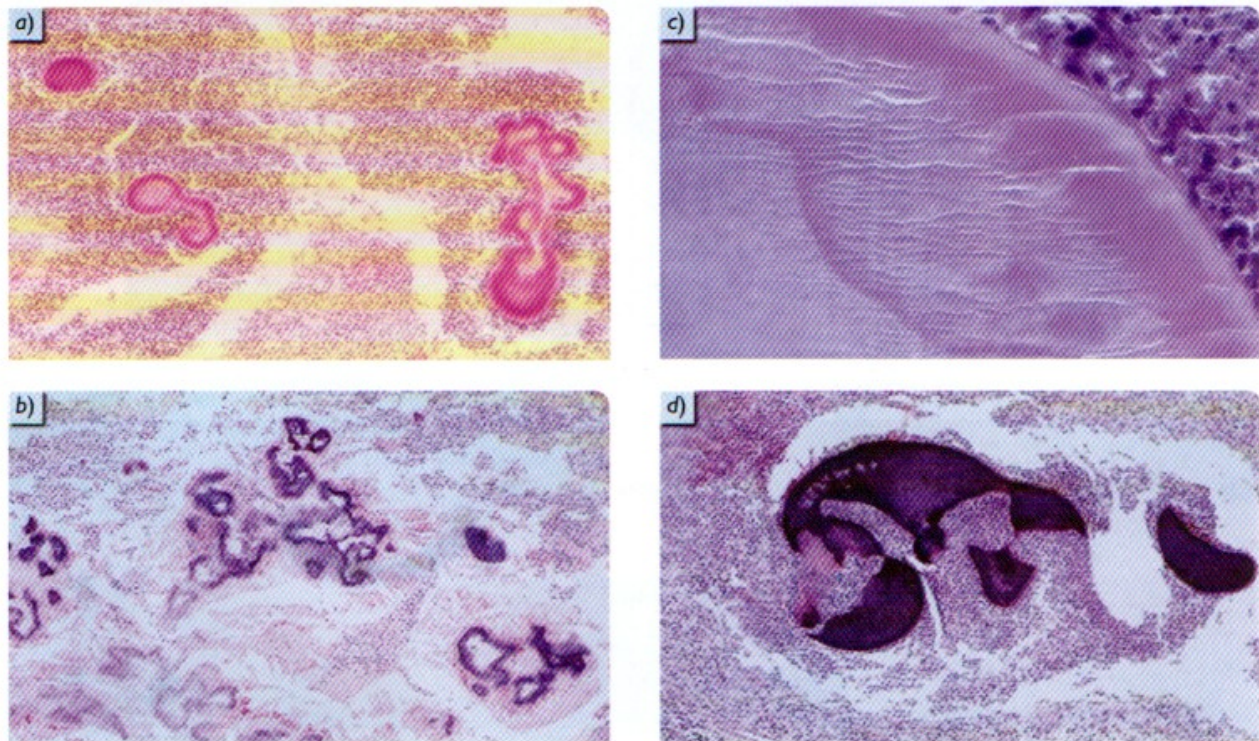


Fig. 4.10. Grupos de agentes de actinomicetoma en cortes histopatológicos: a) *N. brasiliensis*, la forma es arriñonada o irregular, centro claro y rodeado por una gran zona de hipercelularidad; b) *A. madurae*, granos grandes (1 a 5 mm), con un contorno cartográfico y gran cantidad de zonas vacías en su interior; c) *S. somaliensis*, granos redondos, la presencia de cemento ocasiona que al corte con el micrótopo se formen estriaciones por fractura; d) *A. pelletieri*, granos que se tiñen intensamente con el predominio en la periferia y semejan piezas de un cuerpo redondo fragmentado.

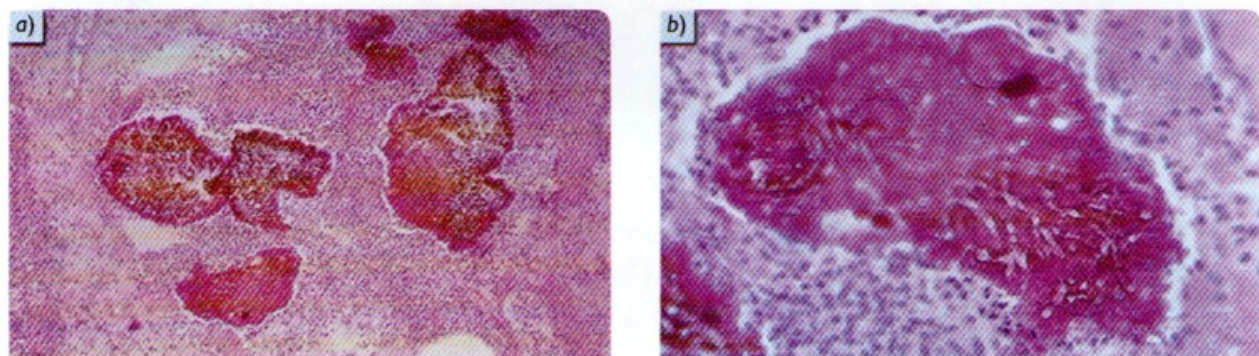


Fig. 4.11. *M. mycetomatis*. Corte histológico: a) granos, en los que se observan células vesiculosas y filamentos gruesos (10X); b) acercamiento de un grano en el cual los filamentos son más evidentes, observándose espacios vacíos (25X). Todos los granos están rodeados de gran cantidad de células inflamatorias.

Cuadro 4.2. Características de los agentes de actinomycetoma.

<i>Agente</i>	<i>Examen directo</i>	<i>Histopatología</i>	<i>Cultivo</i>	<i>Examen de cultivo</i>
<i>N. brasiliensis</i> <i>N. asteroides</i> <i>N. caviae</i>	Granos que miden entre 150 a 500 μm , blandos, lobulados, ocasionalmente con clavos en la periferia, de color amarillento	Granos arriñonados o vermiformes, formados por filamentos finos menores de 1 μm de diámetro	Colonias rugosas, de aspecto y consistencia cerácea de color blanco amarillento o anaranjado, se desarrollan en dos o tres semanas	Filamentos finos, cortos o largos, con ramificaciones en número variable, formados por elementos bacilares o cocoides, con ácido alcohol resistencia parcial, con un diámetro menor de 1 μm
<i>A. madurae</i>	Granos de 1 a 5 mm de diámetro, de color blanco, amarillento, lobulados y de consistencia blanda, algunos son de color rosado	Granos que se tiñen intensamente en la periferia, con aspecto cartográfico; el centro del grano es irregular. En la periferia se observan filamentos largos, algunas veces con un material eosinofílico	Crecimiento moderadamente rápido, de aspecto celebriforme o membranoso, de color beige o ligeramente rosado	Filamentos largos, ramificados, de diámetro menor a 1 μm ; se observan cadenas de esporas esféricas. Los filamentos son grampositivo y no ácido alcohol resistentes
<i>A. pelletieri</i>	Granos de 200 a 500 μm de diámetro, de color rojo coral, de consistencia dura, redondos u ovalados	Granos de forma oval u esférica, fijan intensamente el colorante de manera homogénea, se observan fragmentados y dan la imagen de "plato roto"	Colonias de crecimiento muy lento, al inicio de color blanco, después rosado y por último rojo cereza, de aspecto granuloso	Colonias formadas por filamentos finos, constituidos éstos por elementos bacilares; no presentan ácido alcohol resistencia
<i>S. somaliensis</i>	Granos de 250 μm a 2 mm, redondos o multilobulados, de consistencia dura, el color es amarillo o marrón	Granos de forma oval, con estrías paralelas causadas al ser cortados por el microtomo, ya que son muy duros	Colonias de crecimiento moderadamente rápido, de 10 a 15 días, de color beige con manchas oscuras en la superficie, son de aspecto ceráceo	Filamentos finos, no se observan fragmentaciones, presentan cadenas de esporas, son grampositivo y no presentan ácido alcohol resistencia

Tomado y modificado de Mariat, F. (22).

Cuadro 4.3. Características de los agentes de eumicetoma.

Agente	Examen directo	Histopatología	Cultivo a 25 °C	Examen de cultivo
<i>N. mycetomatis</i>	Granos de 0.5 a 1 mm, negros, redondos o lobulados, duros y quebradizos; se observan filamentos de 2 a 5 µm de diámetro	Granos de dos tipos: 1. Compactos, homogéneos, bilobulados o multilobulados; filamentos septados y ramificados. 2. Vesiculosos, regulares, de bordes netos y vesículas en la periferia, de 6 a 20 µm de diámetro	Crecimiento lento, colonias blancas y vellosas al inicio, después toman un pigmento marrón oscuro que difunde al medio, superficie plana o convexa. En medios pobres se observan esclerotes; crece bien a 37 °C	Filamentos septados y ramificados, con vesículas color marrón. En cultivos viejos, conidios piriformes en número reducido y fiálides con collaretes
<i>M. grisea</i>	Granos negros, redondos o lobulados, de 1 mm de diámetro aproximadamente; blandos al principio y después muy duros	Granos ovalados, reniformes o vermiformes filamentos densos, de aspecto hialino; el centro es vesiculoso y son muy pigmentados en la periferia	Crecimiento lento, planas en la periferia y centro cerebriforme; superficie aterciopelada, de color verde grisáceo y esclerotes, escaso o ningún crecimiento a 37 °C	Filamentos septados, fuliginosos, de 1 a 3 µm de diámetro, no presentan conidiación de ningún tipo, sólo clamidoconidios
<i>P. romeroi</i>	Igual a <i>M. grisea</i>	Igual a <i>M. grisea</i>	Crece moderadamente rápido, colonias planas lanoso-algodonosas en el frente, inicialmente blancas y posteriormente verde-grisáceas, reverso oscuro	Filamentos pigmentados; se observan picnidios (con fiálides y conidios en el interior), conidios de ovals o alargados y ligeramente curvos
<i>L. senegalensis</i>	Granos negros, redondos o multilobulados, de 1 mm de diámetro en promedio	Granos redondos o multilobulados, de bordes dentados formados por filamentos vesiculosos, septados, con cemento más abundante en la periferia	Colonias de crecimiento rápido, color blanco grisáceo al principio, después marrón, producen pigmento rojo que difunde al medio	Hifas hialinas o marrón, con escasos clamidoconidios. En medios pobres se observan peritecios o cleistotecios de color negro, que miden de 100 a 300 µm de diámetro
<i>S. apiospermum</i>	Granos blandos, de color blanco, reniformes u ovals, sin cemento, miden de 1 a 2 mm de diámetro	Granos reniformes u ovals, formados por hifas hialinas de 5 µm de diámetro, se observan células vesiculosas de 10 a 15 µm de diámetro sin cemento	Cultivos de crecimiento rápido, de color blanco o ligeramente gris, de superficie plana y vellosa	Se observan filamentos hialinos, conidióforos y aneloconidios ovoides o piriformes, que al teñirlos de azul de algodón se observa la periferia con gran afinidad tintorial y el centro claro

Tomado y modificado de Mahgoub, E. S. (21).

ESPOROTRICOSIS

DESCRIPCIÓN

Es una micosis subcutánea, subaguda o crónica, causada principalmente por un hongo dimórfico llamado *Sporothrix schenckii*. No obstante, por estudios moleculares, se ha determinado que hay otras especies de *Sporothrix*, las cuales no se pueden diferenciar por estudios morfológicos, tales como *S. globosa*, *S. albicans*, *S. inflata*, *S. luriei*, *S. brasiliensis* y *S. mexicana*.

Sporothrix schenckii es la especie más frecuente como causa de esporotricosis y es un hongo saprofito facultativo con amplia distribución mundial, que se aísla del suelo, de la madera y de las plantas espinosas (rosas, bugambilias, etc.), por lo que la micosis se presenta con frecuencia en jardineros, floristas, empacadores de loza, amas de casa y en niños que juegan entre las plantas. La esporotricosis se distribuye mundialmente, aunque predomina en México, Centroamérica y América del Sur.

Estos hongos, al penetrar en el hospedero a través de una herida en la piel, causan la esporotricosis subcutánea y, al penetrar por inhalación de los conidios, causan la esporotricosis pulmonar, que posteriormente se puede diseminar en forma sistémica. De esta manera la esporotricosis se divide, desde el punto de vista clínico, en cutánea y extracutánea. La gravedad de la micosis depende en gran parte del estado inmunológico del paciente.

En la esporotricosis subcutánea primaria, el cuadro clínico es polimorfo y puede presentarse en cualquiera de las siguientes formas: linfangítica y fija.

Linfangítica. Se manifiesta por lesiones que siguen el trayecto de los vasos linfáticos y que se inicia como una pápula en el sitio de inoculación; después se transforma en un nódulo, el cual se ulcera y presenta tendencia a la cicatrización. Después de la primera lesión (chancro de inoculación) se inflama el trayecto del vaso linfático, apareciendo lesiones ascendentes "en escalera" a lo largo del vaso linfático con las mismas características descritas. Esta es la forma clínica que se presenta con mayor frecuencia.

Fija. Se presenta una lesión única en el sitio de inoculación, cuyo aspecto puede adoptar alguna de las siguientes formas: en placa, ulcerosa, verrugosa, ulceroverruginosa y acneiforme. En esta forma clínica la lesión crece en extensión, pero no se disemina a otras partes de la piel. La esporotricosis

extracutánea puede afectar a muchos tejidos; las siguientes son las formas más frecuentes de presentación:

Pulmonar primaria. Es un cuadro clínico de muy baja frecuencia. Se adquiere por la inhalación de conidios de la fase micelial del hongo y la sintomatología que se presenta es muy similar a la de una tuberculosis, causando en ocasiones lesiones cavitarias que se inician como bronquitis o neumonitis, acompañadas de fiebre y malestar general.

Ósea. Hay lesiones osteolíticas en uno o varios huesos, que afectan principalmente la tibia, el carpo, el metatarso, el radio y el fémur. Casi siempre ocurren a continuación de una esporotricosis pulmonar primaria.

Artritis. Es relativamente frecuente. Presenta inflamación, dolor, incapacidad de movimiento y destrucción de la articulación con tendosinovitis. Las articulaciones más afectadas son las metacarpianas y las falángicas.

Hematógena. Es rara, pero cuando se disemina por esta vía aparecen en diversos sitios de la piel y mucosas lesiones ulcerogomosas distantes entre sí.

ESPECÍMENES BIOLÓGICOS

- Pus de lesiones cutáneas.
- Exudados.
- Material obtenido por biopsia.
- Material obtenido por punción.
- Esputo.

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Examen directo. No es útil para esta micosis, ya que el parásito se visualiza difícilmente cuando solamente se agrega a la preparación solución salina o KOH.

Frotis. Con las tinciones de PAS o de Grocott, en algunos casos se observan escasas levaduras redondas, ovoides o alargadas.

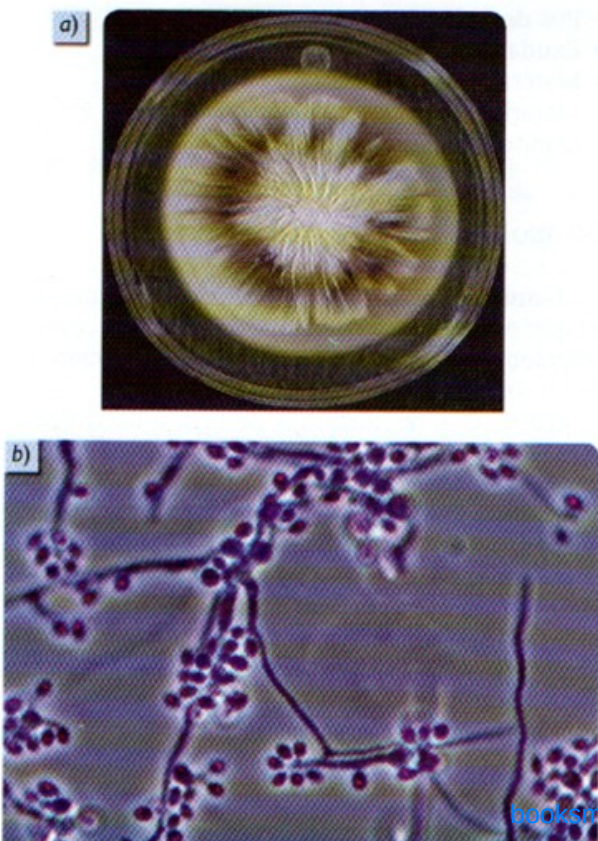
Cultivo. Es el método más eficiente para el diagnóstico y se realiza en medio de Sabouraud con antibióticos a partir del pus y el esputo, los cuales se sembrarán directamente. Las piezas de biopsia se dividen en dos partes: una se fijará y se empleará en el estudio histopatológico y la otra se macerará en un mortero estéril con solución salina isotónica para sembrarla posteriormente.

Los cultivos se incuban a 25 °C y pasados tres a seis días de la siembra se inicia el desarrollo de colonias de color blanco. Después de un periodo de 10 a 15 días, éstas toman un color marrón claro que se torna cada vez más oscuro, llegando a ser casi negro en un periodo de 30 a 45 días. La superficie de las colonias bien desarrolladas presenta estriaciones que parten del centro hacia la periferia. La mayoría de las colonias presenta una elevación central, lo que junto con las estriaciones produce un aspecto crateriforme (fig. 4.12a).

El examen microscópico de la colonia demuestra un micelio fino, formado por hifas de 1 a 2 µm de diámetro, con conidióforos de dimensiones variables que presentan acúmulos de microconidios de dos tipos:

1. Unicelulares, de hialinos a marrón, ovales, de pared delgada y típicamente agrupados sembrando rosetas en los extremos de los conidióforos (fig. 4.12b).

Fig. 4.12. *S. schenckii*: a) colonias blancas y otras que se tornan oscuras con el tiempo; superficie membranosa, con estriaciones radiales y elevación central; b) micelio fino, septado, con gran cantidad de microconidios que se originan directamente de las hifas, o bien, a partir de conidióforos cortos (simpoduloconidios) que en ocasiones da una imagen característica de "flor de margarita".



2. Aleuroconidios color marrón, ovales o triangulares, de pared gruesa, sésiles y unidos lateralmente a la hifa, presente sólo en primoaislamientos (fig. 4.13).

Pruebas especiales. La morfología macroscópica y microscópica de las colonias es, en la mayoría de los casos, muy característica y suficiente para establecer el diagnóstico etiológico. Sin embargo, en ocasiones se aíslan cepas que no producen pigmento y en donde las estructuras conidiógenas pueden no ser las típicas. Se recurre entonces a la transformación in vitro de la fase micelial a la fase levaduriforme (parasitaria), la cual se obtiene sembrando un fragmento de la colonia en medios enriquecidos, como el de infusión cerebro-corazón o el de agar sangre incubada a 37 °C. La colonia de *S. schenckii* en la fase levaduriforme toma un aspecto cremoso de color amarillento, en la que se pueden observar blastoconidios alargados de 4 a 6 µm de diámetro, con algunos fragmentos de micelio. La especie *luriei* produce levaduras gemantes, grandes, a menudo septadas, las cuales no tienen la capacidad de asimilar la creatina ni la creatinina.

Pruebas inmunológicas. Las más importantes son las pruebas serológicas y la intradermorreacción.

Serología. Las pruebas serológicas son útiles en aquellos casos de esporotricosis diseminada, en los cuales no es fácil la obtención de productos biológicos para hacer el aislamiento. Entre las pruebas más útiles se encuentran las siguientes:

1. Aglutinación de células levaduriformes en tubo. Se considera positiva cuando el suero del paciente provoca aglutinación con dilución de 1: 40 o mayor, y es positiva en 100 % de los casos de esporotricosis.
2. Aglutinación de partículas de látex. Se considera positiva a los mismos títulos que la anterior.
3. Inmunodifusión. Es positiva sólo en 80 % de los casos de esporotricosis.
4. Inmunofluorescencia. Su positividad es igual a la mostrada por la técnica de aglutinación de células levaduriformes.

Intradermorreacción. Se pueden emplear dos tipos de antígenos, uno obtenido del filtrado de cultivo de la fase micelial, llamado polisacarídico y el

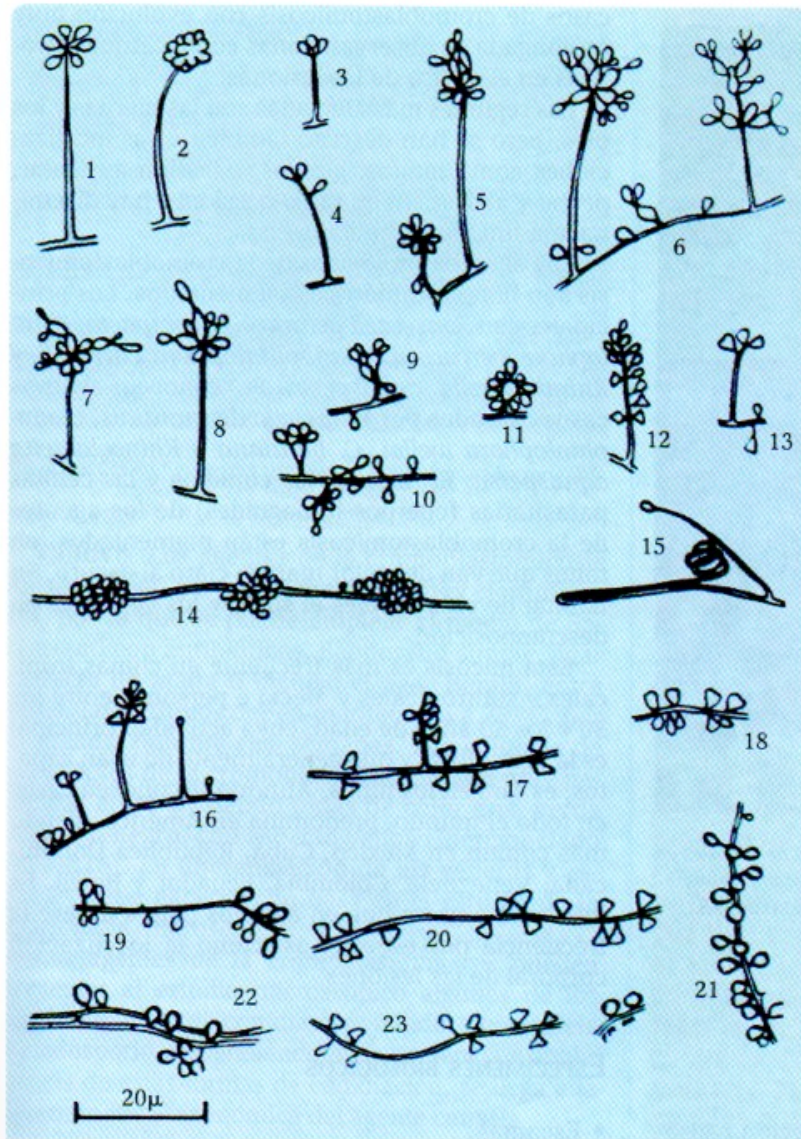


Fig. 4.13. *S. schenckii*. Representación de diversas formas y disposiciones de los conidios y conidióforos descritos. (Cortesía de F. Mariat.)

otro llamado levaduriforme, obtenido a partir de una suspensión de levaduras inactivadas crecidas en cultivos enriquecidos. Para ambos antígenos se realiza la misma técnica, que consiste en la aplicación de 0.1 ml de esporotricina vía intradérmica; la lectura se hace a las 24 y 48 horas. Se considera positiva si aparece una zona de induración igual o mayor a 5 mm; esta induración está rodeada de una zona de eritema de dimensiones variables.

El antígeno polisacárido, en caso de provocar una reacción positiva, tiene valor diagnóstico de la

enfermedad, ya que la reacción se negativiza algunos meses después de la curación de la esporotricosis. El antígeno de la fase levaduriforme sólo nos indica una exposición previa sin ser diagnóstico del padecimiento; por tanto, este antígeno se emplea en encuestas epidemiológicas.

Histopatología. En muchos de los casos, el estudio histopatológico no revela las estructuras parasitarias del hongo, aunque en muy contadas ocasiones, con las técnicas de Grocott o de PAS, se observan levaduras alargadas o redondas de 5 μ m de diámetro. A veces estas levaduras están rodeadas de una gran reacción inflamatoria y cuya tinción con hematoxilina-eosina presenta radiaciones con un aspecto de estrella; a estas estructuras se les conoce con el nombre de *cuerpo asteroide*, no siendo éstas patognomónicas de esporotricosis, ya que se les puede encontrar en otras imágenes histopatológicas a cuerpo extraño.

En ocasiones también es posible observar, aunque en muy escaso número, levaduras alargadas llamadas "cuerpos en cigarro", ya descritas anteriormente. No obstante, lo más común es observar un infiltrado inflamatorio con formación de granulomas y células gigantes, que ante un cuadro clínico de esporotricosis sugiere el

diagnóstico de esta entidad.

Inoculación en animales. Es una técnica que se emplea con fines diagnósticos cuando por ninguna de las anteriores puede demostrarse el hongo. Con el pus obtenido de las lesiones se inocula al cobayo vía intratesticular; en caso positivo, pasados siete a 10 días, se aprecia una orquitis y en la observación microscópica de los frotis hay una gran cantidad de levaduras alargadas de 4 a 6 μ m de longitud y 1 μ m de diámetro, que se observan fácilmente al realizar una impronta y tinción de Gram (fig. 4.14a). En los cortes histológicos del órgano inoculado se pueden observar los cuerpos asteroides (fig. 4.14b).

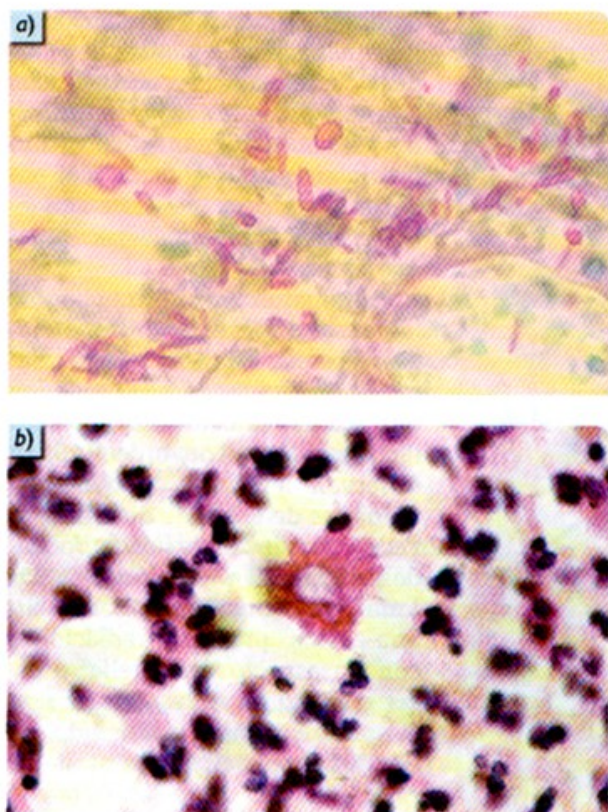


Fig. 4.14. Fase parasitaria de *S. schenckii*. Obtenidas de animales de experimentación, se observan levaduras en forma de cigarro y otras redondas: a) frotis teñido con PAS; b) histopatología teñida con PAS.

CROMOBLASTOMICOSIS

DESCRIPCIÓN

La cromoblastomycosis es una infección causada por algunos hongos dimórficos del grupo de los dematiáceos. Es de evolución lenta y duración prolongada. Se localiza en la piel y en el tejido subcutáneo, diseminándose más en extensión que en profundidad. Los agentes causales penetran a través de la piel por inoculación traumática.

Gradualmente se desarrolla una respuesta hiperplásica caracterizada por la formación de nódulos cutáneos eritematosos, verrugosos y posteriormente pediculados, de 1 a 3 cm por arriba de la piel, a manera de vegetación, los cuales frecuentemente tienen el aspecto de coliflor. A medida que evolucionan las lesiones, aparecen ulceraciones de aproximadamente 1 a 3 cm de diámetro, cubiertas de material hemopurulento, y en algunos

casos de cromoblastomycosis con evolución muy prolongada se observan zonas con cicatrices atróficas en el centro de las lesiones.

Las regiones más afectadas son las piernas y los pies, pero se han descrito también otras localizaciones como manos, glúteos, pabellón auricular, pecho y abdomen; en raras ocasiones hay diseminación linfática o hematógena.

Los agentes etiológicos de la cromoblastomycosis son hongos dimórficos pigmentados. Los principales son *Fonsecaea pedrosoi*, *F. compacta*, *Phialophora verrucosa*, *Cladophialophora carrionii* y *Rhinocladiella aquaspersa*. Se conocen algunos casos causados por *Wangiella dermatitidis*, *Cladophialophora ajelloi*, *C. bantiana* y *Rhinocladiella aquaspersa*. El micelio, los conidios y las células parasitarias (cuerpos fumagoides) de los agentes de la cromoblastomycosis están pigmentados, en tonos que van del color marrón claro al oscuro. Su hábitat de vida libre es el suelo y los vegetales en descomposición.

Esta micosis es más frecuente en climas tropicales y subtropicales y afecta a personas entre los 30 y los 50 años de edad, cuya actividad principal es la agricultura y que generalmente no usan zapatos; es rara en los niños. Aunque se conocen casos en todo el mundo, predomina en América, siendo más común en México, Cuba, República Dominicana, Venezuela, Colombia, Ecuador y Brasil. Es interesante notar que en algunos países difiere la frecuencia por especie, así como la localización corporal de las lesiones.

ESPECÍMENES BIOLÓGICOS

- Escamas.
- Material hemopurulento.
- Material de biopsia.

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Examen directo. En las preparaciones de escamas o material hemopurulento aclaradas con KOH se observan las células muriformes o fumagoides (*cuerpos de Medlar*), que son estructuras redondeadas de 4 a 15 μ m, de pared gruesa y color marrón, con o sin divisiones y que pueden estar en grupos o aisladas (fig. 4.15). Los mejores sitios para tomar la muestra son los puntos negros que aparecen en la superficie de las lesiones.

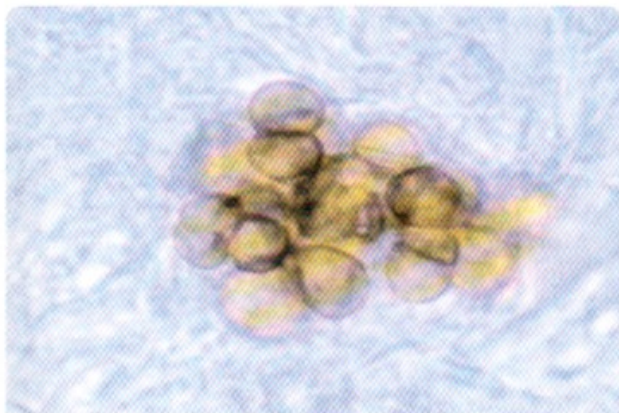


Fig. 4.15. Células fumagoides septadas, en escamas aclaradas con KOH.

Cultivo. Los agentes de la cromoblastomycosis no se inhiben por la cicloheximida o el cloranfenicol, por lo que se puede emplear el medio de Sabouraud con antibióticos, Sabouraud simple, agar extracto de malta o incluso el agar Borelli, entre otros. Los cultivos deben mantenerse a 25 °C, por lo menos, durante seis semanas. Las colonias de los agentes de la cromoblastomycosis son muy parecidas entre sí, siendo todas de color gris, verde oscuro o negro, con aspecto vellosito aterciopelado (fig. 4.16). La diferenciación de los géneros y especies debe hacerse con base en el estudio de la morfología microscópica.

Los agentes de la cromoblastomycosis pueden presentar al estudio microscópico algunos de los siguientes tipos de conidiación: fiálide, rinocladiela y cladosporio. Dependiendo de la presencia y abundancia de estas formas de conidiación, se llega a la determinativa taxonómica del agente causal.

Tipo fiálide. Corresponde a una célula conidiógena llamada fiálide, que puede ser terminal o lateral a la hifa. Generalmente tiene forma de botella o frasco, corta o alargada con base redonda, oval o elongada y un cuello estrecho con una abertura que posee un collarite. Los conidios se forman en el ápice de la fiálide y se expulsan a través del cuello, dando la apariencia de "flores en un vaso". Los conidios son ovales, hialinos y de pared lisa sin cicatriz de unión (fig. 4.17).

Tipo rinocladiela. Los conidióforos son simples y frecuentemente no difieren de la hifa vegetativa. Se producen conidios ovales en los extremos y a los lados de los conidióforos. Generalmente son únicos y no geman. Cuando se desprenden los co-



Fig. 4.16. Aspecto macroscópico de algunas colonias de agentes de cromoblastomycosis. Arriba: *P. verrucosa*; abajo, izquierda: *F. pedrosoi*; abajo, derecha: *C. carrionii*.



Fig. 4.17. Fiálides de *P. americana*. En un examen microscópico del cultivo se observan células conidiógenas en forma de botella, elementos característicos. Nótese la reproducción y presencia de conidios ovales en el extremo de éstos.

nidios se observa una pequeña cicatriz de unión tanto en el conidio como en el conidióforo. Las hifas, conidios y conidióforos son de color marrón pálido (fig. 4.18).

Tipo cladosporio. Existen dos variedades: corto y largo. En ambos, nace de la hifa conidiógena un tallo simple, que sirve como conidióforo, ligeramente alargado en el extremo distal en el que se forman dos o más conidios, de los que a su vez se generan otros conidios secundarios. En la varie-

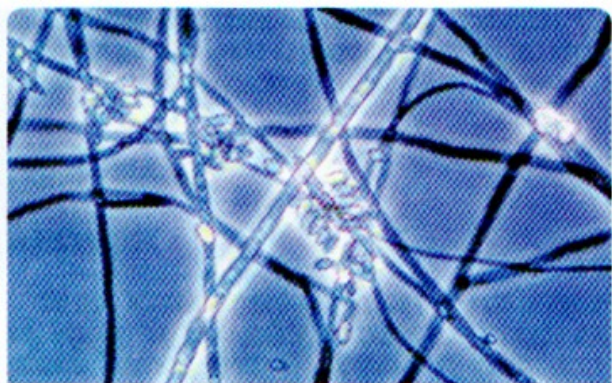
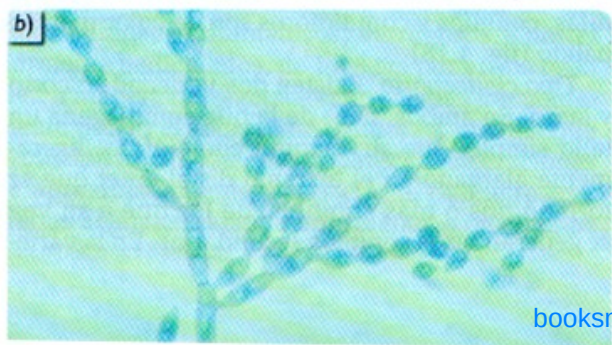
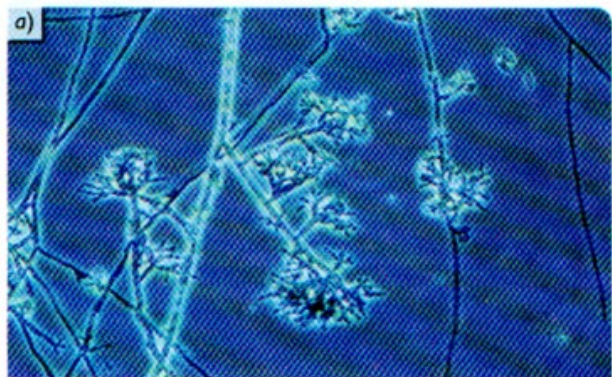


Fig. 4.18. Rinocladiela. Forma de reproducción en la que los conidios se producen alrededor del conidióforo por un proceso simpodial proliferativo.

dad corta se forman bifurcaciones en arborescencia, de donde se desprenden los conidios que quedan libres sin integrar cadenas largas (fig. 4.19a). En la variedad larga, la conidiación continúa formando largas cadenas; los conidios más jóvenes están en el extremo distal de la cadena (formación acrópeta) y cuando se desprenden también presentan una cicatriz de unión (fig. 4.19 b).

Fig. 4.19. Forma de reproducción cladosporio: a) corto, que se produce a partir de conidióforos que geman en forma arborescente y dan lugar a cadenas cortas de conidios ovoides, característicos de *Fonsecaea pedrosoi*; b) largo, constituido por cadenas ramificadas de seis o más conidios ovoides, característicos de *Cladophialophora carrionii*.



PHIALOPHORA VERRUCOSA

Morfología colonial. La colonia es de crecimiento lento, de color que va del gris olivo oscuro al negro, al principio elevada y después plana; algunas veces rugosa y con prolongaciones radiales. Finalmente, un micelio gris cubre la colonia.

Morfología microscópica. Presenta conidiación del tipo fiálide con collarettes claramente visibles (cuadro 4.4).

CLADOPHIALOPHORA CARRIONII

Morfología colonial. La colonia es de crecimiento lento, al cabo de un mes alcanza de 3 a 4 cm de diámetro, es lisa o rugosa y de color olivo oscuro.

Morfología microscópica. Generalmente sólo se encuentra conidiación tipo cladosporio largo. Los conidios no presentan cicatriz de desprendimiento y ocasionalmente se observan fiálides con collarettes (cuadro 4.5).

FONSECAEA PEDROSOI

Morfología colonial. Las colonias son de crecimiento lento, de color marrón oscuro o negro grisáceo, verde olivo o negro, vellosas, de superficie plana o plegada.

Morfología microscópica. Conidios marrón en forma de barril. Presenta los tres tipos de conidiación, en los que predominan los tipos cladosporio corto y rinocladiela. En las fiálides los conidios no se encuentran compactados (véase cuadro 4.4).

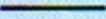
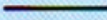
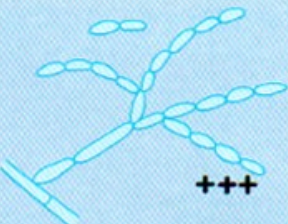
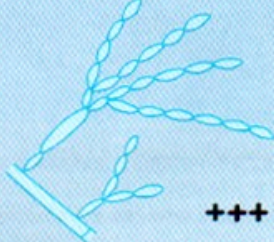
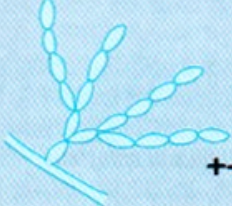
FONSECAEA COMPACTA

Morfología colonial. Las colonias son de crecimiento muy lento, plegadas o elevadas, con aspecto vellosos y de color negro.

Morfología microscópica. Es indistinguible de *F. pedrosoi*, excepto porque en las fiálides se presenta una forma más compacta de acúmulos de conidios esféricos u ovoides, cuyo tamaño promedio es de $1.5 \times 2 \times 3 \mu\text{m}$ (véase cuadro 4.4).

Histopatología. Las estructuras parasitarias, llamadas células muriformes o células fumagoides, se observan fácilmente cuando se tiñen con

Cuadro 4.4. Cromoblastomycosis: morfología de los agentes, frecuencia y distribución geográfica.

Género y especie, frecuencia, distribución geográfica	Tipos de conidiación		
	<i>Fidélide</i>	<i>Rhinocladiella</i>	<i>Cladosporio</i>
<i>Phialophora verrucosa</i> Rara Colombia, Ecuador y Argelia	 +++		
<i>Cladosporium carrionii</i> Poco frecuente Sudáfrica, Australia Madagascar y Venezuela			 +++
<i>Fonsecaea pedrosoi</i> Frecuente México, América Central, Antillas, Venezuela, Colombia, Ecuador y Brasil	 +	 ++	 +++
<i>Fonsecaea compacta</i> Rara Rusia, Puerto Rico y Estados Unidos	 + -	 + -	 ++
<i>Rhinocladiella aquaspersa</i> Rara México, Costa Rica, Brasil y Venezuela			

hematoxilina-eosina. El hongo se observa como una estructura redonda, de 5 a 15 micras de diámetro, de color marrón o amarillo pálido, de pared gruesa, con o sin septos transversos, aisladas o en grupos. Con la tinción de Giemsa, el hongo se observa de color marrón verdoso. El cuadro histológico corresponde al de un granuloma por cuerpo extraño combinado con microabscesos, hiperqueratosis, acantosis y papilomatosis (fig. 4.20). A continuación se describen los principales agentes de la cromoblastomycosis.

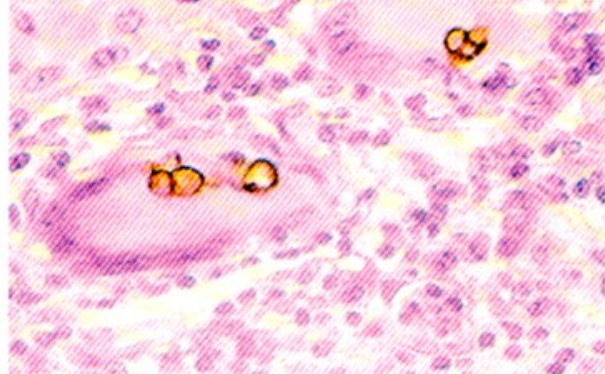


Fig. 4.20. Células fumagoides en corte histológico, teñidas con HE. Las estructuras parasitarias están dentro de células gigantes multinucleadas.

Cuadro 4.5. Algunas características de los agentes más frecuentes de Feohifomicosis.

Especies	Dermotropismo	Neurotropismo	Crecimiento a 37 °C	Liquefacción de la gelatina	Fase de levadura en primocultivo	Morfología microscópica
<i>Cladophialophora bantiana</i>	±	+	+	-	-	Grandes cadenas de conidios (35 o más), elípticos, de tamaño irregular que emergen a partir únicamente de conidióforos ramificados. Presenta termotolerancia hasta 43 °C
<i>Cladophialophora</i> spp	-	-	-	+	-	Conidiación acrópeta de tipo cladosporio. La mayoría de las especies de <i>Cladophialophora</i> son termolábiles y no patógenas para los animales
<i>Exophiala jeanselmei</i>	-	-	±	±	+	En los primeros días se presentan levaduras y, posteriormente, en la fase micelial se da lugar a conidios con múltiples puntos de gemación. Los conidios se forman a partir de anélices alargadas
<i>Exophiala spinifera</i>	+	-	±		+	En los primeros días, levaduras y posteriormente se presentan conidióforos de apariencia rígida como espinas, simples o ramificadas, no refringentes y los conidios emergen a partir de un anelóforo que presenta collaretes apicales. Los conidios y conidióforos presentan puntos múltiples de gemación
<i>Phialophora richardsiae</i>	+	-	+		-	Conidiación, siempre de tipo fiálide, la cual tiene forma de botella y su extremo es amplio y bien delimitado con collaretes a su alrededor
<i>Wangiella dermatitidis</i>	+	+	+	-	+	En los primeros días, levaduras. Posteriormente se presentan fiálides de extremos inconspicuos, que pueden ser muy alargadas o cortas y redondas. Tanto el conidióforo como el conidio presentan puntos múltiples de gemación

Tomado y modificado de Rippon, J. W. (1988).

LACAZIOSIS (LOBO)

DESCRIPCIÓN

Es una infección subepidérmica, crónica y caracterizada por lesiones de tipo queloidiano, nodulares y de aspecto verrugoso. Esta micosis está causada por *Lacazia loboi*, hongo al cual sólo se le conoce en la fase parasitaria, presentándose como una levadura redonda de 7 a 10 μm de diámetro, unigemente. Los conidios pueden separarse de la célula madre o permanecer unidos a ella hasta alcanzar el tamaño de la célula progenitora y producir un nuevo blastoconidio, de tal manera que pueden formarse cadenas de tres a 20 blastoconidios, unidos por estructuras que semejan a puentes cortos y estrechos. El diámetro de estas levaduras varía de 8 a 10 μm .

La frecuencia de esta micosis es baja, confinada principalmente a Brasil, en la región del Amazonas (Mato Grosso). Hasta el momento todos los casos registrados pertenecen al sexo masculino, siendo la mayoría adultos; sin embargo, la micosis también se ha observado en niños. La lesión inicial aparece en lugares donde la piel ha sufrido un traumatismo. La infección también se ha observado en delfines (*Tursiops truncatus*) del Atlántico. No hay evidencia de factores predisponentes para adquirir la infección.

Las lesiones son de crecimiento lento y suelen presentarse en una sola región corporal. En ellas se desarrollan nódulos pequeños que confluyen en una superficie hipercrómica, úlceras y finalmente placas verrugosas de aspecto queloide. Este tipo de lesiones se puede observar en cualquier parte de la superficie cutánea. En general es considerada como una micosis de curso benigno.

ESPÉCIMEN BIOLÓGICO

- Material de biopsia.

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Examen directo. Los fragmentos de biopsia se trituran y se les agrega KOH al 15 %; se observan células redondas, de pared gruesa y unidas unas a otras en serie de tres o más levaduras. Si se agrega lugol o eritrosina a las preparaciones, las estructuras se observan con mayor claridad.

Cultivo. No ha sido posible el aislamiento.

Histopatología. Es generalmente el procedimiento adecuado para establecer el diagnóstico. Utilizando las coloraciones de Grocott, Gridley o PAS, se destacan las cadenas de levaduras tanto dentro como fuera de los macrófagos o de las células gigantes. En algunas ocasiones pueden observarse cuerpos asteroides. Los nódulos formados presentan principalmente granulomas cuya histología es variable; en la mayoría de los casos hay una fibrosis hialina mezclada con masas de histiocitos y células gigantes, las cuales aumentarán en número en proporción a la evolución de la lesión; no existen supuración ni necrosis (fig. 4.21).

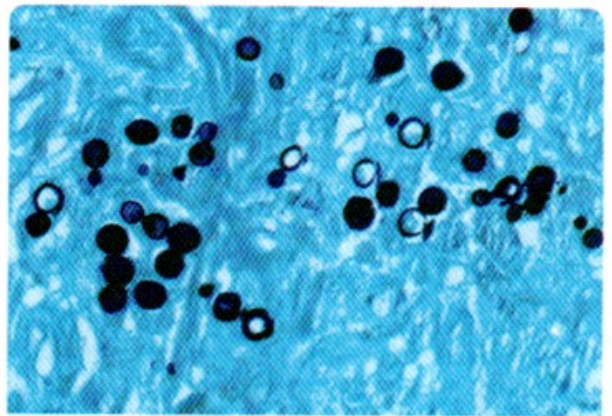


Fig. 4.21. *L. loboi*, corte histológico. Se observan levaduras aisladas o en sucesión acrópeta de cadenas cortas características. (Tinción de Grocott.)

CONIDIOBOLOMICOSIS

DESCRIPCIÓN

Es una zigomicosis subcutánea, que anteriormente era designada como rinoficomicosis o ficomicosis subcutánea. Es una de las entidades clínicas agrupadas dentro de las zigomicosis, cuya evolución es crónica, inflamatoria y granulomatosa, restringida generalmente al tejido subcutáneo, principalmente de la cara, que afecta nariz y boca.

El agente etiológico más común es *Conidiobolus coronatus*, que pertenece al orden de los Entomophthorales. Su distribución geográfica es amplia en las regiones cálidas y húmedas. Al parecer el hongo se desarrolla sobre desechos vegetales.

Muy raramente se puede observar la reproducción sexual, en la cual se presenta la formación de zigosporas. Este hongo es entomopatógeno, sobre todo de homópteros, como *Prosapia simulans* (mosca pinta).

La infección es poco frecuente. La mayoría de los casos observados proviene de África Central, sobre todo de Nigeria. Un número menor de casos ha sido diagnosticado en la India y en algunos países de América, como Brasil, Colombia, Puerto Rico, Jamaica y México.

La incidencia de la enfermedad es mayor en el sexo masculino y, en cuanto a la edad, la gran mayoría de los casos corresponden a adultos de más de 20 años. La enfermedad es más frecuente en los agricultores y se asume que el mecanismo de infección se efectúa a través de un traumatismo en la piel que se contamina con material vegetal o insectos infectados con *C. coronatus*. Esta enfermedad también se ha descrito en caballos, mulas y simios.

Hasta el momento, la presencia de la enfermedad no se ha asociado con factores de oportunismo, aunque se cree que para la adquisición no basta con una sola exposición al agente.

Esta micosis se caracteriza por una inflamación subcutánea que crece muy lentamente, involucrando la submucosa y los senos paranasales, provocando un aumento de volumen constituido por nódulos y edema con eritema superficial. No hay dolor, fiebre ni tendencia a la ulceración y casi siempre cursa con gran desfiguración de la cara o de la zona afectada.

ESPECÍMENES BIOLÓGICOS

- Material de biopsia.
- Exudado.

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Examen directo. El fluido nasal, un material amarillento, es producto de una necrosis caseosa, la cual se trata con KOH al 15 %. En él se observarán las hifas anchas, sin septos, con una aparente doble pared refráctil y con algunas ramificaciones; en ocasiones también se observan inclusiones granulares.

Cultivo. Los productos se siembran en agar dextrosa Sabouraud sin cicloheximida, adiciona-

do con estreptomycin y penicilina, se incuban a 25 y 30 °C y se puede observar crecimiento colonial después de 48 horas (fig. 4.22).

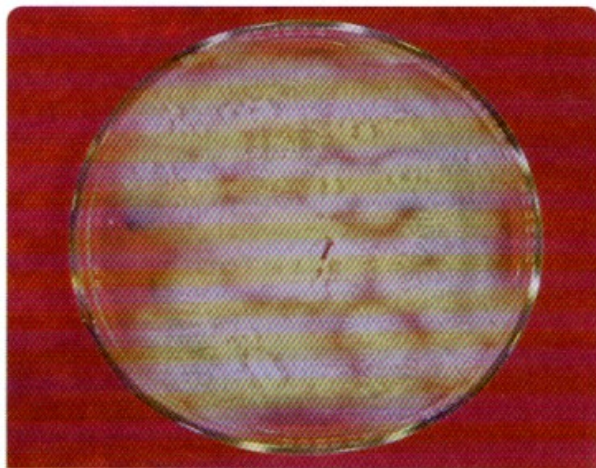


Fig. 4.22. *C. coronatus*. Colonias de aspecto filamentosas, radiadas, de color blanquecino, con áreas granulosas.

Las colonias crecen rápidamente y son glabras y adherentes al principio, para luego cubrirse de un micelio corto blanco y con abundantes esporangióforos. Las paredes de los tubos de cultivo o las tapas de las cajas de Petri se encuentran cubiertas por esporas que fueron expulsadas fuertemente de los esporangiolos (balistosporas). Con el envejecimiento, las colonias toman un color canela o marrón claro. Al microscopio se observan grandes esporas de 25 a 45 µm de diámetro, producidas en el extremo de los esporangióforos, los cuales son rectos.

Las esporas son expulsadas y viajan grandes distancias (30 mm aproximadamente) y al caer al suelo o en los medios de cultivo germinarán para producir más tubos hifales.

Las esporas tienen papilas sobre la pared, las cuales pueden formar esporangiolos secundarios, de modo que la espora original les da el aspecto de una corona. Una espora puede producir también apéndices múltiples cortos, semejantes a pelos (espora vellosa) o bien, pueden tener una forma ovoide con una pequeña saliente (esporas en limón) (fig. 4.23).

Histopatología. Se caracteriza por presentar un agregado eosinofílico alrededor de las hifas que afectan el tejido. No hay invasión vascular como en el caso de la mucormicosis. Los elementos fúngicos se resaltan mejor con hematoxilinaeosina

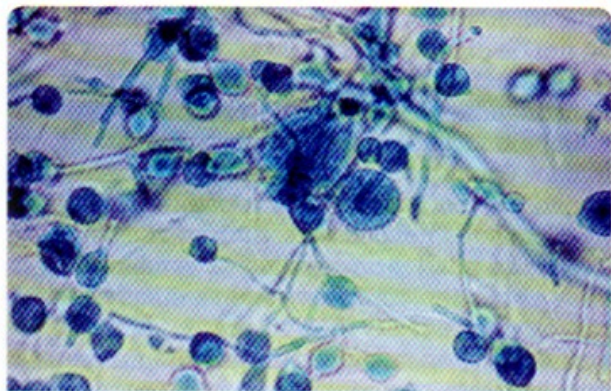


Fig. 4.23. *C. coronatus*. Aspecto microscópico en el que se observan filamentos cenocíticos, numerosas esporas en "limón" y en el centro una espora vellosa característica.

que con la técnica de PAS o Gridley. En los tejidos se observan hifas solitarias o agrupadas, de 4 a 10 μm de diámetro, limitadas por una pared delgada y tenue (fig. 4.24), pero fácilmente distinguible, pues se rodea radialmente de un material granular eosinofílico brillante que se conoce como reacción de Splendore-Hoepppli.

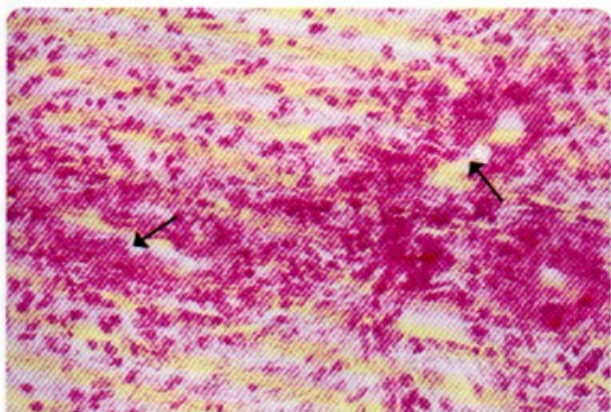


Fig. 4.24. *Conidiobolomycosis*. Corte histológico donde se observan los filamentos del hongo, de pared irregular y rodeados de un material eosinofílico. (Tinción con H-E.) (Cortesía de F. Mariat y P. Ravisse.)

La reacción aguda consiste en masas de linfocitos, un número variable de eosinófilos y células plasmáticas. Los neutrófilos y fibroblastos se presentan en muy baja proporción. La reacción crónica inflamatoria se caracteriza por infiltrados granulomatosos con predominio de células gigantes, histiocitos, linfocitos, eosinófilos y células plasmáticas. En la periferia hay actividad fibroblástica.

BASIDIOBOLOMICOSIS

DESCRIPCIÓN

La basidiobolomycosis, denominada también zigomicosis o ficomicosis subcutánea, es un padecimiento caracterizado principalmente por lesiones tumorales de localización subcutánea; ocasionalmente se han descrito infecciones intestinales. Esta micosis es causada por *Basidiobolus ranarum*, hongo que es aislado frecuentemente del tubo digestivo de las ranas, sapos y lagartijas.

Este hongo puede reproducirse tanto sexual como asexualmente. En el primer caso, la reproducción se hace a través de zigosporas, mientras que en el segundo se efectúa produciendo conidios esféricos, esporangiolos (esporangióforos y esporangios) y esporangiosporas.

Esta micosis es de muy reciente descripción, aunque se diagnostica con cierta frecuencia. El mayor número de casos proviene de África (Uganda, Kenia y Nigeria) y otros países con menor frecuencia; son Indonesia, India, Tailandia, Australia, Brasil, Estados Unidos de América y México. La micosis afecta más a hombres que a mujeres, en una proporción de 4:1. En cuanto a los grupos de edad, la mayoría de los casos se presenta en niños menores de 10 años.

El mecanismo de infección se desconoce, pero se supone, como en el caso de la conidiobolomycosis, que es por penetración del hongo a través de heridas en la piel. No se ha descrito ningún factor predisponente para la adquisición de la infección.

La enfermedad se inicia por uno o varios nódulos subcutáneos indoloros, no adheridos a la piel, los cuales pueden presentar manchas hipercrómicas en la superficie. Las lesiones generalmente abarcan grandes extensiones y sus bordes son abruptos.

Los miembros inferiores y los glúteos son las localizaciones más habituales, llegando a producir grandes deformaciones de la región corporal afectada. La invasión muscular es rara. Esta forma clínica es considerada de pronóstico benigno. Por su parte, la basidiobolomycosis intestinal ha sido descrita en pacientes diabéticos; la clínica denota una enfermedad intestinal, inflamatoria y de mal pronóstico si no se diagnostica a tiempo.

ESPECÍMENES BIOLÓGICOS

- Material de biopsia.

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Examen directo. El tejido se macera y se observa al microscopio con KOH al 15 %, para demostrar hifas gruesas de 10 a 40 μm de diámetro, ramificadas, con numerosas inclusiones y con una pared celular gruesa y retráctil.

Cultivo. En medio de Sabouraud simple se desarrollan colonias planas, vellosas, con formación de pliegues radiales, de color blanco en el anverso y en el reverso de un color que varía del crema al marrón claro (fig. 4.25).

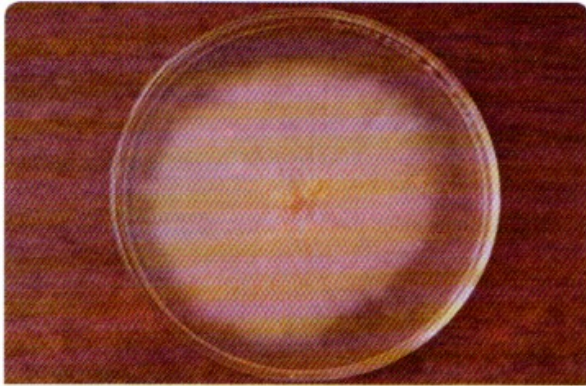


Fig. 4.25. *B. ranarum*. Colonia blanco-amarillenta, de superficie vellosa con estriaciones radiales.

Al microscopio se observa el micelio no tabicado (cenocítico), de 8 a 25 μm de diámetro. Los esporangióforos uniesporados (esporangiolos) de *Basidiobolus ranarum* dan dos tipos de esporangiosporas: balistosporas (liberadas como proyectil, como en el caso de *Conidiobolus coronatus*), y esporas liberadas pasivamente, que son consideradas a su vez como esporangiolos secundarios. Son esporas anchas en cuyo ápice se observa una prolongación parecida a "etiqueta adhesiva". También se observan zigosporas, las cuales presentan una pared gruesa, lisa y regular y con un

saliente en forma de pico; su tamaño varía de 40 a 50 μm de diámetro (fig. 4.26).

Histopatología. La imagen histopatológica es indistinguible de la observada en los casos de conidiobolomycosis. En los cortes histopatológicos teñidos con técnicas de coloración especiales para hongos, como PAS y Grocott, podrán observarse los elementos fúngicos descritos en el examen en fresco. La apariencia histológica es idéntica a la de la conidiobolomycosis. Algunas hifas cenocíticas (aseptadas), de 10 a 40 μm de diámetro, se encuentran esparcidas en el granuloma, pero la gran cubierta eosinofílica ayuda a identificarlas (fig. 4.27).

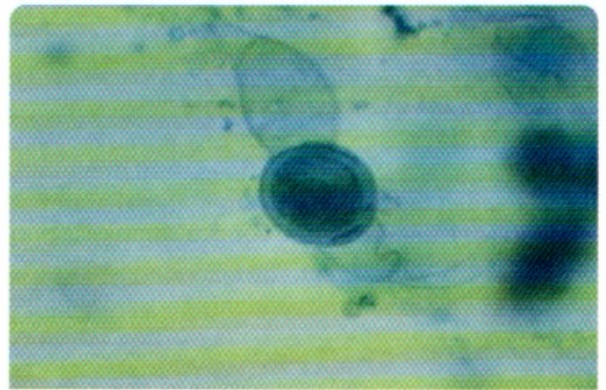


Fig. 4.26. *B. ranarum*. Microcultivo en medio de Sabouraud que muestra una zigospora entre las dos hifas reproductoras.

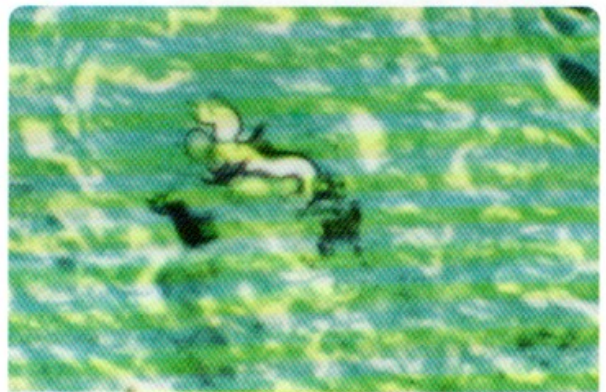


Fig. 4.27. Corte histológico de un caso de basidiobolomycosis. Los filamentos cenocíticos gruesos, vacíos, de diámetro irregular característico, únicamente se tiñen en su contorno. (Tinción de Grocott.)

BIBLIOGRAFÍA

- Bert, D., "Laboratory identification of clinically important aerobic Actinomycetes", *Appl. Microbiol.*, **25**:665, 1973.
- Blumer, S. O., Kaufman, L. y cols., "Comparative evaluation of five serological methods for the diagnosis of sporotrichosis", *Appl. Microbiol.*, **26**:4, 1973.
- Bonifaz, A., Carrasco-Gerard, E. y Saúl, A., "Chromoblastomycosis: Clinical and mycologic experience of 51 cases", *Mycoses.*, **44**:1, 2001.
- Bonifaz, A., Ibarra, G., Saúl, A. y cols., "Mycetoma in children. Experience with 15 cases", *Pediatr. Infect. Dis.*, **26**: 50, 2002.
- De León-Bojórquez, Ruiz-Maldonado, B. R. y López-Martínez, R., "Subcutaneous phycromycosis caused by *Basidiobolus haptosporus*: A clinicopathologic and mycologic study in a child", *Pediatric Dermatol.*, **5**:33, 1988.
- Dieng, M. T., Sy, M. H. y cols., "Mycetoma: 130 cases", *Ann. Dermatol. Venereol.*, **130**:16, 2003.
- Espinoza-Texis, A., Hernández-Hernández, F., Barba-Rubio, J. y López-Martínez, R., "Estudio de 50 pacientes con esporotricosis. Evaluación clínica y de laboratorio", *Gac. Méd. Mex.*, **137**: 111, 2001.
- Fromentin, H. y Ravisse, P., "Les entomophthoromycoses tropicales", *Acta Tropica*, **34**:375, 1972.
- Ghosh, A., Maity, P. K. y cols., "Physiological characters of *Sporothrix schenckii* isolates", *Mycoses*, **45**:449, 2002.
- González-Ochoa, A., Ricoy, E., Velasco, O., López-Martínez, R. y Navarrete, F., "Valoración comparativa de los antígenos polisacárido y celular de *Sporothrix schenckii*", *Rev. Invest. Salud Publ.*, **30**:303, 1970.
- Herr, A. R., Tarcha, E. J. y cols., "Phylogenetic analysis of *Lacazia loboi* places this previously uncharacterized pathogen within the dimorphic Onygenales", *J. Clin. Microbiol.*, **39**:309, 2001.
- Horre, R., Schumacher, G. y cols., "Mycetoma due to *Pseudallescheria boydii* and coisolation of *Nocardia abscessus* in a patient injured in road accident", *Med. Mycol.*, **40**:525, 2002.
- Kamalam, A. y Thambiah, A. S., "Basidiobolomycosis with lymph node involvement", *Sabouraudia*, **13**:44, 1975.
- Khan, Z. U., Khourshed, M. y cols., "*Basidiobolus ranarum* as an etiologic agent of gastrointestinal zygomycosis", *J. Clin. Microbiol.*, **39**:2360, 2001.
- Larone, D. H., *Medically important fungi: A guide to identification* (4a. ed.), ASM Press, Washington, D. C., 2002.
- Lavalle, P. y Mariat, F., "Sporotrichosis", *Bull. Inst. Pasteur*, **81**:295, 1983.
- López-Martínez, R. y Méndez Tovar, L. J., Chromoblastomycosis, *Clin. Dermatol.*, **25**:188, 2007.
- López-Martínez, R. y Méndez Tovar, L. J. y Grupo de Estudio del Micetoma en México, "Datos epidemiológicos del micetoma en México", *Dermatol. Rev. Mex.*, **19**:5, 2006.
- López-Martínez, R., Toriello, C., Mier, T. y cols., "Estudio de la patogenicidad de *Conidiobolus coronatus* en animales de experimentación", *Mycopathologia*, **66**:59, 1978.
- Mahgoub, E. S. y Murray, I. G., *Mycetoma*, W. Heinnemann Medical Books, Londres, 1973.
- Mariat, F., "Critères de détermination des principales espèces d'Actinomycetes aérobies pathogènes", *Ann. Soc. Belge. Méd. Trop.*, **4**:651, 1962.
- Méndez-Tovar, L. J. y de Bievre, C., "Détermination du profil enzymatique de quelques agents de Mycétome par la méthode, API-ZYM", *Bull. Soc. Fr. Mycol. Méd.*, **18**:153, 1989.
- Mendoza, L., Ajello, L. y Taylor, J. W., "The taxonomic status of *Lacazia loboi* and *Rhinosporidium seeberi* has been finally resolved with the use of molecular tools", *Rev. Iberoam. Mycol.*, **18**:95, 2001.
- Mendoza, L., Taylor, J. W. y Ajello, L., "The class Mesomycetozoea: A heterogeneous group of microorganisms the animals and fungi boundary", *Ann. Rev. Microbiol.*, **56**:315, 2002.
- Mesa-Arango, A. C., Reyes-Montes, M. R. y cols., "Phenotyping and genotyping of *Sporothrix schenckii* isolates according to geographic origin and clinical form of sporotrichosis", *J. Clin. Microbiol.*, **40**:3004, 2002.
- Padhye, A. A., Kaufman, L. y cols., "Fatal pulmonary sporotrichosis caused by *Sporothrix schenckii* var. *luriei* in India", *J. Clin. Microbiol.*, **30**:2492, 1992.
- Rippon, J. W., *Medical mycology. The pathogenic fungi and pathogenic actinomycetes* (3a. ed.), W. B. Saunders, Filadelfia, 1988.
- Zavala-Velázquez, J. y Reyes-Pérez, A., "Enfermedad de Lobo (Lobomycosis). Primer caso mexicano", *Rev. Mex. Dermatol.*, **22**:5, 1978.

Micosis sistémicas

HISTOPLASMOSIS

DESCRIPCIÓN

La histoplasmosis es una enfermedad granulomatosa, de localización principalmente pulmonar, causada por la inhalación de conidios del hongo dimórfico *Histoplasma capsulatum*, var. *capsulatum*. Excepcional y accidentalmente, la infección se adquiere por inoculación cutánea.

Aproximadamente 95 % de los casos presenta un curso asintomático o benigno, mientras que 5 % restante puede presentar una enfermedad progresiva, pulmonar o cutánea, aguda o crónica, o bien, una infección sistémica rápidamente fatal. Se han reconocido tres variedades de *Histoplasma capsulatum*, que causan diferentes tipos de histoplasmosis; a saber: var. *capsulatum* (histoplasmosis americana), var. *duboisii* (histoplasmosis africana) y var. *farcinimosum* (histoplasmosis equina).

Este capítulo está dedicado a la infección por la variedad *capsulatum* y en lo sucesivo se hará referencia solamente a *H. capsulatum*.

La histoplasmosis se considera una enfermedad del sistema fagocítico mononuclear. Las formas clínicas y la severidad dependen de las condiciones inmunológicas del hospedero y de la cantidad de conidios inhalados. Por lo anterior, los órganos más frecuentemente afectados en las formas diseminadas a partir del pulmón son el hígado, el bazo, los ganglios linfáticos, la médula ósea y las mucosas, entre otros. La curación de la enfermedad confiere cierto grado de inmunidad a la reinfección.

Ambos sexos y todas las edades están sujetos a la infección primaria, pero la distribución por sexo y la forma clínica de la enfermedad cambian a medida que aumenta la edad del paciente. En los niños es frecuente que se desarrolle la forma fulminante y en los adultos son más frecuentes las formas progresivas.

Histoplasma capsulatum es el estado anamórfico (asexual) de un Ascomyceto heterotálico, cuyo estado teleomórfico (sexual) es *Ajellomyces capsulatus*, el cual se clasifica en la familia Gymnoascaceae. Crece en el suelo con alto contenido de nitrógeno y fosfatos, generalmente asociado con el guano de murciélagos y algunas aves como estorninos y aves de corral. Las principales zonas endémicas de la histoplasmosis son el Valle de Ohio, Mississippi y el sur de Estados Unidos de América, México, Centro y Sudamérica, Australia y Asia.

H. capsulatum se considera un hongo primariamente patógeno, aunque algunos pacientes inmunodeficientes pueden desarrollar una enfermedad crónica progresiva, similar a la tuberculosis, y en tales casos se considera como oportunista.

ESPECÍMENES BIOLÓGICOS

- Esputo.
- Material de biopsia.
- Material de punción de médula ósea.
- Suero.

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Examen directo. La detección de *H. capsulatum* en el esputo es difícil, por lo que el resultado del procedimiento con KOH generalmente es negativo.

Impronta de tejidos y frotis. Con la tinción de Giemsa se observan levaduras de 3 μm dentro del citoplasma de los macrófagos, tiñéndose el núcleo del Histoplasma de un tono violeta oscuro, y el citoplasma en azul muy tenue, casi incoloro, que da la apariencia a estas levaduras de poseer una cápsula. Cuando se rompen los macrófagos parasitados se liberan las levaduras de *H. capsulatum* y se encuentran libres en los tejidos antes de ser nuevamente fagocitadas (fig. 5.1).

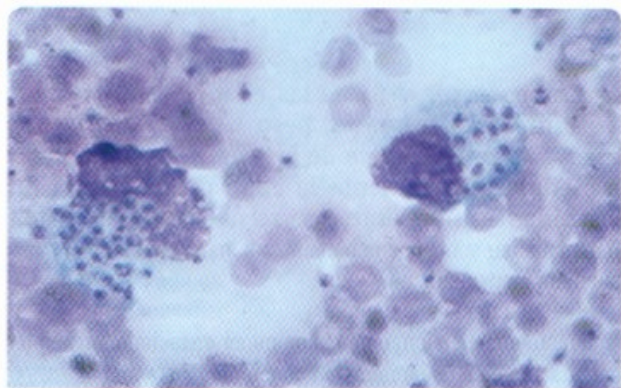


Fig. 5.1. Impronta de bazo en la que se observan numerosas levaduras de *H. capsulatum*, dentro del citoplasma de los macrófagos. (Tinción de Giemsa.)

Cultivo. Se recomienda que el primocultivo se realice en Sabouraud antibiótico y en el medio de levadura fosfato-amonio. Se mantienen a 25 °C durante dos a tres semanas. No siempre los cultivos son positivos, por lo que se recurre a las pruebas serológicas para complementar o establecer el diagnóstico.

Morfología colonial. Se han descrito dos tipos morfológicos de las colonias: el tipo A (albino) y el tipo B (brown), las cuales, como su nombre lo indica, difieren en su color blanco y color marrón, respectivamente. Ambas tienen un aspecto algodonoso, liso o cerebriforme (fig. 5.2).

Morfología microscópica. Se observan macroconidios tuberculados, de 8 a 14 μm de diámetro, generalmente redondos, que nacen de conidiófo-

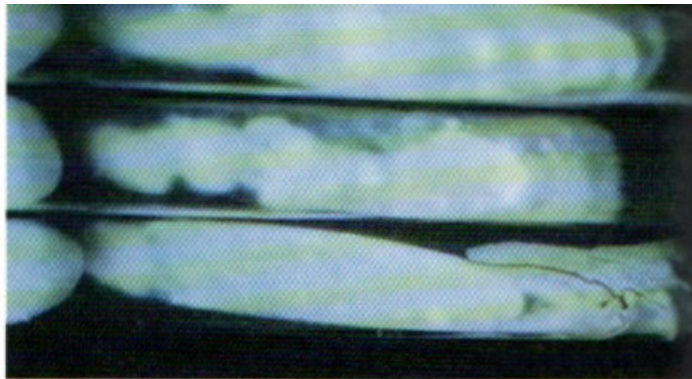
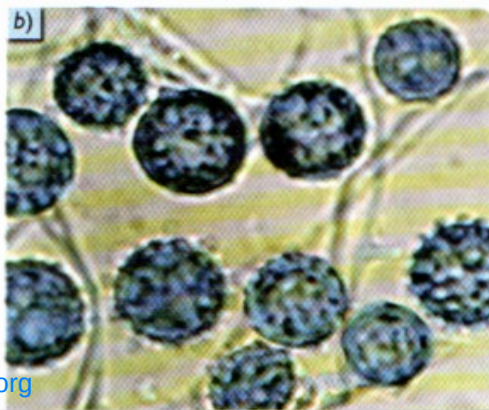
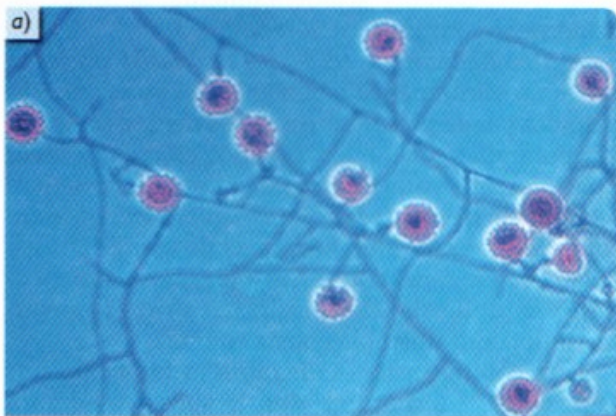


Fig. 5.2. *H. capsulatum*. Colonia color marrón claro o blanca, algodonosa, de crecimiento denso.

ros angostos; también se observan microconidios de 2 a 4 μm de diámetro, esféricos, de pared lisa, que nacen de conidióforos cortos y angostos, dispuestos en ángulo recto a la hifa vegetativa. Tanto la variedad A como la B producen un mayor número de macroconidios; sin embargo, la variedad B produce mayor número de microconidios que la variedad A, los cuales penetran más fácilmente hasta el interior de los alveolos, por lo que esta variedad B se considera más virulenta que la variedad A (fig. 5.3).

Fig. 5.3. *H. capsulatum*. Aspecto microscópico donde se observa micelio fino, septado y gran cantidad de macroconidios equinulados: a) tinción de PAS contrastada; b) tinción con azul de algodón.



La morfología de la colonia de *H. capsulatum* es indistinguible de la de algunos hongos contaminantes filamentosos y blancos, por lo que es necesaria la demostración de los macroconidios tuberculados y la conversión del microorganismo a su fase levaduriforme. Esta última se obtiene por incubación en agar sangre o en BHI a 37 °C. *Chrysosporium* spp y *Sepedonium* sp también producen macroconidios equinulados que pueden conducir a error; sin embargo, no forman levaduras en BHI a 37 °C.

La colonia levaduriforme al principio es blanca, lisa y adherente y su examen microscópico muestra una mezcla de pseudohifas, hifas en proceso de conversión y levaduras no gemantes. Posteriormente la colonia toma un aspecto cremoso y su examen microscópico permite observar levaduras gemantes, ovales, de 2 a 4 µm de diámetro. Los blastoconidios se encuentran en el extremo angosto de la levadura y tienen un cuello estrecho con aspecto de fino filamento.

Esta última característica y la presencia de un solo núcleo nos permiten diferenciar las levaduras de *H. capsulatum* de las formas pequeñas de *Blasatomyces dermatitidis*, cuyas células son multinucleadas con gemas de base ancha.

PRUEBAS INMUNOLÓGICAS

Reacción de fijación de complemento (RFC).

Esta prueba serológica es una de las más sensibles y específicas para el diagnóstico cuando se realiza en forma periódica, por lo que tiene un gran valor pronóstico en la enfermedad. Los anticuerpos fijadores de complemento comienzan a aparecer aproximadamente en la segunda semana después de la infección y se mantienen todo el tiempo que la histoplasmosis está activa; después de la curación disminuyen progresivamente hasta desaparecer alrededor del noveno mes.

Un título igual o mayor a 1:16 indica generalmente una enfermedad activa o progresiva; esta prueba es positiva en aproximadamente 70 % de los casos de histoplasmosis.

Inmunodifusión (ID). Se realiza mediante la técnica de Ouchterlony y es muy útil cuando se usa en forma combinada con la RFC; se hace positiva a la tercera o cuarta semana después de la infección. Se describen dos bandas de precipitado: la banda M, que se presenta en las personas en la fase temprana o de recuperación de la enfermedad

y se localiza más próxima al pozo central que contiene el antígeno, y la banda H, que corresponde a la infección activa y se encuentra más próxima al pozo que contiene el suero.

Es importante tomar en cuenta que, cuando se hace una ID después de aplicar una intradermoreacción con histoplasmina puede aparecer una banda M, lo cual podría conducir a un error de diagnóstico serológico. Se ha descrito una banda C, la cual parece representar antígenos compartidos con *B. dermatitidis* y *Coccidioides immitis*, principalmente.

Prueba de aglutinación en látex (AL). Esta es una prueba en la cual se mezcla el suero del paciente (anticuerpos) con partículas de látex cubiertas con histoplasmina (antígeno). Es positiva en un tiempo menor que la prueba de fijación de complemento y también es útil en combinación con esta última. Además de estas pruebas se pueden realizar hemaglutinación, precipitación en tubo capilar, ELISA y contrainmunolectroforesis.

Intradermoreacción. La histoplasmina es el producto del filtrado de un caldo en el que se ha cultivado *H. capsulatum* durante un periodo de dos meses a 25 °C; se inyecta intradérmicamente 0.1 ml. Un área de induración de por lo menos 5 mm después de 48 horas de la aplicación se considera positiva. Como en otras pruebas intradérmicas, la positividad de ésta indica exposición pasada o presente al agente etiológico. Tiene poco valor diagnóstico, pero gran valor pronóstico asociada a las pruebas serológicas. Cuando se negativiza al mismo tiempo que se elevan los títulos de anticuerpos, el pronóstico es grave; en cambio, cuando permanece positiva y los títulos de anticuerpos tienden a disminuir, el pronóstico es bueno (véase fig. 5.8).

Generalmente, la prueba se hace positiva en la segunda semana después de la exposición al agente y se mantiene por largos periodos. Debe aplicarse después de extraer el suero para las reacciones serológicas.

Histopatología. Las lesiones histológicas dependen del tiempo de evolución, severidad y forma clínica de la enfermedad. Las levaduras de *H. capsulatum* fagocitadas por las células del sistema fagocítico mononuclear, como el hígado, el bazo, la médula ósea y los ganglios linfáticos, son factibles de observarse con las tinciones de Giemsa y de Wright y aun con hematoxilina-eosina. En la forma aguda se observan numerosas levaduras dentro de los histiocitos, las cuales son gemantes, de tamaño uniforme (aproximadamente 3 µm),

además de escasos neutrófilos, células plasmáticas y linfocitos. Con las tinciones de Giemsa y Wright, las levaduras presentan el núcleo rojo y el citoplasma azul. Las levaduras deben diferenciarse de *Leishmania* y *Toxoplasma*. También pueden teñirse con PAS (fig. 5.4).

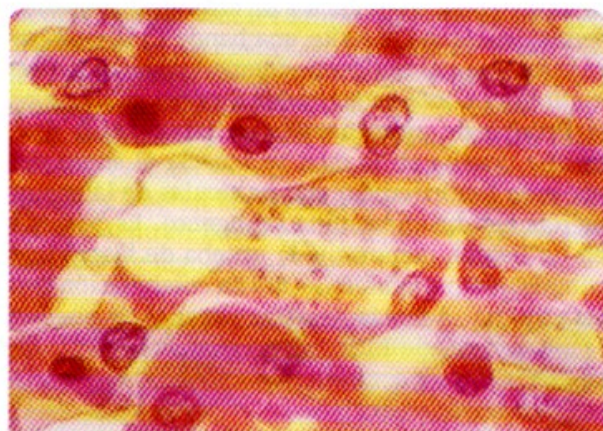


Fig. 5.4. *Histoplasmosis*. Imagen histológica con gran cantidad de levaduras intracelulares rodeadas de una intensa reacción inflamatoria. (Tinción de PAS.)

En la forma crónica de la enfermedad se forman granulomas epitelioides que contienen células plasmáticas, linfocitos, macrófagos, neutrófilos y células gigantes. Hay menor número de levaduras que en la forma aguda.

En la forma cavitaria crónica se observa un número escaso de levaduras intracelulares en el revestimiento de material necrótico, más que en el tejido profundo y rara vez se ven gemaciones.

INOCULACIÓN EN ANIMALES

El ratón, el cobayo y el hámster son los animales más susceptibles a la histoplasmosis, inoculados vía intraperitoneal; sin embargo, no siempre es necesario hacer estas pruebas, ya que en la mayoría de los casos el diagnóstico se hace con precisión con las técnicas descritas anteriormente.

BÚSQUEDA DE EXOANTÍGENOS

Esta es una técnica que pone de manifiesto la presencia de antígenos solubles específicos para ciertas especies de hongos y que se utiliza sobre

todo para la identificación de *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis*, *C. posadasii* e *Histoplasma capsulatum*.

La principal aplicación de esta técnica es la identificación de un cultivo desconocido y sospechoso de ser alguno de los anteriores, sin tener que manipularlo para su estudio morfológico y evitar así el riesgo de infecciones accidentales de laboratorio.

En términos generales, consiste en agregar 30 ml de BHI a los tubos del cultivo por identificar; incubar en agitación durante un periodo de tres a seis días; extraer 15 ml del caldo de cultivo y agregar timerosal al 1 % para matar al hongo; centrifugar y concentrar 25 veces el volumen.

El exoantígeno así preparado se procesa por medio de una reacción de ID, poniendo en el centro un suero conocido que contiene los anticuerpos del hongo, en los pozos superior e inferior el antígeno conocido y en los pozos laterales el o los exoantígenos por identificar. Las bandas de identidad entre el antígeno del hongo conocido con las de los exoantígenos por estudiar darán la determinación taxonómica correspondiente.

COCCIDIOIDOMICOSIS

DESCRIPCIÓN

Esta micosis puede ser causada por *Coccidioides immitis* o por *C. posadasii*. Es una infección pulmonar primaria que se adquiere por inhalación de los artroconidios del hongo, el cual habita en suelos de climas desérticos o semidesérticos de América. El área endémica más importante en el mundo se encuentra en la zona que comprende la parte suroeste de Estados Unidos de América y la parte norte de la República Mexicana.

Coccidioides sp es considerado el hongo patógeno primario más virulento; no obstante, la mayoría de las infecciones en el hombre son asintomáticas o subclínicas. Cuando se adquiere la enfermedad, la sintomatología pulmonar suele ser moderada, simulando una infección respiratoria leve.

Cuando el hongo se disemina vía hematógena, la infección adquiere una gravedad considerable, afectando la piel, los huesos, las articulaciones, las meninges y otros órganos; es en estos casos cuando la micosis puede adquirir un curso fatal. Afecta a individuos de cualquier sexo y edad. Sin embargo, en los niños y embarazadas las infeccio-

nes son más severas; asimismo, en la raza negra se observan diseminaciones más graves y extensas que en la raza blanca o cobriza.

La sintomatología pulmonar se caracteriza por focos neumónicos bilaterales o localizados en un lóbulo; cursa con fiebre, pérdida de peso y mal estado general. Las diseminaciones por la piel se resuelven en abscesos subcutáneos que se fistulizan al exterior, y en los huesos se observan áreas de osteólisis.

Además del área endémica señalada, esta micosis se ha descrito en Venezuela, Colombia, Paraguay, Argentina, Honduras y Guatemala, principalmente. Se tiene noticia de casos no autóctonos en Europa, Oriente Medio, África y Asia.

Debido a que actualmente la especie *posadasii*, causante de las infecciones en Latinoamérica, sólo ha sido definida mediante técnicas de biología molecular, en lo sucesivo las descripciones fenotípicas serán dadas por lo que se conoce de *C. immitis*.

Como en otras micosis subcutáneas y sistémicas, ésta es también causada por un hongo dimórfico, ya que *Coccidioides* spp se encuentra bajo la forma filamentosa con artroconidios en la naturaleza, así como en los medios de cultivo simples, como el de Sabouraud, en tanto que la forma parasitaria de cuerpos esféricos con endosporas internas se encuentra en los tejidos, o se puede reproducir en medios de cultivo ricos en nutrientes (BHI), incubados a 37 °C.

ESPECÍMENES BIOLÓGICOS

- Esputo.
- Pus de abscesos.
- Exudados.
- Material de biopsia.

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Examen directo. Al esputo o a los exudados se les agrega una gota de solución salina o de KOH al 15 %, para hacer más visibles las esférulas. Éstas suelen ser muy abundantes y de diferentes tamaños, según el grado de desarrollo; las maduras que contienen una gran cantidad de endosporas suelen medir de 30 a 60 µm. Las esférulas suelen tener una doble pared gruesa y son fácilmente observables y distinguibles del resto de los elementos

celulares. Las endosporas miden de 3 a 5 µm de diámetro, dando lugar cada una de ellas a nuevas esférulas (fig. 5.5); en ocasiones se ha descrito la presencia de hifas en los tejidos.

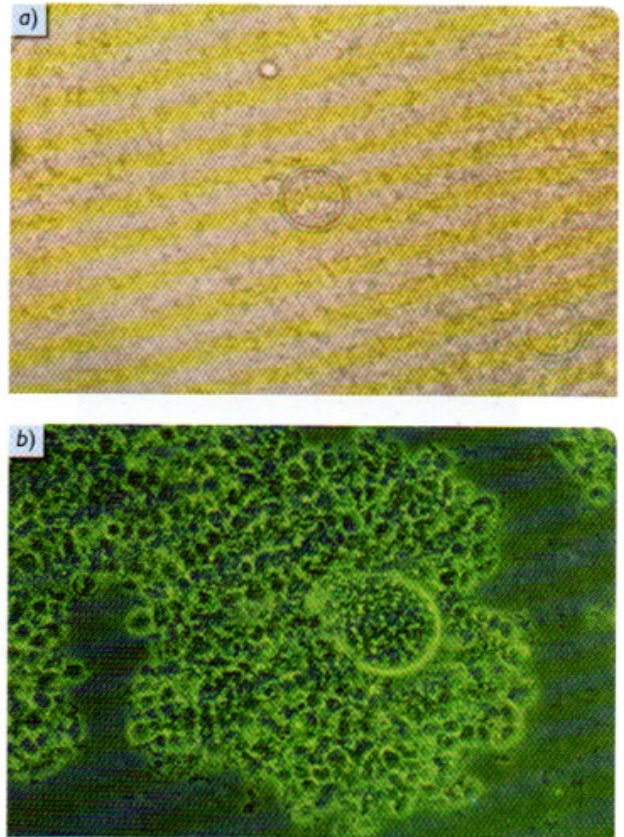


Fig. 5.5. Esférulas de *C. immitis*: a) examen directo con KOH; estructura parasitaria redonda, de doble contorno de pared con una gran cantidad de endosporas en su interior; b) esférula abierta que vierte endosporas al exterior. (Tinción con fluoresceína.)

Cultivo. Los productos patológicos se siembran en agar dextrosa Sabouraud más antibióticos; al cabo de cuatro a cinco días se observa desarrollo de la fase micelial del hongo y a los 10 o 12 días ya se encuentra bien esporulado. La apariencia de la colonia es característica, consta de un micelio algodonoso, flocoso, de densidad irregular, blanco o blanco-grisáceo; crece en toda la superficie del medio (fig. 5.6).

Las morfologías macroscópica y microscópica de *C. immitis* y de *C. posadasii* son muy similares, por lo que no es posible establecer la diferencia entre estas dos especies. Algunos autores refieren variaciones en la morfología macroscópica y mi-

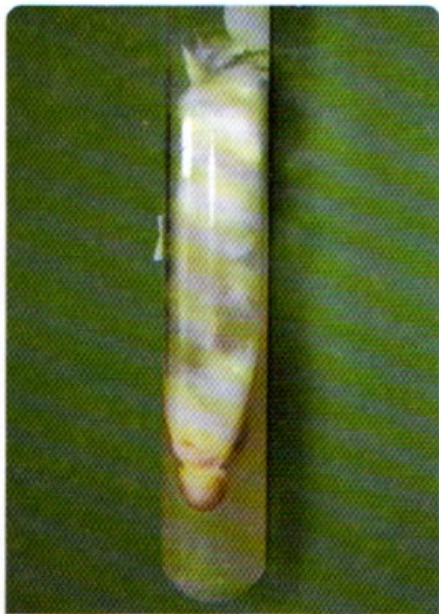


Fig. 5.6. *C. immitis*. Colonia de color blanco grisáceo, de crecimiento irregular, con áreas filamentosas y pulverulentas en el mismo cultivo.

croscópica, lo cual hay que tomar en cuenta para no tener errores de interpretación taxonómica.

Cuando es necesario corroborar el diagnóstico con el estudio morfológico de la colonia, es recomendable que, antes de extraer el material para el estudio microscópico, se inyecten 5 ml de formol concentrado a través del tapón de algodón, para fijar el hongo.

Al día siguiente se retiran con una pipeta Pasteur una o dos gotas de la suspensión de la colonia y se depositan en un portaobjetos, al cual se le agrega una gota de azul de algodón; se coloca el cubreobjetos y se observa al microscopio. Se destacan numerosos micelios septados, en donde por fragmentación se observan los artroconidios de pared gruesa en la típica forma de barril, alternados con células claras (vacías) de la hifa en esporulación (rexólisis); estos artroconidios de tipo enteroártrico miden de 3×4 a $6 \mu\text{m}$ (fig. 5.7).

Pruebas inmunológicas. En cuanto sea posible deben realizarse los estudios inmunológicos tanto para apoyar el diagnóstico como para establecer un pronóstico y valoración en la evolución clínica del padecimiento. Las reacciones más utilizadas son la *precipitación en tubo capilar (RPC)*, la cual es positiva durante las ocho primeras semanas de evolución; si la micosis es evolutiva, aparecen los títulos en la *reacción de fijación del complemento*

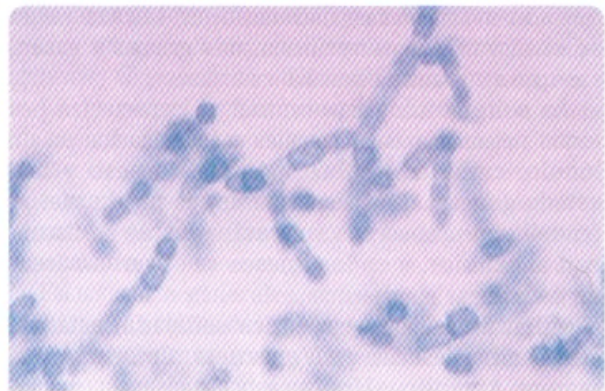


Fig. 5.7. *C. immitis*. Examen microscópico directo del cultivo en el que se observan artroconidios enteroártricos y alternos, y células intercalares que sufren rexólisis; ambas preparaciones están hechas con azul de algodón.

(RFC), cuya intensidad de reacción está en relación con la gravedad y la diseminación del padecimiento, de tal manera que a mayores títulos indica una mayor gravedad de la micosis. Cuando hay remisión de la coccidioidomicosis y ésta tiende a la curación, los títulos descienden paulatinamente, desapareciendo algunas semanas o meses después de la curación (fig. 5.8).

La reacción de inmunodifusión (ID). Es una prueba complementaria, la más sencilla de realizar, positiva durante todo el proceso patológico y recomendable si no se puede hacer la RFC. También se puede realizar la prueba de ELISA, la cual es muy sensible, pero de mayor costo y dificultades técnicas.

La intradermorreacción (IDR) con coccidioidina tiene, en primer lugar, un valor epidemiológico y, en segundo, un incalculable valor pronóstico. En el primer caso es positiva en todas las personas que tienen o han tenido coccidioidomicosis, indica en ellas un estado de inmunidad al padecimiento y es útil para calcular índices de prevalencia del padecimiento en las regiones endémicas. En el segundo caso, si la IDR es positiva durante el curso de la enfermedad, indica buen pronóstico, ya que aún hay una competencia inmunológica de tipo celular en el paciente; cuando desaparece o baja la intensidad de la IDR indica un mal pronóstico, ya que el paciente entra en un estado de anergia. Es recomendable aplicar la coccidioidina cada 10 o 15 días, durante la enfermedad, hasta tener evidencias de un curso hacia la curación.

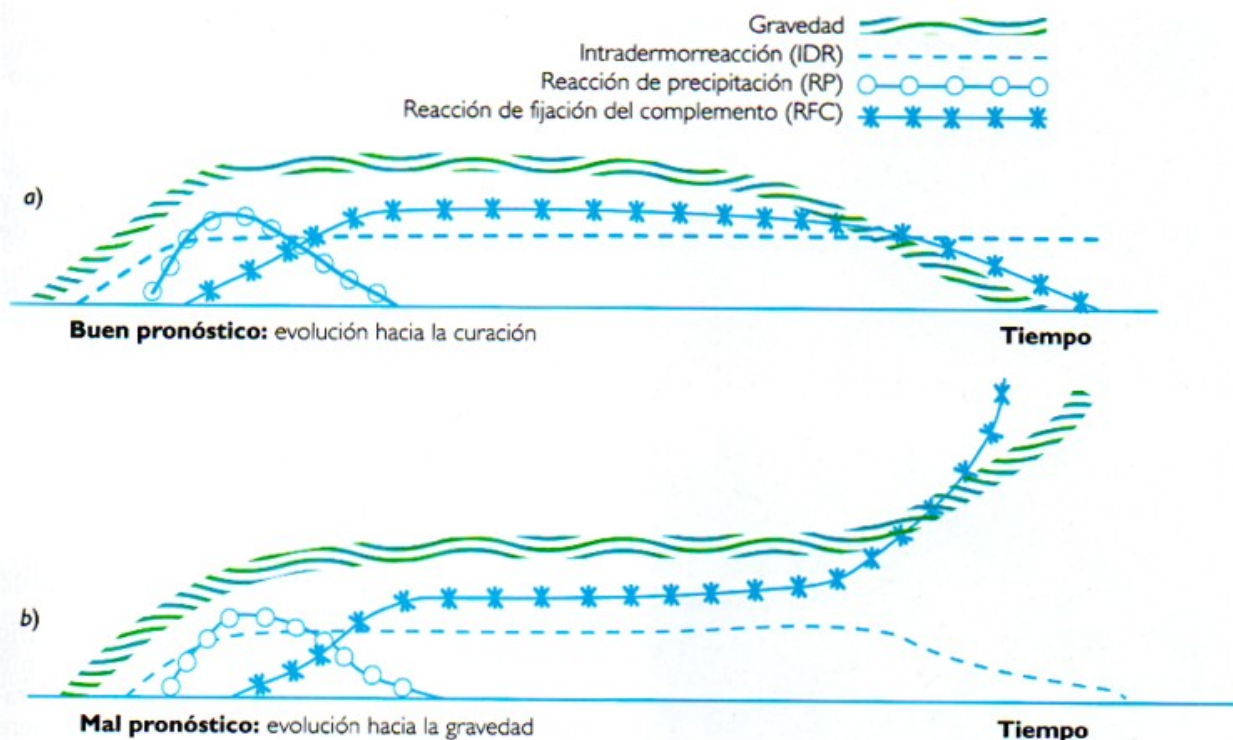


Fig. 5.8. Esquema de interpretación diagnóstica y pronóstica de la histoplasmosis y de la coccidioidomicosis: a) bajan los títulos de la RFC y se mantiene la positividad de la IDR; b) se elevan los títulos de la RFC y se vuelve negativa la IDR.

La prueba también se puede realizar aplicando un antígeno preparado a partir de la fase parasitaria de *Coccidioides* spp llamada esferulina. Ésta parece ser mucho más sensible que la coccidioidina y se considera de mayor valor para el diagnóstico y estudios epidemiológicos de la enfermedad, aunque al parecer presenta un número mayor de reacciones falsas positivas.

Histopatología. En los cortes histopatológicos teñidos con hematoxilina y eosina (HE) se observa una reacción inflamatoria aguda de tipo piógeno, con abundantes neutrófilos que se acomodan alrededor de las esférulas en proceso de ruptura. Otro tipo de reacción tisular es la reacción granulomatosa que está presente en el sitio donde se encuentran las esférulas en proceso de maduración, o bien, en las lesiones viejas, donde también se encuentra cierto grado de fibrosis. En un principio, los granulomas tienen abundantes histiocitos y, a medida que éstos evolucionan, se encuentran poblaciones de células plasmáticas, linfocitos, monocitos, células epitelioideas y células gigantes. En las biopsias cutáneas se puede observar, además,

una hiperplasia pseudoepiteliomatosa. Es común encontrar en una misma lesión tanto lesiones agudas abscedadas como reacción granulomatosa.

Las esférulas con endosporas internas o libres en los tejidos son fácilmente observables con HE, miden entre 30 y 60 μm y tienen pared gruesa (2 μm). Las endosporas libres miden de 2 a 5 μm de diámetro o más, según el grado de maduración. En ocasiones pueden ser confundidas con otras estructuras micóticas, como levaduras de *B. dermatitidis*, o con otro tipo de artefactos. Por lo anterior, se recomienda también hacer tinciones con impregnación argéntica (Gomori-Grocott) y con Hotchkiss-McManus (PAS) (fig. 5.9). En las lesiones cavitarias antiguas de pulmón o granulomas y líquido cefalorraquídeo se pueden observar fragmentos de hifas sin atroconidios en asociación con escasas endosporas y esférulas.

Inoculación en animales. Muchos animales de laboratorio son susceptibles a la infección experimental. Los más utilizados son el ratón, el hámster y el cobayo, a los cuales se les puede inocular vía intravenosa, intraperitoneal e intratesticular con

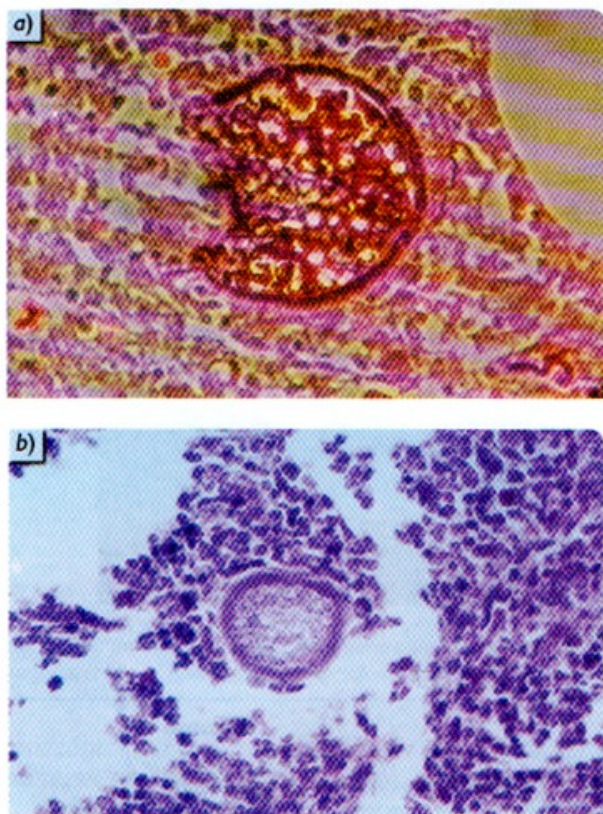


Fig. 5.9. Coccidioidomycosis. Corte histológico en donde se observa la esférula con doble contorno de la pared abierta, que contiene endosporas en el interior; a) tinción con Gomori; b) tinción con hematoxilina-eosina.

una dosis de 0.5 a 1.0 ml de la suspensión de micelio con una turbidez de 1 en la escala de McFarland. Después de un periodo de 10 a 15 días se sacrifica al animal, se le extraen las vísceras y el tejido testicular y se busca en el examen microscópico la presencia de esférulas, que suelen ser más grandes que en la infección natural del hombre.

La inoculación de *Coccidioides* spp en animales de laboratorio es muy recomendable para protegerse de los riesgos de infección accidental de laboratorio por manejar los cultivos de la fase filamentosa (forma infectante). De esta manera no es indispensable destapar los tubos para observar los artroconidios, sino que basta agregar agua destilada estéril con ayuda de una jeringa y tomar de la suspensión para las inoculaciones; así se reproduce la fase esferular, la cual no es infectante.

Pruebas especiales: búsqueda de exoantígenos. Véase técnica y utilidad en el capítulo de Histoplasmosis. Recuérdese que *Coccidioides* spp por su virulencia, es el hongo patógeno más peli-

groso para el hombre y que la manipulación del mismo sin las debidas precauciones en el laboratorio supone un alto riesgo; por tanto, se recomienda tomar las medidas siguientes:

1. Después de sembrar los productos patológicos, tapar bien los tubos de cultivo, etiquetarlos y guardarlos, de preferencia en un lugar separado de los demás cultivos y no manipularlos en exceso.

2. Jamás sembrar un producto biológico sospechoso de tener *Coccidioides* spp en medios contenidos en caja de Petri.

3. Cuando se obtiene el desarrollo de la colonia es conveniente no destapar los tubos; si esto fuera necesario, hágase en la campana de bioseguridad, desarrollando todo el proceso de identificación con el auxilio de este equipo. En caso de no disponer de éste, es mejor no destapar los tubos y establecer el diagnóstico con los demás procedimientos descritos anteriormente.

4. Antes de desechar los cultivos, es necesario esterilizarlos a 20 libras de presión por 20 minutos. Agregar formol a los tubos reduce considerablemente el riesgo de inhalación de conidios, pero no lo elimina radicalmente.

5. Cuando se observan laminillas en fresco, entre lámina y laminilla, que contienen esférulas, no conviene mantenerlas en el laboratorio por mucho tiempo, ya que en pocos días puede presentarse la conversión de la fase parasitaria a la fase micelial de *C. immitis* (fase infectante), con el consiguiente riesgo de inhalación accidental. En caso de ruptura accidental de los tubos que contienen la fase micelial de este hongo (véase el capítulo 12, "Medidas de seguridad").

PARACOCCIDIOIDOMICOSIS

DESCRIPCIÓN

Es una micosis crónica, granulomatosa, con afección primaria en el pulmón, la cual es inadvertida en la mayoría de los casos; suele diseminarse a la mucosa bucal, conjuntival, genital, a los ganglios linfáticos y a la piel, así como a diversos órganos internos. La enfermedad toma un curso grave y a veces fatal. El agente causal, *Paracoccidioides brasiliensis*, habita en suelos de clima tropical y la infección se adquiere por inhalación de los conidios. Es un hongo dimórfico que en la fase de vida libre presenta filamentos septados con es-

casos microconidios y en la fase parasitaria se observan levaduras redondas multigemantes.

Es una infección que se da exclusivamente en Latinoamérica, en casi todos los países, observándose las mayores casuísticas en Brasil, Colombia, Venezuela y Argentina. En México se tiene información de un gran número de casos, sobre todo en los últimos años. Afecta más a los hombres en una proporción aproximada de 20:1, sobre todo a los que realizan actividades rurales, entre los 20 y 50 años de edad.

La infección pulmonar suele cursar con una neumonitis bilateral, que en ocasiones se encuentra asociada a otro proceso neumónico. Pocas semanas después se disemina por la mucosa orofaríngea y conjuntival, provocando pequeñas úlceras exudativas poco dolorosas, así como por la piel. Además de las lesiones ulcerosas, pueden presentarse pequeños abscesos fistulizados. Las diseminaciones a los órganos internos, incluyendo el cerebro, revisten mucha gravedad, produciendo la muerte en la mayoría de los casos a pesar del tratamiento específico.

ESPECÍMENES BIOLÓGICOS

- Esputo.
- Exudado de úlceras.
- Material de biopsia.

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Examen directo. Para observar con precisión los elementos fúngicos se puede agregar a la muestra una gota de KOH al 15 % o lugol bacteriológico. En el microscopio se aprecian las levaduras redondas, cuya característica es la de tener dos o más brotes en la superficie en forma de "timón de barco". En ocasiones estos blastoconidios se disponen en forma catenulada y las gemaciones suelen tener una base muy estrecha. Las levaduras son, en ocasiones, ovales o elípticas; cuando son jóvenes miden entre 5 y 10 μm y las maduras de 30 a 50 μm (fig. 5.10).

Cultivo. *P. brasiliensis* es de crecimiento lento; los productos biológicos se siembran en medio de Sabouraud con antibióticos y se incuban a 26 °C por un periodo de 20 a 30 días; al cabo de éste se observan pequeñas colonias blancas o amarillentas, de superficie vellosa, con bordes bien definidos (fig. 5.11).

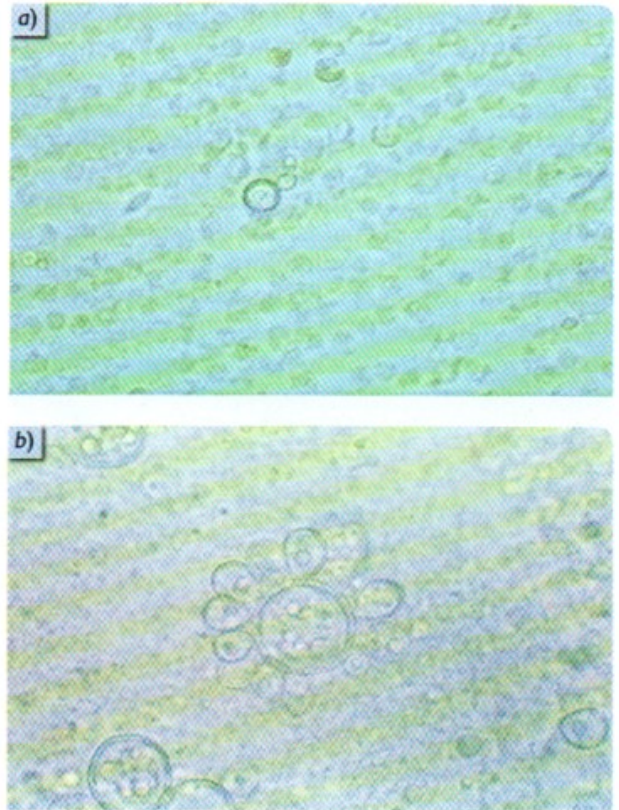


Fig. 5.10. Examen en fresco de *P. brasiliensis*. Se observa la levadura característica, multigemente, con cuello de gemación angosto: a) gemación sucesiva (10X); b) gemación múltiple (40X). (Cortesía de R. Victoria.)



Fig. 5.11. *P. brasiliensis*, colonia blanca, de superficie aterciopelada o filamentos, irregular y de crecimiento lento.

Es recomendable sembrar al mismo tiempo los productos biológicos en medios enriquecidos, como el agar sangre o el agar extracto de levadura adicionado con cloramfenicol, e incubarlos a 37 °C para obtener el desarrollo de la fase levaduriforme, entre 10 y 15 días. La observación microscópica de los cultivos de la fase filamentosa pone de manifiesto a las hifas septadas con escasos aleuriocónidios piriformes de conidióforo corto de 2 a 3 µm de diámetro (fig. 5.12). En ocasiones se observan clamidoconidios intercalares y artroconidios.

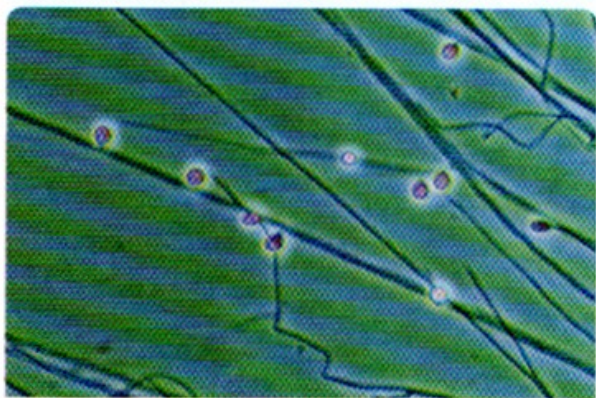


Fig. 5.12. Aspecto microscópico de *P. brasiliensis*. Micelio fino, septado y microconidios piriformes de 2 a 3 µm.

A partir del cultivo a 37 °C se observan levaduras redondas u ovales con multigemaciones periféricas. La morfología colonial de la fase filamentosa es indistinguible de la de *Blastomyces dermatitidis*, por lo que es indispensable hacer la conversión a la fase levaduriforme (fig. 5.13).

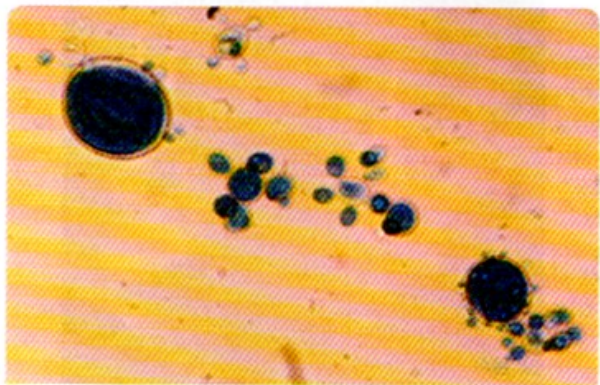


Fig. 5.13. *P. brasiliensis* en fase de transformación de micelio a levadura en medio de cultivo enriquecido. Se observan estructuras levaduriformes multigemantes.

Pruebas inmunológicas. Existen varias pruebas que pueden utilizarse, como las siguientes:

La reacción de fijación del complemento (RFC). Se realiza con el antígeno inmunodominante gp43.

La inmunodifusión en agar (ID). Ésta se realiza con antígeno de la fase levaduriforme, en la cual se pueden presentar tres bandas, siendo la primera y la segunda las específicas. Los títulos en las reacciones desaparecen muchos meses después de la curación de los pacientes. En ocasiones, estas reacciones pueden cruzar con sueros de pacientes con histoplasmosis y coccidioidomicosis. La inmunodifusión es específica y sensible en 90 % de los casos. Las técnicas de ELISA y de RFC son mucho más específicas y sensibles, pero dada la facilidad para realizar la ID se prefiere ésta en la mayoría de los laboratorios de diagnóstico.

Intradermorreacción (IDR). Esta prueba cutánea con paracoccidioidina es útil en encuestas epidemiológicas, ya que ayuda a revelar el grado de endemidad del padecimiento. Esta prueba también es útil para evaluar el curso clínico de la paracoccidioidomicosis, ya que, en casos graves, el estado de anergia hace desaparecer la positividad de la reacción. Los casos curados mantienen por largo tiempo la dermorreacción positiva. En bajo porcentaje la paracoccidioidina cruza con la histoplasmina, por lo que hay que tomar esto en consideración cuando se superponen las áreas endémicas de estas dos micosis.

Histopatología. Con la tinción de hematoxilina-eosina, en el tejido infectado se observan imágenes de reacción granulomatosa entremezcladas con abscesos piógenos y necrosis focal. Entre las zonas de macrófagos, histiocitos, linfocitos y células plasmáticas se observan las levaduras multigemantes. En las lesiones de la piel y las mucosas se aprecia una hiperplasia pseudoepiteliomatosa, con pequeños abscesos y reacción granulomatosa.

La imagen histológica es similar a la de la blastomicosis, por lo que es requisito identificar a las levaduras multigemantes que miden de 10 a 30 micras de diámetro. Estas estructuras son más fácilmente reconocibles cuando se tiñen los cortes con la técnica de PAS o con Grocott (impregnación argéntica) (fig. 5.14).

Deben extremarse los cuidados en el manejo de los cultivos de la fase filamentosa, ya que la

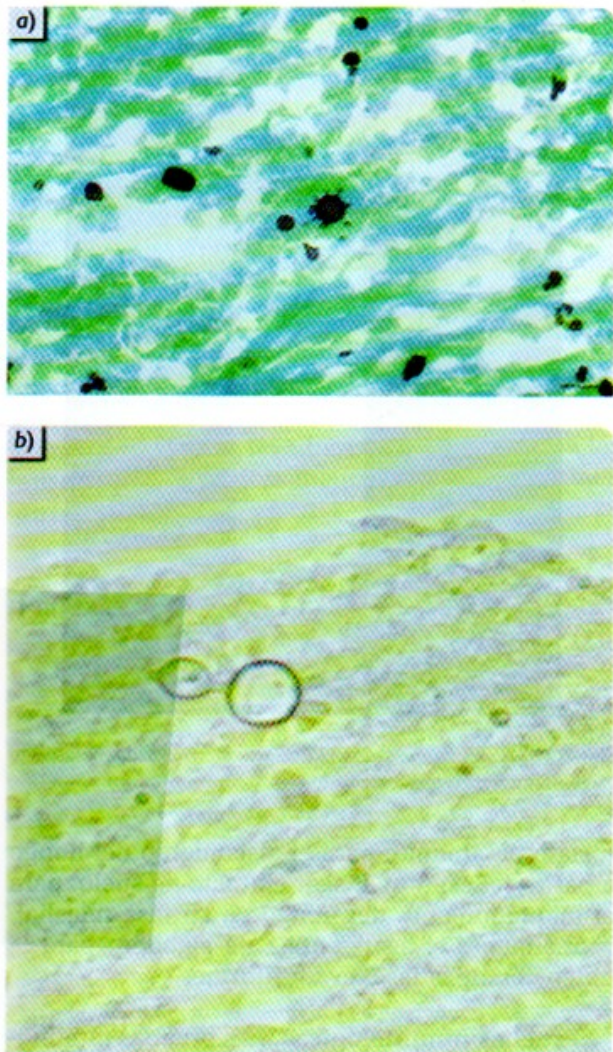


Fig. 5.14. Paracoccidioidomycosis, corte histológico: a) tinción de Grocott, en la que se observan las características levaduras multigermantes de color negro; b) corte teñido con Grocott modificado.

ruptura de un tubo o la inhalación directa de los conidios puede ocasionar una infección accidental de laboratorio.

En los casos en los que se sospeche el padecimiento, se recomienda hacer varias tomas de productos patológicos, en días sucesivos, hasta confirmar o descartar el diagnóstico.

Las reacciones serológicas para este fin son de gran utilidad. También tómesese en cuenta el lento crecimiento de las colonias, por lo cual no se deberán desechar los medios de cultivo antes de 30 días de su incubación.

BLASTOMICOSIS

DESCRIPCIÓN

La blastomicosis es una micosis que se caracteriza por lesiones cutáneas verrugosas y lesiones viscerales, sobre todo a nivel pulmonar. *Blastomyces dermatitidis* es el agente etiológico de este padecimiento. Este es un hongo dimórfico que en la naturaleza y en medios de cultivo mantenidos a 25 °C, se desarrolla en forma de micelio; pero cuando se desarrolla en el hospedero o en medios de cultivo mantenidos a 37 °C, es levaduriforme. Presenta, además, una fase teleomórfica (sexual) que lo ubica dentro de los Ascomycetes, en cuyo caso se llama *Ajellomyces dermatitidis*.

El hongo habita en el suelo de zonas agrícolas y su aislamiento es difícil.

El padecimiento es común en Norteamérica, de donde proceden la mayoría de los casos, principalmente en el valle del Mississippi. No se han reportado casos autóctonos en México, aun cuando se han diagnosticado pocos casos en inmigrantes procedentes de Estados Unidos de América.

El mayor número de casos se produce en zonas agrícolas. No hay distinción de raza y en cuanto al sexo, los hombres se muestran más susceptibles que las mujeres. El grupo etario más afectado se ubica entre los 30 y los 60 años de edad.

El mecanismo de infección es a través de la inhalación. La enfermedad también ha sido diagnosticada en mamíferos cánidos como el perro y el lobo. Todos los factores que deprimen la inmunidad favorecen la diseminación del padecimiento.

En general, la blastomicosis se divide en tres formas clínicas:

Pulmonar. Es el sitio donde se instala el agente etiológico y por lo general cura espontáneamente antes de diseminarse; algunas veces produce neumonía bilateral.

Cutánea. Es la más frecuente y mejor conocida y generalmente resulta de una diseminación hematogena; las lesiones cutáneas comienzan con pápulas que se extienden periféricamente, con bordes sinuosos y formando microabscesos. Las lesiones se tornan verrugosas, localizándose con mayor frecuencia en la cara, las manos y los pies. Esta forma clínica puede llevar al paciente a incapacidad física.

Generalizada. Es el resultado de la diseminación hematogena del agente etiológico por dife-

rentes órganos; con mayor frecuencia se afectan el hígado, los huesos y el tracto genitourinario. El pronóstico depende del cuadro clínico, aunque la mayoría de las veces es benigno, ya sea en los casos de localización pulmonar, en los casos de diseminación cutánea o cuando la terapia se instaure con oportunidad.

ESPECÍMENES BIOLÓGICOS

- Esputo.
- Pus de lesiones cutáneas.
- Producto de lavado bronquial.
- Material de biopsia.
- Suero.

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Examen directo. El esputo, los exudados o el material de biopsia se maceran en un mortero con solución salina; se toma una muestra de la suspensión, se agrega una gota de KOH al 15 % y se observa al microscopio. Se aprecia *B. dermatitidis* en forma de levaduras redondas, de pared gruesa, de 8 a 15 μm de diámetro, unigermantes, donde el blastoconidio está unido a la célula madre por medio de un cuello ancho; frecuentemente se observa un septo que separa a las dos células. El citoplasma es granular, con gran cantidad de corpúsculos refringentes, además de ser multinucleado.

Frotis. A partir de exudados o de improntas se efectúan las tinciones de rutina, ya sean simples o compuestas, y en ellas se observan con mayor claridad las estructuras descritas anteriormente.

Cultivo. En el medio de Sabouraud adicionado con antibióticos, incubado entre 22 y 28 °C, se obtienen colonias blancas, vellosas y con pliegues radiales (fig. 5.15). Al microscopio se observa un micelio muy fino, con conidios redondos u ovoides, de 3 a 5 μm de diámetro, que pueden ser sésiles o portados por conidióforos cortos, muy parecidos a los de *P. brasiliensis* (véase fig. 5.12).

En medios enriquecidos, como el BHI, incubado a 37 °C, se obtiene el crecimiento de colonias levaduriformes, planas, pastosas y de color amarillento. Al microscopio se observan las típicas levaduras redondas, multinucleadas y unigermantes, similares a la forma parasitaria.

Otros medios de cultivo que se utilizan para el estudio de *B. dermatitidis* son: el agar-levadura

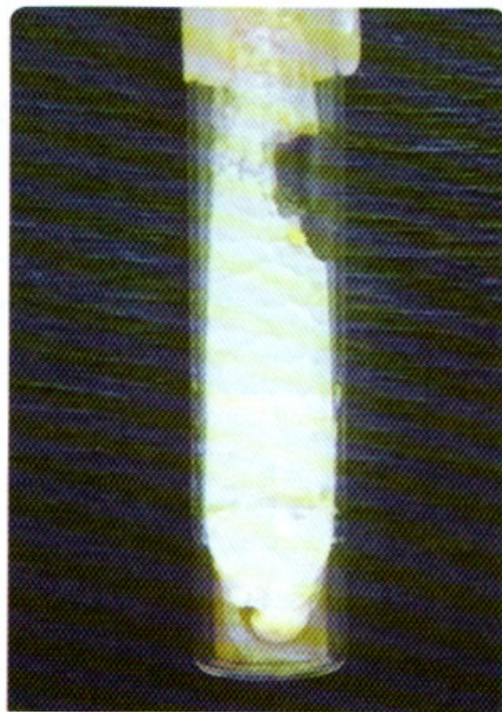


Fig. 5.15. *B. dermatitidis*. Colonia blanca, aterciopelada, de aspecto cerebriforme y de crecimiento lento.

fosfato de amonio, para el aislamiento del hongo a partir del esputo; el agar extracto de suelo, para el mantenimiento del hongo en su fase micelial, y finalmente el agar-semilla de algodón, para la obtención de la fase levaduriforme.

Pruebas inmunológicas. Las pruebas inmunológicas más importantes son:

Doble inmunodifusión (ID). Es la prueba más sensible y específica, ya que da 80 % de resultados positivos, siempre que los sueros estén recién obtenidos.

Reacción de fijación de complemento (RFC). Es altamente sensible, pero con un gran número de resultados falsos positivos.

Técnica de ELISA. Presenta una alta especificidad, aunque su uso no está muy extendido.

Intradermorreacción (IDR). Esta prueba cutánea de hipersensibilidad de tipo tardío con blastomicina da 41 % de respuestas positivas en pacientes con blastomycosis diseminada crónica; en las formas pulmonares el porcentaje aumenta. Esta prueba tiene la misma utilidad que otras IDR aplicadas a las micosis sistémicas.

Con cualquier técnica serológica usada se deberá tener en cuenta la aparición de reacciones cruzadas en sueros de pacientes con histoplasmosis, coccidioidomicosis y paracoccidioidomicosis.

Histopatología. La reacción tisular varía desde una reacción granulomatosa epiteliode hasta la supuración, necrosis y fibrosis o la combinación de todas ellas. En la forma crónica, la reacción es una hiperplasia granulomatosa, mientras que en la forma sistémica se encuentra generalmente supuración y necrosis con la presencia de gran número de microorganismos. Los cortes histopatológicos teñidos con PAS o Gomori Grocott demuestran fácilmente las levaduras unigemantes con las mismas características mencionadas en el examen directo (fig. 5.16).

PRUEBA ESPECIAL

Exoantígenos. Véase Histoplasmosis.

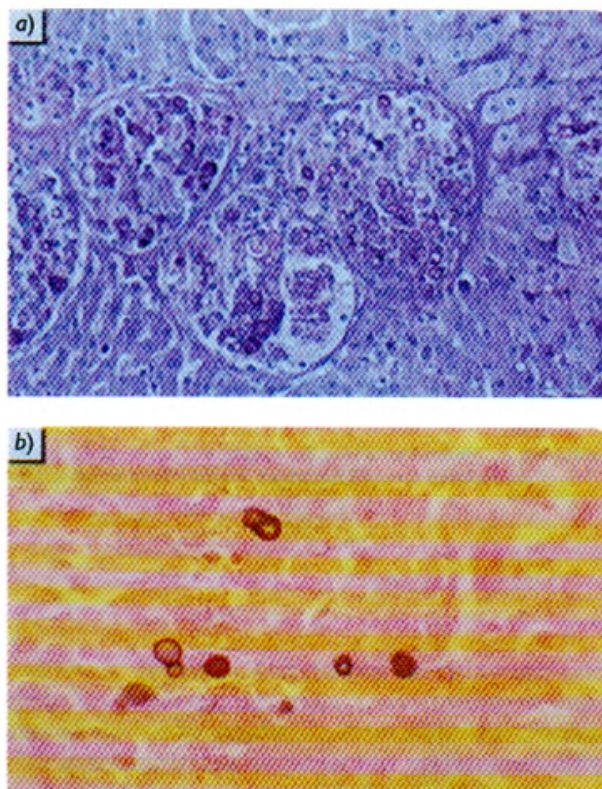


Fig. 5.16. Blastomicosis. Corte histológico, donde se observan las levaduras unigemantes de cuello amplio que son características de *B. dermatitidis*: a) tinción con PAS sin contraste; b) tinción de Grocott modificado.

BIBLIOGRAFÍA

- Abuodeh, R. O., Galgiani, J. N. y Scalarone, G. M., "Molecular approaches to the study of *Coccidioides immitis*", *Int. J. Med. Microbiol.*, **292**:373, 2002.
- Ameni, G. y Siyoum, F., "Study on Histoplasmosis (epizootic lymphangitis) in carthorses in Ethiopia", *J. Vet. Sci.*, **3**:135, 2002.
- Assaly, R. A., Hammersley, J. R. y cols., "Disseminated blastomycosis", *J. Am. Acad. Dermatol.*, **48**:123, 2003.
- Baumgardner, D. J. y Laundre, B., "Studies on the molecular ecology of *Blastomyces dermatitidis*", *Mycopathologia*, **152**:51, 2001.
- Botteon, F. A., Camargo, Z. P. y cols., "Paracoccidioides brasiliensis-reactive antibodies in Brazilian blood donors", *Med. Mycol.*, **40**:387, 2002.
- Calle, D., Rosero, D. S. y cols., "Paracoccidioidomycosis in Colombia: An ecological study", *Epidemiol. Infect.*, **126**:309, 2001.
- Calza, L., Manfredi, R. y cols., "Disseminated histoplasmosis with atypical cutaneous lesions in an Italian HIV-infected patient: another autochthonous case", *HIV Med.*, **4**:145, 2003.
- De Groote, M. A., Bjerke, R. y cols., "Expanding epidemiology of blastomycosis: clinical features and investigation of two cases in Colorado", *Clin. Infect. Dis.*, **30**:582, 2000.
- Fisher, M. C., Koenig, G. L. y cols., "Molecular and phenotypic description of *Coccidioides posadasii* sp. nov., previously recognized as the non California population of *Coccidioides immitis*", *Micología*, **94**:73, 2002.
- González-Ochoa, A., "La coccidioidomicosis en México", *Rev. Invest. Salud Públ.*, México, **26**:245, 1966.
- González-Ochoa, A. y Félix, D., "Distribución geográfica de la reactividad cutánea a la histoplasmosis en México", *Rev. Inst. Salubr. Enferm. Tro.*, México, **31**:74, 1971.
- Kaufman, L., Valero, G. y Padhye, A. A., "Misleading manifestations of *Coccidioides immitis* in vivo", *J. Clin. Microbiol.*, **36**:3721, 1998.
- Klein, B. S., Vergeront, J. M. y Davis, J. P., "Epidemiologic aspects of blastomycosis, the enigmatic systemic mycosis", *Semin. Respir. Infect.*, **1**:29, 1986.

- Kleinschmidt-DeMasters, B. K., Mazowiecki, M. y cols., "Coccidioidomycosis meningitis with massive dural and cerebral venous thrombosis and tissue arthroconidia", *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **124**:310, 2000.
- Kolivas, K. N. y Comrie, A. C., "Modeling valley fever (coccidioidomycosis) incidence on the basis of climate conditions", *Int. J. Biometeorol.*, **47**:87, 2003.
- Pappas, P. G. y Dismukes, W. E., "Blastomycosis: Gilchrist's disease revisited", *Curr. Clin. Top. Infect. Dis.*, **22**:61, 2002.
- Restrepo, A., McEwen, J. G. y Castañeda, E., "The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle?", *Med. Mycol.*, **39**:233, 2001.
- San Blas, G., "Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*", *J. Med. Vet. Mycol.*, **31**:99, 1993.
- San-Blas, G., Nino-Vega, G. e Iturriaga, T., "Paracoccidioides brasiliensis and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics", *Med. Mycol.*, **40**:225, 2002.
- Taylor, M. L., Chávez-Tapia, C. B. y cols., "Environmental conditions favoring bat infection with *Histoplasma capsulatum* in Mexican shelters", *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **61**:914, 1999.
- Taylor, M. L., Chávez-Tapia, C. B. y Reyes-Montes, M. R., "Molecular typing of *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats, captured in Mexico", *Fungal Genet. Biol.*, **30**:207, 2000.
- Velasco-Castrejón, O. y González-Ochoa, A., "Coccidioidomycosis adquirida por inhalación en la ciudad de México. Un caso atípico desde los puntos de vista epidemiológico y patogénico", *Rev. Inv. Salud. Publ.*, México, **1**:97, 1975.
- Velásquez, R., Muñoz-Hernández, B., Arenas, R., Taylor, M. L., Hernández, F., Manjarréz, M. E., López-Martínez, R., "An imported case of *Blastomyces dermatitidis* infection in México", *Mycopathologia*, **156**:263, 2003.

Micosis oportunistas

CANDIDOSIS

DESCRIPCIÓN

La candidosis o candidiasis es la micosis oportunista más frecuente. Es una infección aguda o crónica de las mucosas, piel, uñas o tejidos profundos, causada por levaduras del género *Candida*.

En general afecta a todos los grupos de edad, sexo, raza y ocupación, aunque algunos tipos particulares de candidosis afectan con mayor fre-

cuencia a determinados grupos de personas; por ejemplo, la candidosis bucal muestra mayor incidencia en los lactantes, la mucocutánea crónica y la granulomatosa se observan preferentemente en preescolares y la candidosis intertriginosa en adultos obesos y diabéticos.

Candida es una levadura comensal del hombre, que habita en la piel, mucosas, vías respiratorias altas y tractos genitourinario y digestivo; existen características generales que ayudan a identificar a *Candida* de otras especies de levaduras (cuadro 6.1).

Cuadro 6.1. Identificación de los principales géneros de levaduras.

Género	Micelio	Pseudomicelio	Arthroconidios	Cápsula	Germación múltiple	Germación polar	Pigmento carotenoides	Fermentación	Ureasa	Asimilación del inositol	Reducción de nitratos
<i>Cryptococcus</i>	-*	+**	-	+	+	+	-	-	+	+	V***
<i>Malassezia</i>	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
<i>Trichosporon</i>	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
<i>Rhodotorula</i>	-	V	-	V	+	-	+	-	+	-	-
<i>Candida</i>	V	V	-	-	+	-	-	+	-	-	-

* Carácter ausente.

** Carácter presente.

*** Carácter variable.

Lo que determina la adquisición de la candidosis es la presencia de factores de oportunismo que predispongan a un individuo, como diabetes, carcinomas, leucemia, prematuridad, endocrinopatías, trasplantes, cirugías, terapias directamente inmunosupresoras, administración de antimetabolitos, antibióticoterapia, anticonceptivos, drogadicción y diversas inmunopatías, como leucopenias o neutropenias.

Según F. Odds, existen aproximadamente 200 especies de *Candida*; sin embargo, son menos de 20 las especies asociadas a infección en mamíferos. La especie más frecuentemente relacionada con patologías es *C. albicans*, seguida por *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. tropicalis*.

Los hongos del género *Candida* son levaduras redondas u ovaladas de 3 a 7 μm de diámetro, que se reproducen por blastoconidios, además de que algunas especies forman pseudomicelio y otras como *C. albicans* y *C. dubliniensis* incluso forman micelio verdadero y clamidoconidios.

Ninguna de las especies presenta pigmento carotenoide, ni asimila el inositol y todas ellas carecen de cápsula. Cada especie tiene capacidades de asimilación de carbohidratos y compuestos nitrogenados, así como de fermentación de carbohidratos que las identifica (fig. 6.1).

Esas características hacen fácilmente distinguible

a cada especie y todas se han clasificado dentro del filo Ascomycota e incluso en algunas de ellas se ha descrito la forma sexual.

La fuente de infección puede ser exógena, a través de venoclisis, cirugía cardíaca, alimentación parenteral, etc; sin embargo, en la mayoría de los casos, la fuente de infección es endógena y se desarrolla a partir de los sitios donde *Candida* habita como comensal.

La gravedad de la candidosis está en función del nivel de inmunodepresión del paciente. En general, en la candidosis superficial el pronóstico es bueno, pero en algunos casos de candidosis sistémica la evolución es fatal.

Las formas clínicas dependen de la localización de la infección y las principales son:

Cutánea. Se presentan lesiones típicamente eritematosas, papulosas o vesiculopustulosas, exudativas y con placas blancas, de márgenes bien definidos y en algunas ocasiones con pústulas periféricas, con prurito moderado, presencia de grietas y dolor. Aparecen principalmente en pliegues de flexión e intertrigos.

Onicomycosis. Las uñas de las manos son las que se afectan con mayor frecuencia. Hay eritema alrededor de la uña y edema doloroso (paroni-

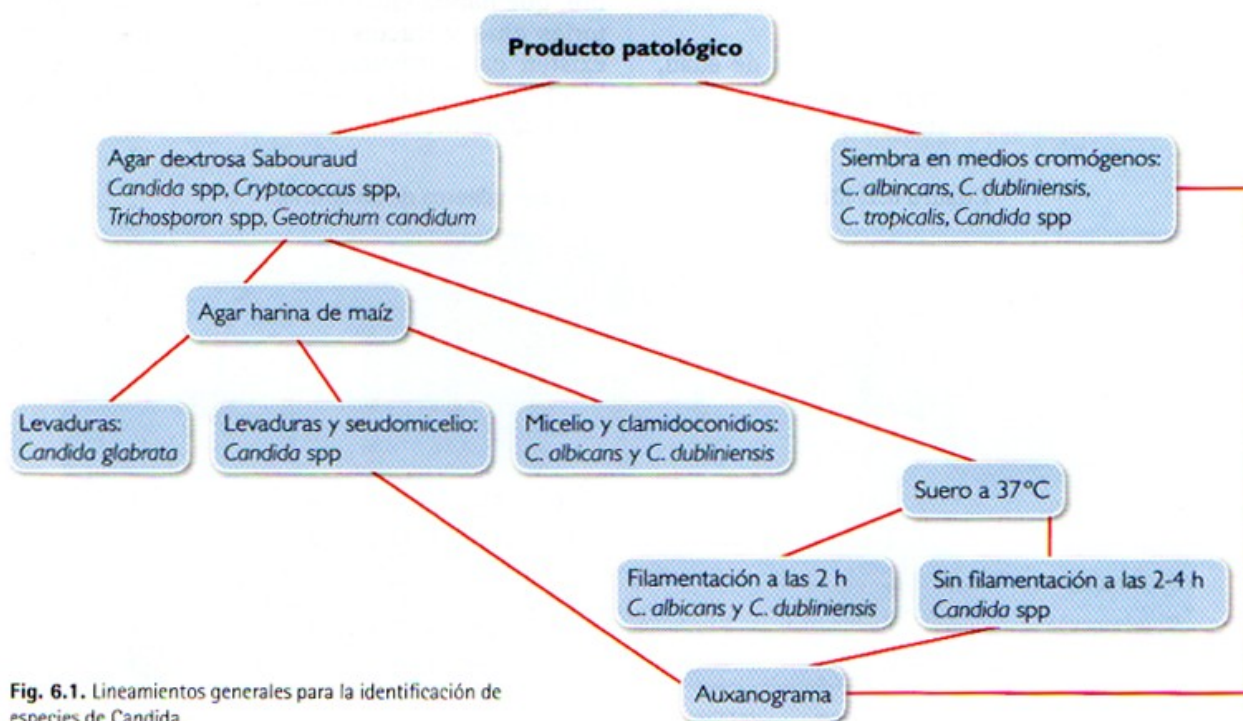


Fig. 6.1. Lineamientos generales para la identificación de especies de *Candida*.

quia). La infección crónica afecta el crecimiento de la uña, produciendo surcos transversales o longitudinales. La queratina de las uñas toma un color que va desde el amarillo hasta el negro pardo; con frecuencia hay desprendimiento de la parte distal de la uña (onicólisis).

Membranas mucosas. Afecta principalmente a la boca, al surco balanoprepucial, a la vagina y a la conjuntiva. Predomina un enantema doloroso con exudado blanco o beige, por debajo del cual puede haber petequias o erosiones hemorrágicas que suelen ulcerarse. En algunas ocasiones se puede presentar con escamas lamelares y costras serosas. En la vaginitis hay leucorrea, dispareunia y prurito.

Candidosis sistémica. Los signos y síntomas son inespecíficos y suele confundirse fácilmente con infecciones bacterianas o de otras etiologías. Generalmente se presenta fiebre irregular, astenia, adinamia y mal estado general; esta sintomatología se acompaña de la ocasionada por el órgano o sistema afectado.

Candidosis gastroesofágica. Se presenta hemorragia gástrica, disfagia, vómito y dolor retroesternal intenso, cuadro indistinguible de otras patologías frecuentes a este nivel.

Candidosis intestinal. Los datos clínicos más sobresalientes son diarreas con evacuaciones mucosas de color blanco, dolor abdominal moderado y meteorismo.

Candidosis pulmonar. Frecuentemente se presenta el síndrome neumónico caracterizado por tos, dolor torácico, disnea y esputo blanco.

Candidosis urinaria. Puede ser únicamente de riñón, en cuyo caso las manifestaciones son las de una pielonefritis; en la localización vesical y uretral se presenta polaquiuria, dolor vesical y manifestaciones de uretritis.

ESPECÍMENES BIOLÓGICOS

- Escamas de piel y uñas.
- Exudados de lesiones cutáneas y mucosas.
- Esputo (tres muestras consecutivas).
- Productos obtenidos de cepillado y lavado bronquial.
- Orina.
- Materia fecal.
- Líquido cefalorraquídeo.
- Sangre.
- Material de biopsia.
- Suero.

Otros productos: fragmentos de sondas, de catéteres, prótesis cardíacas o cualquier otro material sospechoso de ser el vehículo infeccioso

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Examen directo. Este procedimiento es recomendable para identificar las levaduras, hifas y/o pseudohifas en muestras patológicas líquidas o semilíquidas, como orina, exudados, líquido cefalorraquídeo o esputo. La observación se hace de preferencia con óptica de contraste de fase, o cerrando el diafragma del microscopio con el fin de visualizar bien el contorno de las estructuras fúngicas.

Se debe proceder según sea el tipo de muestra. La orina y el líquido cefalorraquídeo se centrifugan y se toman unas gotas del sedimento. Las escamas se tratan con KOH al 15 %.

Al frasco con esputo se le agregan 5 o 10 ml de hidróxido de sodio (NaOH) al 15 % para hidrolizar y los exudados diversos pueden procesarse con solución fisiológica. Las células redondas u ovaladas con blastoconidios y en algunas ocasiones con pseudofilamentos o filamentos verdaderos son características de *Candida* (fig. 6.2).

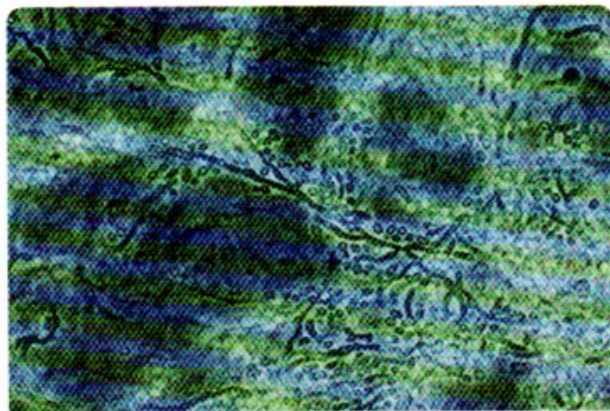


Fig. 6.2. Examen directo de exudado vaginal. Se observan levaduras y pseudofilamentos de *Candida* spp.

Frotis. Con excepción de las escamas de piel y uñas, con cualquiera de los especímenes se puede realizar un frotis, el cual se tiñe con la técnica de Gram, observándose claramente las levaduras redondas o alargadas, con o sin filamentos, todas grampositivas, o teñirlas con la coloración de PAS (fig. 6.3).

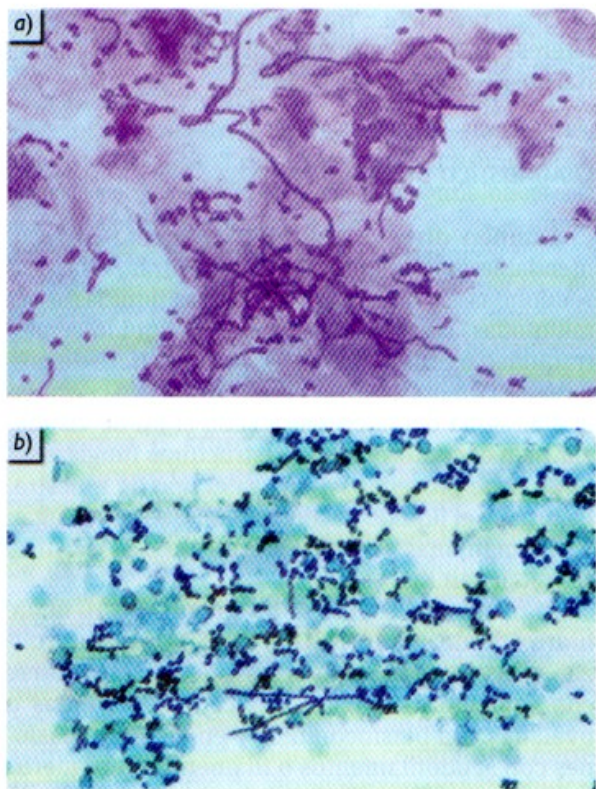


Fig. 6.3. Levaduras y seudofilamentos de *C. albicans*: a) escamas de piel teñidas con eritrosina; b) materia fecal teñida con PAS.

Se deberá descartar la posibilidad de que los elementos fúngicos observados sean parte de la biota comensal. El criterio para considerar la presencia de *Candida* con significado patológico en productos provenientes de sitios donde habita normalmente es encontrarla en número abundante (incontables levaduras, hifas o pseudohifas en tres muestras consecutivas). En cambio, en todos los productos patológicos provenientes de tejidos y de órganos internos, la presencia de una o más levaduras o estructuras filamentosas en el frotis o en el examen directo tiene significado patológico.

Cultivo. Los productos se siembran en agar dextrosa Sabouraud, con y sin cicloheximida (Acridiona®). Se incuban a una temperatura de 25 a 30 °C durante cinco días, periodo en el que se desarrollan colonias cremosas blanco-amarillentas, lustrosas, poco elevadas y con bordes bien definidos (fig. 6.4).

Para que el cultivo tenga valor diagnóstico, debido al carácter comensal de *Candida*, se deberá aislar a la levadura en un mínimo de tres muestras consecutivas y en forma abundante cuando

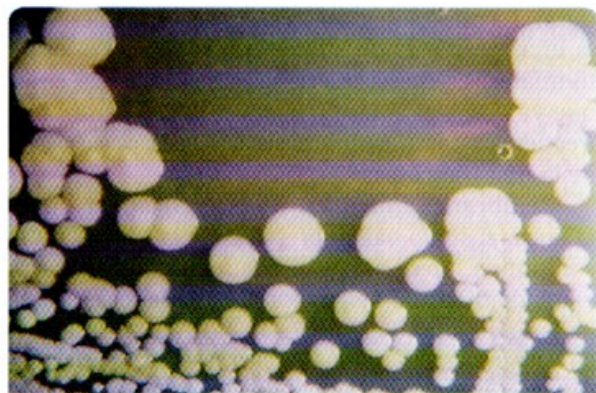


Fig. 6.4. *C. albicans* en medio de Sabouraud simple. Colonias blancas, húmedas, brillantes, redondas y de bordes bien definidos.

el producto biológico proceda de la piel, las uñas, las mucosas, el tracto respiratorio y el digestivo; en cambio, cuando proceda de biopsias, sangre, orina tomada por punción suprapúbica y de líquidos y exudados internos, basta la presencia de una colonia para que tenga significado patológico.

Además de los productos biológicos, los fragmentos de catéteres, sondas o válvulas cardíacas también pueden ser cultivados en los medios mencionados, una vez cortados en pequeños fragmentos con tijeras estériles.

Pruebas para identificación de especies. En el cuadro 6.2 se anotan las principales características bioquímicas y fisiológicas que permiten diferenciar a las diversas especies de *Candida*. Las pruebas usadas con mayor frecuencia son:

Producción de clamidoconidios. Se realiza sembrando en estría las colonias de *Candida* en un medio de harina de maíz, en agar harina de arroz o en agar Níger. Al cabo de tres a cinco días se observan con facilidad los clamidoconidios, hifas y blastoconidios en un examen microscópico, si el aislado estudiado corresponde a *C. albicans* o a *C. dubliniensis* (fig. 6.5). En el caso de presentarse exclusivamente levaduras con blastoconidios, entonces el aislado se identificará como *C. glabrata*.

Filamentación en suero humano a 37 °C. Solamente *C. albicans* y *C. dubliniensis* producen abundantes tubos germinativos (más de 50 %) cuando se siembra una asada del cultivo en estudio en 0.5 ml de suero fresco humano o de conejo. Se incuban a 37 °C por al menos dos horas y se hace la lectura al microscopio (fig. 6.6).

Medios de cultivo cromógenos. Son medios nutritivos para aislar y diferenciar levaduras a partir

Cuadro 6.2. Identificación de *Candida* spp.

Organismo	Sudomicelio	Micelio verdadero y clamidoconidios	Filamentación en suero a 37 °C	Actidiona	Auxanograma									Zimograma					
					Indispensable					Opcional				Glucosa	Maltosa	Sacarosa	Galactosa	Lactosa	Rafinosa
					Glucosa	Maltosa	Sacarosa	Galactosa	Lactosa	Rafinosa	Inositol	Celobiosa	Xylosa	Trehalosa					
<i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
<i>C. glabrata</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>C. tropicalis</i>	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-
<i>C. krusei</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>C. kefyr</i>	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	V	-	+	-	+	+	+
<i>C. guilliermondii</i>	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+
<i>C. zeylanoides</i>	+	-	-	-	+	+	+	V	-	-	-	-	-	+	V	-	-	-	-
<i>C. lusitanae</i>	-	-	-	-	+	+	+	V	-	-	-	+	+	+	+	V	±	V	-

Auxanograma = medio sintético con peptona y sin carbohidratos
 Zimograma = medio peptonado, indicador pH, anaerobio
 Actidiona + = resistente
 Actidiona - = sensible
 V = variable

Tomada y modificada de Segretain, G., E. Drouhet y F. Mariat (1987).

Fig. 6.5. Producción de clamidoconidios en agar Niger: a) únicos o solitarios de pared gruesa característicos de *C. albicans*; b) clamidoconidios en racimos abundantes de *C. dublinensis*.

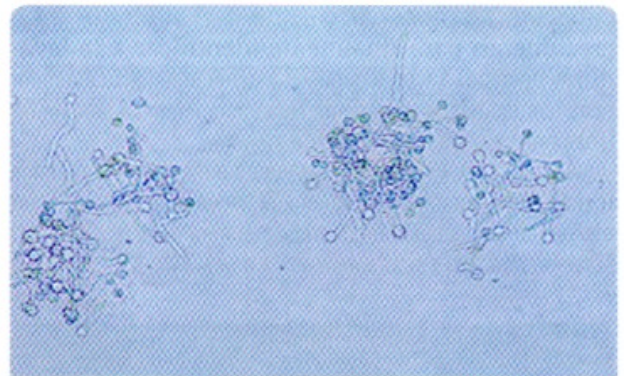
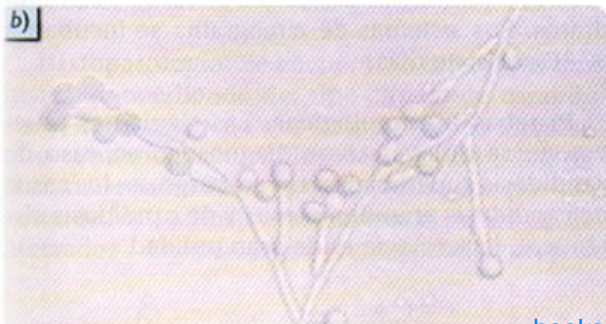
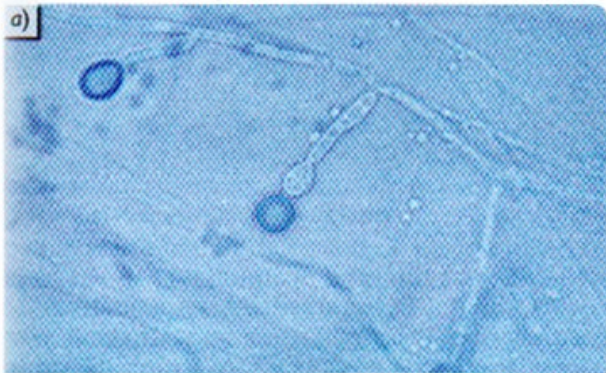


Fig. 6.6. Pruebas de filamentación en suero positiva. *C. albicans* produce gran cantidad de tubos germinativos a partir de las levaduras.

del cultivo de especímenes clínicos por el color de la morfología colonial, lo que permite identificar a las levaduras incluso en cultivos mixtos. El fundamento es la capacidad de las especies de hidrolizar diferentes sustratos cromógenos. Los medios pueden ser caseros como el agar BIGGY (bismuth-glucose-glycine-yeast) o agar Pagano-Levin, pero actualmente el comercio ofrece marcas como CHROMagar™Candida (fig. 6.7) o el chromID™ Candida o CandiSelect™.

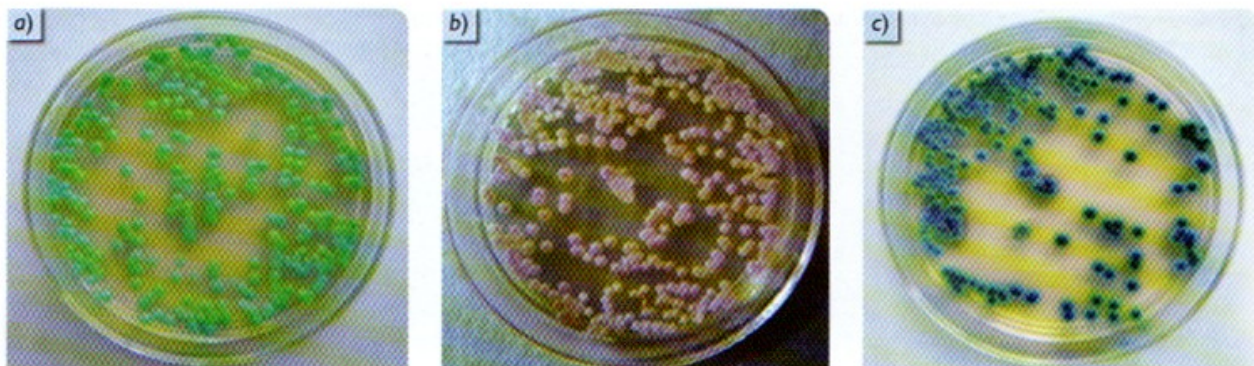


Fig. 6.7. Cultivo de tres especies en CHROMagar Candida: a) *C. albicans* (verde claro); b) *C. parapsilosis* (rosa pálido) y c) *C. tropicalis* (azul intenso). (Cortesía de la doctora Patricia Manzano.)

Auxanograma. Se puede emplear el auxanograma del nitrógeno o del carbono. Este último es el más utilizado. A través del patrón de asimilación de azúcares se identifican las diferentes especies de levaduras.

El auxanograma puede efectuarse de manera tradicional en placas con discos de papel impregnados con concentraciones estándar de diferentes azúcares (fig. 6.8) o en tubo, en donde los azúcares se encuentran en solución. Posterior a la incubación, se observa en qué carbohidrato hubo crecimiento para finalmente identificar a la levadura, comparando los resultados de la asimilación con los cuadros de identificación incluidos en los libros de micología médica.

Asimismo, los laboratorios han desarrollado métodos semiautomatizados de auxanograma como el API 20C®, el ID 32C® o el Auxacolor®, así como sistemas automatizados como el MicroScan®, el

VITEK®1 o 2 o el método Crystal GP® (fig. 6.9). Las principales ventajas de los métodos comerciales son la rapidez de ejecución con un mayor número de sustratos, que contribuyen a una mejor confiabilidad de identificación.



Fig. 6.9. Identificación de levaduras mediante auxanograma automatizado por VITEK®.

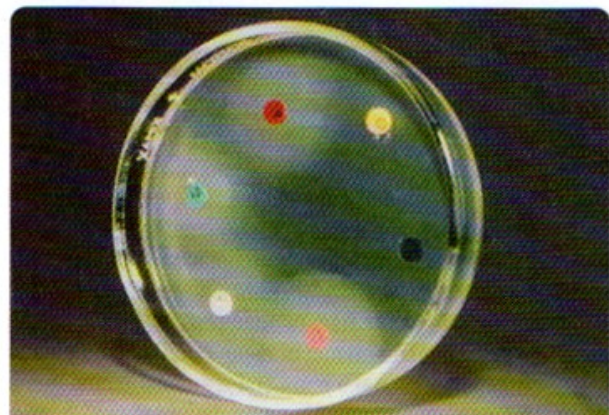


Fig. 6.8. Auxanograma del carbono. Los halos de crecimiento, alrededor de los discos, indican la asimilación del azúcar correspondiente.

Zimograma. Las propiedades fermentativas de cada especie de *Candida* son características y se demuestran por la producción de ácido y de gas en medios líquidos que contienen diferentes carbohidratos. Los sistemas de zimograma se incuban a 37 °C por siete días.

Pruebas inmunológicas. Las siguientes pruebas no se utilizan como diagnóstico en caso de candidosis superficiales; sin embargo, en los casos de candidosis granulomatosas y de candidosis sistémicas, la serología es de gran utilidad.

Doble inmunodifusión. La presencia de dos o más bandas tiene valor diagnóstico; es de gran utilidad en candidosis profundas.

Contrainmunolectroforesis. Se observa el mismo número de bandas que en la doble inmunodifusión y tiene la ventaja de ser positiva en sólo 45 minutos.

Reacción de aglutinación de látex. Es muy sensible y específica. Las candidosis superficiales pueden dar la reacción positiva; sin embargo, los títulos de 1:4 o más corresponden generalmente a las formas sistémicas.

Inmunofluorescencia indirecta. Anticuerpo antimicelio de *C. albicans*®, prueba que identifica la presencia de anticuerpos frente al antígeno del micelio de *C. albicans*, pero también es positiva en pacientes con candidiasis invasora por *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* y *C. dubliniensis*. Tiene gran utilidad para el diagnóstico y el seguimiento de la respuesta que desarrolla el paciente frente al tratamiento administrado. Títulos iguales o superiores a 1/160 son compatibles con la existencia de candidosis invasiva.

ELISA. Es la prueba serológica de elección, pues su sensibilidad y especificidad son bastante confiables. Comercialmente: Platelia Candida Ag® identifica el antígeno manano en suero. Las distintas especies que presentan reacción positiva son: *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. famata*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. lusitanae* y *C. tropicalis*. Presenta reacción cruzada frente a los géneros *Aspergillus* y *Cryptococcus*. Platelia, Candida Ab/Ac/Ak® identifica anticuerpos frente al antígeno manano.

Intradermorreacción. La prueba de hipersensibilidad retardada efectuada con la inoculación de 0.1 ml de candidina vía intradérmica en el paciente no se considera con valor diagnóstico cuando es positiva; sin embargo, es útil para valorar, junto con la aplicación intradérmica de otros antígenos, el estado de la inmunidad celular del paciente. En quienes son anérgicos y cursan con candidosis granulomatosa, mucocutánea o diseminada y en quienes la intradermorreacción es negativa el pronóstico es grave.

Histopatología. Se encuentran diferentes imágenes, dependiendo del tipo clínico de candidosis y del tiempo de evolución. En los abscesos que contienen neutrófilos degenerados, los elementos levaduriformes están rodeados por una zona de histiocitosis en la mayoría de los tejidos afectados. En pacientes inmunodeficientes, la

reacción celular es mínima o ausente. Cuando se llegan a formar granulomas, éstos están constituidos por un infiltrado crónico inflamatorio, células gigantes e histiocitos. En algunas ocasiones se presentan reacciones necróticas y formación de úlceras. En cualquier caso, los elementos fúngicos (levaduras, micelio y pseudomicelio) se observan fácilmente (fig. 6.10). En los cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina se dificulta la observación del hongo, por lo cual se deberán utilizar, además, las tinciones de PAS o de Grocott.

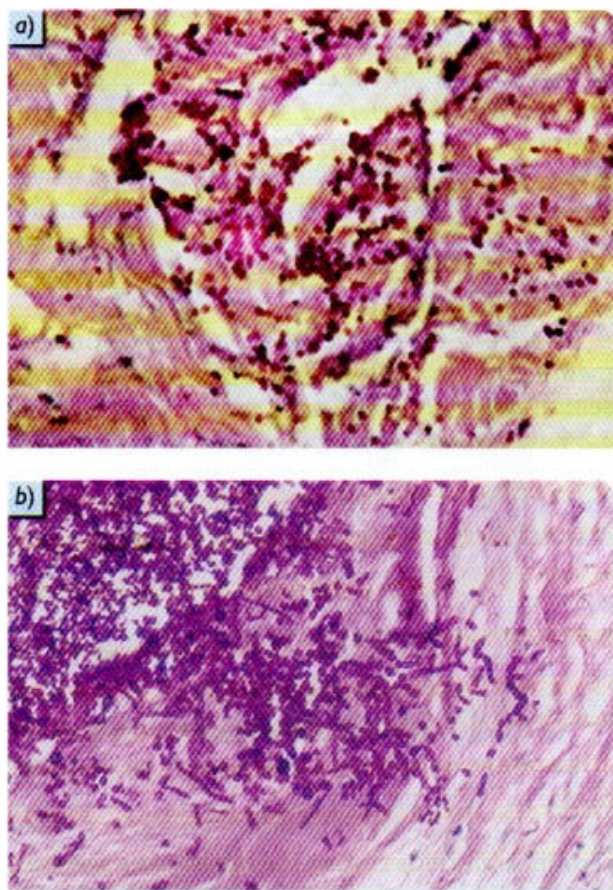


Fig. 6.10. Imágenes de candidosis invasiva, ambas teñidas con PAS, donde se observan abundantes levaduras y filamentos: a) piel de pene; b) corte de endocardio.

Inoculación en animales. Este procedimiento no es útil como método diagnóstico; sin embargo, se usa ampliamente para reproducir modelos experimentales y para la valoración de drogas en condiciones naturales. *C. albicans* es la única especie virulenta para animales de laboratorio, como el ratón, el conejo y el cobayo, los cuales

son susceptibles a la infección cuando se administra el inóculo vía intravenosa. Otras especies de *Candida* pueden afectar a los animales mencionados, siempre que el inóculo sea administrado en grandes dosis o que se inmunodeprima al animal. Aun en estas condiciones no se produce, generalmente, una invasión progresiva en los tejidos y las infecciones suelen ser efímeras.

CRIPTOCOCOSIS

DESCRIPCIÓN

La criptococosis es una micosis oportunista que se presenta en forma aguda, subaguda o crónica, producida principalmente por los hongos levaduriformes y encapsulados *Cryptococcus neoformans* (vars. *grubii* y *neoformans*) y *C. gattii*. En la mayoría de los casos la infección es pulmonar primaria y se disemina principalmente hacia el sistema nervioso central, los huesos y la piel. En pocos casos se describen infecciones cutáneas primarias.

El género *Cryptococcus* incluye aproximadamente 37 especies que morfológicamente se presentan como levaduras redondas o esféricas de 2 a 7 µm de diámetro, con presencia de una cápsula compuesta principalmente de polisacáridos, con la cual se alcanza un tamaño de 20 µm de diámetro.

Las especies patógenas *C. neoformans* y *C. gattii* presentan diferentes determinantes antigénicos, por lo que se han subtipificado en cuatro serotipos dominantes: serotipo A (*C. neoformans* var. *grubii*), B y C (*C. neoformans* var. *gattii*) y D (*C. neoformans* var. *neoformans*).

La fase sexual de estos microorganismos corresponde a *Filobasidiella neoformans* y *F. bacillipora*, ubicadas en el filo Basidiomycota. Existen serotipos híbridos como el AD, BD o AB creados a través de la cruce de tipos sexuales opuestos.

C. neoformans tiene una amplia distribución mundial, mientras que *C. gattii* aparentemente tiene hábitats más restringidos; sin embargo, los casos de criptococosis son reportados en todo el mundo. No hay predilección por algún grupo etario, racial u ocupacional y en general hay predominio en el sexo masculino. En realidad un factor importante para la adquisición de la micosis es la presencia de inmunocompromiso en el paciente.

C. neoformans se encuentra asociado a la materia fecal de diferentes aves, principalmente aque-

llas pertenecientes al orden columbiformes (palomas, pichones, tortolitas, etc.), aunque también ha sido aislado de frutas y vegetales. *C. gattii* ha sido aislado de la naturaleza, a partir de materiales vegetales de árboles de *Eucalyptus* spp, *Mouquilea tomentosa*, *Terminalia cattapa* (árbol del almendro), del enebro (*Juniperus virginiana*) en diferentes países de América y Oceanía.

Entre los factores conocidos que favorecen a la infección están: el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida), la leucemia, el lupus eritematoso, la sarcoidosis, la enfermedad de Hodgkin y la administración de corticosteroides por tiempo prolongado.

Después de la inhalación de las levaduras, la infección se puede resolver espontáneamente en casi 90 % de los casos; sin embargo, cuando el estado inmunológico del paciente es deficiente, la enfermedad se manifiesta con signos y síntomas neurológicos y casi siempre con mal pronóstico.

En las formas pulmonares, los síntomas son muy semejantes a los causados por otras infecciones de vías respiratorias y en ocasiones estas manifestaciones son inadvertidas. Las levaduras pueden diseminarse a cualquier órgano o tejido, pero esencialmente tienen afinidad por las meninges y el cerebro.

Cuando *C. neoformans* o *C. gattii* alcanzan esos sitios, la sintomatología corresponde básicamente a una meningitis, observándose rigidez de la nuca, vómito en proyectil, cefalea e hipertensión endocraneana. Si la neurocriptococosis se diagnostica oportunamente y se instaura la terapia tratando de corregir el factor o los factores predisponentes, el pronóstico es favorable para el paciente.

ESPECÍMENES BIOLÓGICOS

- Espudo.
- Líquido cefalorraquídeo.
- Exudados.
- Orina.
- Líquido prostático.
- Material de biopsia.
- Suero.

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Examen directo. Es el método de elección para el diagnóstico inicial y se recomienda practicarlo

por rutina en todos los casos con sintomatología neurológica.

El líquido cefalorraquídeo o la orina se centrifugan y del sedimento se colocan 50 μ l en el portaobjetos; enseguida se agrega una gota de tinta china para poner de manifiesto a través del microscopio la presencia de la cápsula sobre un fondo negro y dentro de la cápsula el cuerpo redondo de la levadura. El esputo puede ser tratado con NaOH al 10 % para hacer menos denso a ese espécimen, hacer un examen directo con tinta china y observar las levaduras capsuladas características (fig. 6.11).

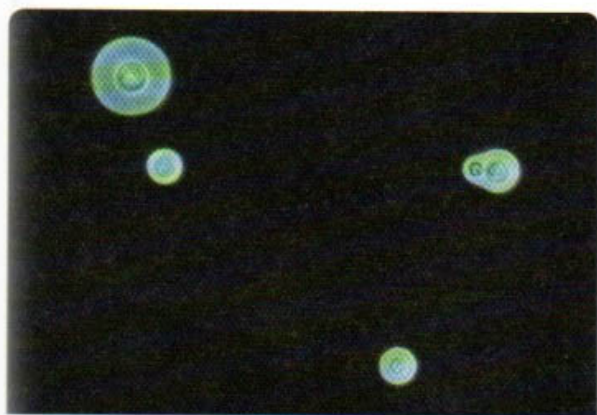


Fig. 6.11. *C. neoformans*. Tinción negativa con tinta china en LCR, en la que se observan las levaduras redondas, unigemantes con gran cápsula (40X).

Frotis. Los frotis o improntas son menos usados que el examen directo; sin embargo, si se recurre a ellos, se utilizan las tinciones de PAS o Papanicolaou, con las cuales las levaduras se observan rosadas o rojas, rodeadas de una cápsula que capta muy poco el colorante.

Cultivo. Para los productos con menor contaminación, como el líquido cefalorraquídeo, la orina y los fragmentos de biopsia, se emplean medios de agar dextrosa Sabouraud sin cicloheximida e incubando a 30 °C se desarrollan colonias mucoides brillantes de color blanco-amarillo, o ligeramente rosadas, poco elevadas y con bordes continuos (fig. 6.12).

En el examen microscópico de los cultivos se observan levaduras redondas de 7 a 15 μ m de diámetro, algunas de las cuales producen blastoconidios en uno o dos puntos y están rodeadas de una cápsula (fig. 6.13); la presencia de pseudomicelio es rara.

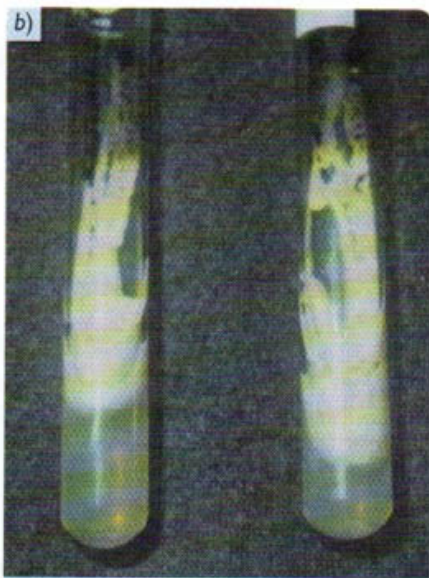
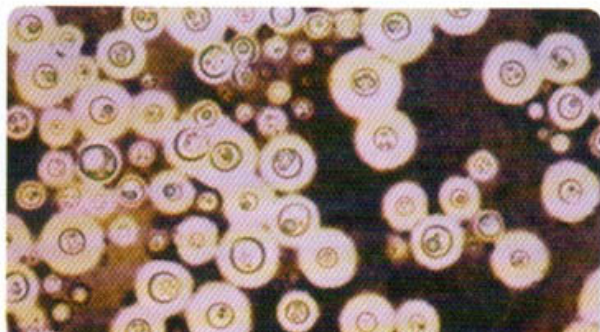


Fig. 6.12. Dos variedades de colonias de *C. neoformans*: a) variedad amarillenta, mucóide y húmeda; b) variedad semihúmeda, poco mucóide.

Fig. 6.13. Examen directo de una colonia de *C. neoformans*. (Tinción negativa con tinta china.)



En el caso de muestras contaminadas, como el esputo, la materia fecal y los exudados, se recomienda también efectuar la siembra en el medio de agar Niger (Staib), en el cual exclusivamente las colonias de *C. neoformans* y *C. gattii* desarrollan un color marrón característico (fig. 6.14).

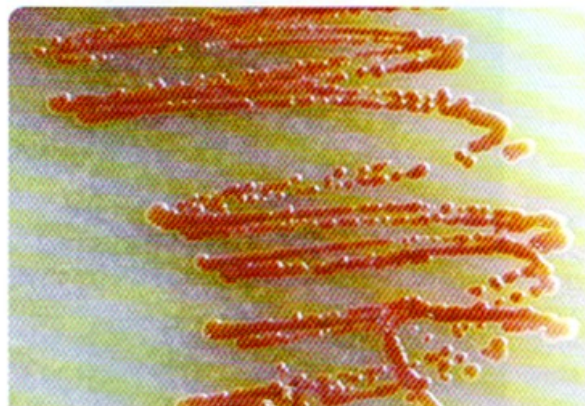


Fig. 6.14. *C. neoformans*. Aspecto de una colonia en el medio de Staib, donde se observa el color marrón oscuro característico de esta levadura.

Pruebas especiales. Existen algunas pruebas especiales, como las que a continuación se indican:

Producción de ureasa. Para realizarla se utiliza el medio de agar urea de Christensen, en el cual se inocula una asada de la levadura en estudio. Los medios de cultivo se incuban a 37 °C durante seis horas o a temperatura ambiente durante tres días. Las levaduras del género *Cryptococcus* son positivas a esta prueba, resultado que comparten con los géneros *Malassezia*, *Trichosporon* y *Rhodotorula*.

Auxanograma. Se utiliza el auxanograma del carbono, con las mismas características mencionadas en el capítulo de candidosis. La asimilación del inositol, es una característica del género *Cryptococcus* (cuadro 6.3).

El género *Cryptococcus* no fermenta los azúcares y, por tanto, el zimograma no tiene utilidad.

Pruebas inmunológicas. Se recomienda utilizar como técnica de elección la *aglutinación de látex*, la cual puede efectuarse en suero, líquido cefalorraquídeo, orina y líquido prostático. Al agre-

Cuadro 6.3. Características fisiológicas y bioquímicas de *Cryptococcus* spp.

Organismo								Asimilaciones											
	Ureasa	KNO ₃	Seudomicelio	Crec. 37 °C	Pigmento marrón	Cápsula	Patología en ratón	Dextrosa	Maltosa	Sacarosa	Lactosa	Galactosa	Melibiosa	Celobiosa	Inositol	Xilosa	Rafinosa	Trealosa	Dulcitol
<i>C. neoformans</i>	+	-	R	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
<i>C. uniguttulatus</i>	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>C. albidus</i> var. <i>albidus</i>	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>C. albidus</i> var. <i>diffluens</i>	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. laurentii</i>	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. luteolus</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>C. terreus</i>	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+
<i>C. gastricus</i>	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-
<i>C. melibiosum</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	d	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. flavus</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. lactativorus</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ = positiva

R = ocasionalmente hifas raras

d = débil

Tomado y modificado de Rippon, C. A., 1988; Koneman, R. y Roberts, D. G. (1985) (cap. 2, ref. 2).

gar el espécimen patológico (con contenido de antígenos circulantes) a las partículas de látex sensibilizadas con anticuerpos anti *Cryptococcus*, se produce la reacción de aglutinación, la cual es de alta especificidad; la sensibilidad varía entre 90 y 95 %. En algunos casos los títulos son muy altos; sin embargo, una reacción positiva con la muestra sin diluir se considera de valor diagnóstico. Aproximadamente 5 % de las pruebas dan resultados "falsos positivos" y esto se atribuye sobre todo a la presencia del factor reumatoide.

Inmunofluorescencia indirecta y ELISA. Son las pruebas en búsqueda de anticuerpos circulantes para el diagnóstico; sin embargo, debido a su baja sensibilidad o especificidad, se utilizan con muy poca frecuencia.

Intradermorreacción. Hasta el momento no se ha obtenido un antígeno estandarizado (criptococina) que nos permita evaluar la hipersensibilidad tardía en este padecimiento; sin embargo, con los antígenos que se han llegado a procesar, se demuestra que la prueba intradérmica no tiene valor diagnóstico y se utiliza exclusivamente con fines epidemiológicos.

Histopatología. Es muy recomendable dividir el material de biopsia en dos partes: una para el cultivo micológico y la otra para ser procesada en cortes histológicos para tñirla con PAS, Grocott o mucicarmín de Mayer (fig. 6.15).

En general, la infección se acompaña de una respuesta inflamatoria mínima; las lesiones están correlacionadas con la duración de la enfermedad

y son de dos tipos: si la infección es temprana, se encuentran lesiones gelatinosas o mucilaginosas (espuma de mar), debido al gran conglomerado de cápsulas, pero si la infección es crónica, las lesiones cambian a granulomatosas y contienen principalmente linfocitos y células epiteliales. La necrosis caseosa, la cavitación y la calcificación se observan raramente.

Inoculación en animales. El ratón es el animal de elección; reproduce la infección experimental cuando se inoculan $3 - 5 \times 10^6$ células por ml, ya sea vía intracraneal o vía intraperitoneal; sin embargo, debido a que los productos patológicos contienen una baja cantidad de microorganismos, este método no se utiliza como procedimiento diagnóstico.

MUCORMICOSIS

DESCRIPCIÓN

La mucormicosis es una infección aguda, de evolución rápida, que se presenta comúnmente en diabéticos descompensados y también en pacientes inmunodeprimidos. Es causada por diversas especies de hongos que pertenecen al orden Mucorales del phylum Zygomycota. La vía de entrada más frecuente es la respiratoria; también existe la implantación en mucosa bucal, nasal y conjuntival, y la inoculación cutánea por traumatismos, cirugías y aplicación de material contaminado. Dependiendo de la vía de entrada, las regiones afectadas pueden ser: el área craneofacial, los pulmones, el tracto gastrointestinal, la piel y con menor frecuencia, otros órganos.

Los agentes etiológicos tienen predilección por invadir los vasos sanguíneos arteriales, causando una tromboarteritis obliterante (embolización) y consecuentemente necrosis asociada a un proceso supurativo piógeno. La infección es más frecuente en pacientes diabéticos acidóticos, en quienes el curso es rápidamente fatal, por lo general en 10 a 20 días.

Rhizopus oryzae (*R. arrhizus*) es el agente causal reportado en 90 % de las formas de infección rinocerebrales; especies como *Rhizomucor pusillus*, *R. miehei*, *Mucor circinelloides*, *M. indicus* (*M. rouxii*), *M. ramosissimus*, *M. amphibiorum*, *Mycocladius* (*Absidia*) *corymbifera*, *Saksenaea vasiformis* y *Cunninghamella bertholletiae* (fig. 6.16)

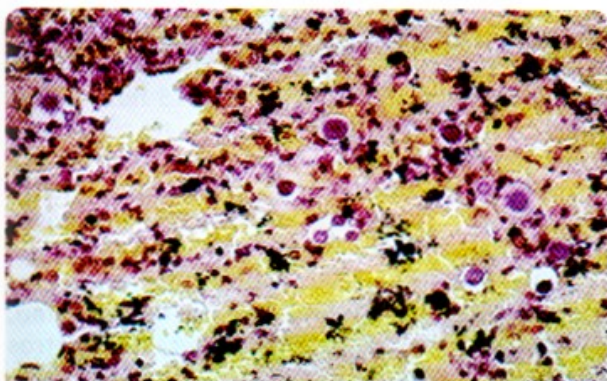


Fig. 6.15. *C. neoformans* en corte histológico de sistema nervioso central, donde se observan levaduras redondas unigemantes, rodeadas de una cápsula y con escasa o nula respuesta inflamatoria (tinción de PAS).

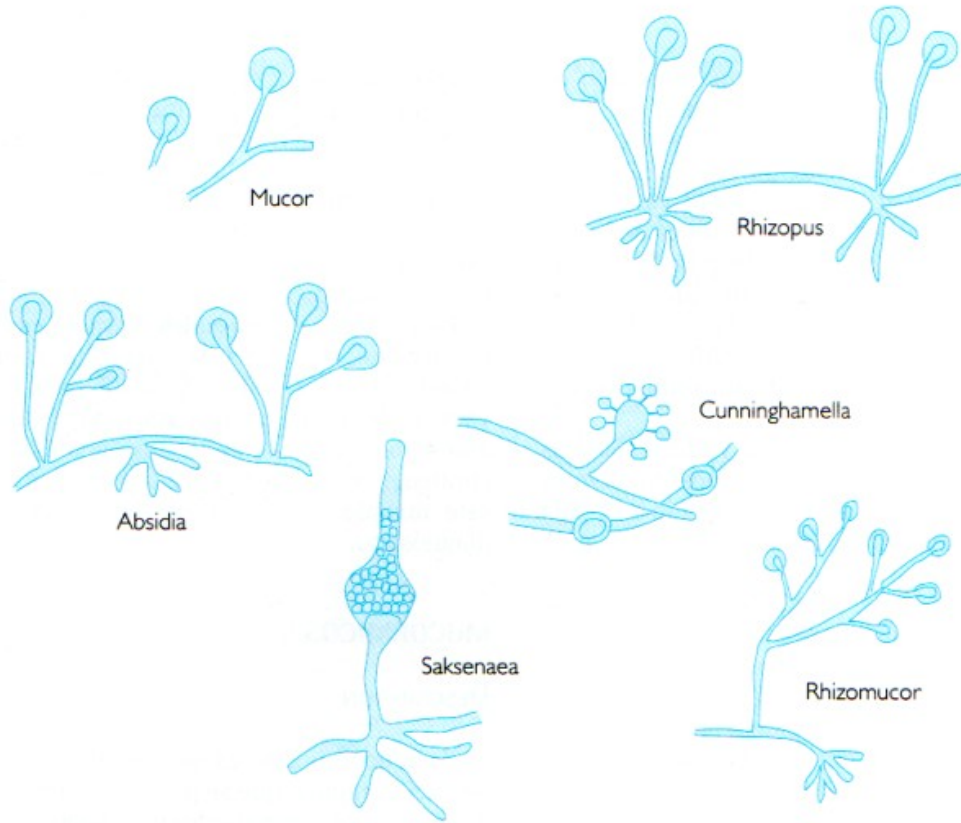


Fig. 6.16. Características morfológicas de los mucorales más frecuentes como causantes de enfermedad en el ser humano.

se presentan con mucho menor frecuencia. El cuadro clínico presentado por cada una de esas especies es muy similar.

Las especies aisladas de los casos humanos son ubicuas en la naturaleza; se asocian con material orgánico en descomposición, son termotolerantes y crecen en cualquier sustrato de carbohidratos.

Como en otras micosis oportunistas, en la mucormicosis no existe predominio de sexo, edad o raza, ni localización geográfica limitada, pero sí se asocia a factores inmunosupresores.

La enfermedad rinocerebral se asocia con mayor frecuencia al diabético no controlado, la infección pulmonar a los pacientes con leucemia y linfoma y la afección gástrica con pacientes desnutridos de tercer grado.

ESPECÍMENES BIOLÓGICOS

- Espudo.
- Tejido necrótico.

- Exudados.
- Raspado de cornetes superiores.
- Material de biopsia.

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Examen directo. El material biológico por estudiar se procesa con KOH y pasados unos minutos se observan hifas anchas, de 10 a 15 mm de diámetro, con pared gruesa e irregular, no septadas o escasamente septadas y ramificadas. Algunas veces se observan células voluminosas e hifas deformadas. Estas observaciones deben repetirse por lo menos en tres estudios seriados (fig. 6.17).

Cultivo. El material de biopsia es una excelente fuente para cultivar el microorganismo, aunque se puede emplear cualquiera de los otros productos biológicos. Los mucorales crecen prácticamente en todos los medios sin cicloheximida. Se incuban a 25 o a 37 °C y en 12 a 18 horas ya es visible la colonia. Después de tres a cinco días se observa madura la colonia. Cuando el cultivo se

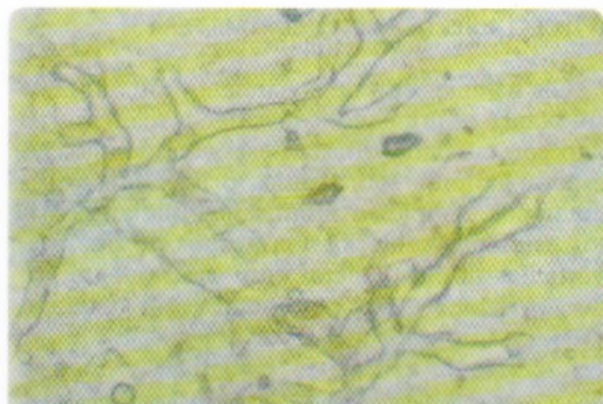


Fig. 6.17. Mucormicosis. Examen directo: filamentos gruesos, de pared irregular, sin septos y con ramificaciones en ángulo recto.

hace a partir de productos provenientes de zonas habitualmente contaminadas, debe ser seriado.

Hay muchas especies de mucorales en el ambiente y la morfología colonial entre ellas es muy similar, lo cual dificulta su identificación; sin embargo, enseguida se mencionan algunos parámetros morfológicos que nos orientan a una mejor caracterización.

RHIZOPUS ORYZAE (R. ARRHIZUS)

Las colonias son densas y algodonosas, crecen muy rápido y primero son blancas, pero con la esporulación se transforman en grises o marrón-amarillo (fig. 6.18). La presencia de estolones y

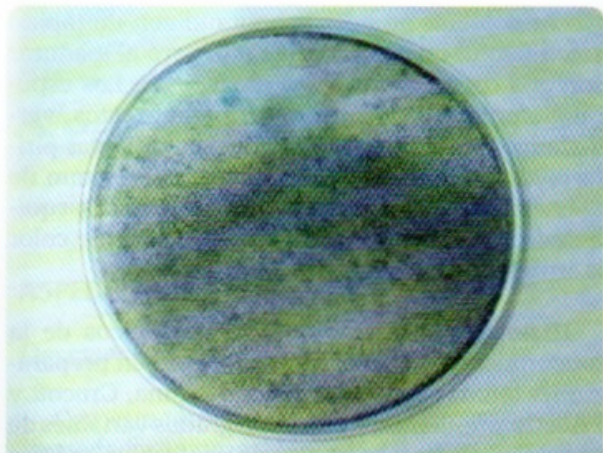


Fig. 6.18. *Rhizopus* sp. Colonias filamentosas, blancas con superficie oscura y con gran cantidad de micelio aéreo. Los puntos negros que se observan a simple vista corresponden a los esporangios.

rizoides pigmentados es característica. Hay formación de esporangióforos con apófisis, columela y multiesporados (fig. 6.19) únicos o en grupos a partir de los nodos directamente arriba de los rizoides (fig. 6.20).

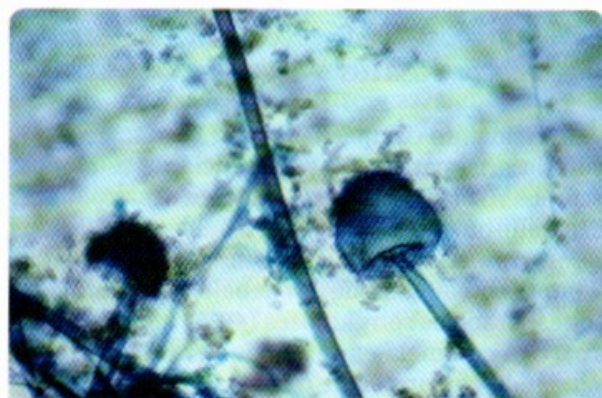


Fig. 6.19. Examen directo de un cultivo de *Rhizopus*, teñido con azul de algodón, en donde se observan esporangios con abundantes esporangiosporas libres, redondas, de color marrón.

Fig. 6.20. Mucorales. Examen directo del cultivo teñido con azul de algodón: a) *Rhizopus* sp, donde se observan rizoides inmediatamente por debajo de los esporangióforos; b) *Mucor* sp, en el cual no existen rizoides.



Esporangios globosos posteriores a la liberación de las esporas, la apófisis y la columela frecuentemente se colapsan y dejan una estructura semejante a una sombrilla (véase la figura 6.19). Las esporangioesporas son de redondas a ovoides, unicelulares y de hialinas a marrón.

RHIZOMUCOR PUSILLUS

Crecimiento compacto y bajo (2-3 mm de alto), micelio gris-marrón. Hay presencia de estolones, pero los rizoides están escasamente desarrollados. Es común que los esporangióforos estén ramificados y son simpodiales e hialinos a amarillo-marrón, siempre con un tabique por debajo del esporangio. Los esporangios son globosos (40-60 mm de diámetro), con columela en forma de pera (20-30 mm), a menudo con un rodete o collar. Las esporangioesporas hialinas tienen paredes lisas a veces ovales (3-5 mm) y los clamidoconidios están ausentes.

MUCOR CIRCINELLOIDES

Las colonias crecen muy rápido y son de algodonosas a flocosas, de blancas a amarillas, que se convierten en gris oscuro con el desarrollo de los esporangios. Ausencia total de estolones y rizoides (véase fig. 6.20). Esporangióforos erectos, simples o ramificados formando un gran esporangio multiesporado con apófisis y una bien desarrollada columela con un "collarete" notorio en su base. Las esporangioesporas son hialinas, grises o marrón, de pared suave o finamente adornada. Clamidoconidios y zigosporas (fig. 6.21) frecuentemente están presentes.

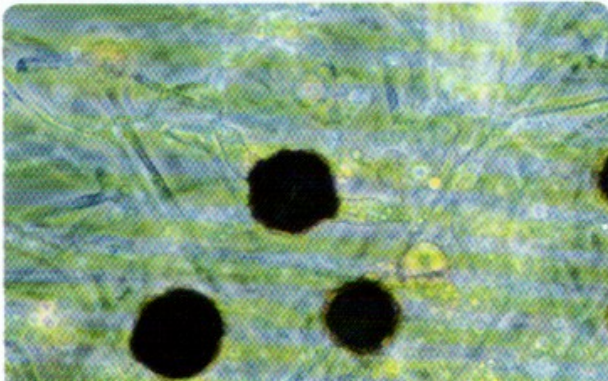


Fig. 6.21. Zigosporas. Estructuras de reproducción sexual características de los hongos pertenecientes al phylum zigomycota (*Mucor* sp.).

MYCOCLADUS (ABSIDIA) CORYMBIFERA

Las colonias son de crecimiento rápido, floccoso, blanco al principio, convirtiéndose en gris pálido con la edad, y hasta de 1.5 cm de alto. Los esporangióforos son hialinos o ligeramente pigmentados, simples o ramificados que surgen de los estolones solitarios, en grupos de tres o en verticilos de hasta siete; muy escasamente producen rizoides. Los esporangios son pequeños (10-40 mm de diámetro) y piriformes y con una columela en forma cónica y de apófisis pronunciada, a menudo con proyecciones cortas en la parte superior. Las esporangioesporas son hialinas a gris claro y paredes lisas.

SAKSENAEA VASIFORMIS

Colonias de crecimiento rápido, blancas, con hifas no septadas. Los esporangios tienen forma de vaso con un "vientre" esférico y de "cuello" largo que surgen solos o en parejas de ramificaciones dicotómicas, rizoides con pigmentación oscura. La columela es prominente y en forma de cúpula. Las esporangioesporas son pequeñas y oblongas, que se descargan a través del cuello, después de la disolución de un tapón apical mucilaginoso.

CUNNINGHAMELLA BERTHOLLETTAE (C. ELEGANS O C. ECHINULATA)

Las colonias en agar Sabouraud son de rápido crecimiento, blancas al principio, pero al madurar son gris oscuro y polvosas en aspecto. Los esporangióforos son de 20 mm de ancho, rectos, verticilados o solitarios, terminados en vesículas piriformes con esporangiolos redondos (7-11 mm de diámetro) o elipsoidales (9-13 × 6-10 mm), equinulados, hialinos individualmente, pero de color marrón en masa.

Histopatología. Los agentes etiológicos de la mucormicosis se observan fácilmente en preparaciones teñidas con hematoxilina-eosina, Grocott y PAS. Comúnmente se observan grados variables de edema, necrosis y acúmulos de neutrófilos, células plasmáticas y a veces células gigantes. La principal característica de la mucormicosis es la afección de los vasos sanguíneos, usualmente grandes, y

pequeñas arterias, lo que conduce a la trombosis, infarto y necrosis del tejido adyacente. El hongo también invade los huesos, nervios y el tejido graso, pero generalmente respeta el músculo. Las hifas son comunmente anchas, entre 12 y 20 μm , escasamente septadas y ramificadas al azar, algunas veces están muy deformadas y las paredes varían de grosor (fig. 6.22).

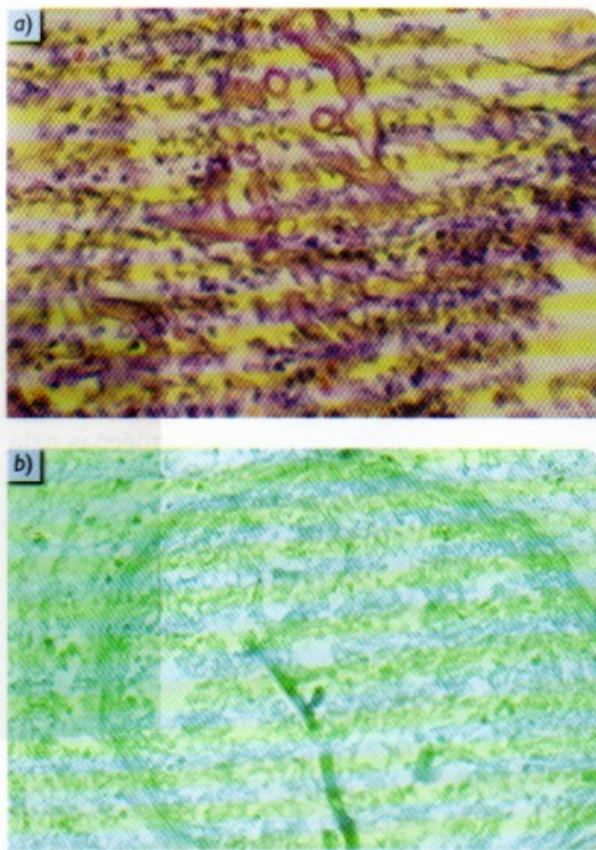


Fig. 6.22. Murcomicosis: a) corte histológico en donde se observan los filamentos gruesos, cortos, de pared irregular, con ramificaciones en ángulo recto (tinción con H-E); b) tromboarteritis ocasionada por *R. arrhizus*. (Cortesía de A. González Mendoza.)

ASPERGILOSIS

DESCRIPCIÓN

Con este término se engloba a un grupo de enfermedades tóxicas, alérgicas e infecciosas, causadas por varios miembros del género *Aspergillus*. Es esencial la labor del microbiólogo para reconocer si *Aspergillus* está como colonizador, o causa

enfermedad alérgica, infección local o es responsable de cuadros invasivos de gran gravedad. En este capítulo sólo nos referiremos a *Aspergillus* como causante de micosis.

La aspergilosis puede presentarse como alguno de los siguientes cuadros clínicos:

Onicomycosis. No es demasiado frecuente. Ciertas especies como *A. fumigatus* y *A. versicolor* pueden afectar a uñas distróficas, dando lugar a hiperqueratosis y a un cambio en la coloración de las mismas.

Otomycosis. Producidas principalmente por *A. niger* y *A. fumigatus*. Puede aparecer prurito local y vértigo, con eliminación de cerumen rico en masas de micelio. Ciertas condiciones como el eczema y la seborrea favorecen la colonización por *Aspergillus* (fig. 6.23).

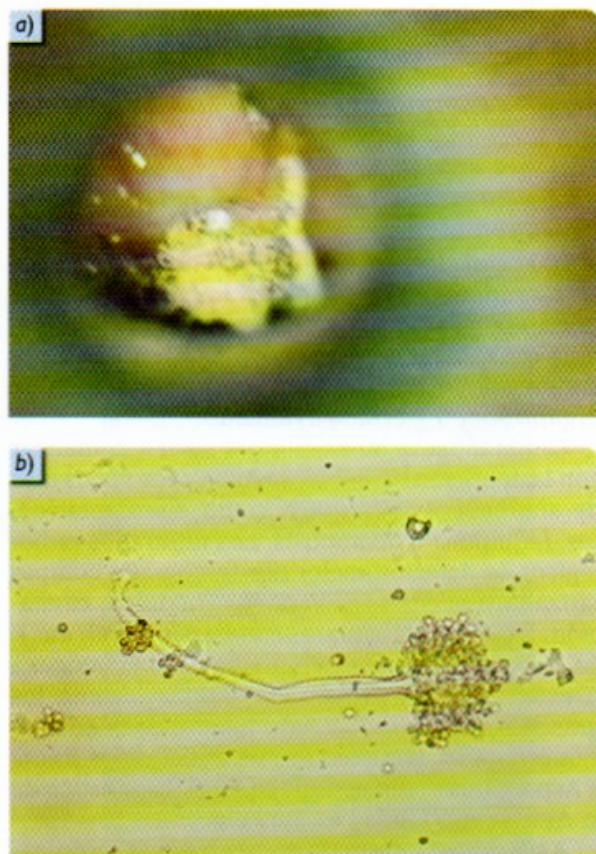


Fig. 6.23. Otomicosis aspergilar: a) examen del conducto auditivo externo; con ayuda del otoscopio se observa una colonia fúngica que crece sobre la membrana timpánica. (Cortesía de M. Kume.); b) examen directo de la colonia en conducto auditivo externo; nótese un conidióforo hialino y una cabeza aspergilar característicos de *Aspergillus*.

Aspergilomas. Producidos por colonización de cavidades previas (tuberculosis, sarcoidosis, histoplasmosis o bronquiectasias) por *Aspergillus*. Pueden ser asintomáticos o cursar con hemoptisis, sobreinfección bacteriana o invasión tisular. El diagnóstico es fundamentalmente radiológico, a partir de la visualización de cavidades con una masa opaca rodeada de aire que se mueve cuando el paciente cambia de postura. Las imágenes se observan mucho mejor con tomografía computarizada o resonancia magnética que con radiología simple. El diagnóstico radiológico siempre ha de acompañarse de la presencia de niveles altos de IgG frente a *Aspergillus* y la presencia, generalmente intermitente, de tinciones y cultivos con positivos de las secreciones respiratorias. En ocasiones los aspergilomas pueden localizarse en los senos maxilares y dar lugar a cefalea, rinorrea y secreción posnasal.

Aspergilosis pulmonar invasiva. En los últimos años la incidencia de aspergilomas ha disminuido, mientras que la aspergilosis pulmonar invasiva (API) ha ido en aumento. En pacientes con leucemia, la incidencia de API oscila entre 5-24 % y en trasplantados de órgano sólido entre 1 y 10 %. Los factores de riesgo más importantes son la neutropenia (< 500 y, sobre todo, < 100 células/10⁶/l), la neutropenia prolongada, el tratamiento con esteroides, la enfermedad del injerto contra huésped en los trasplantes de médula ósea, el rechazo agudo y la enfermedad por citomegalovirus (CMV) en los trasplantados de órgano sólido y el sida avanzado.

Las manifestaciones clínicas suelen comenzar con la aparición de fiebre, seguida a los pocos días de síntomas respiratorios, como dolor torácico, tos, taquipnea o hemoptisis. Los infiltrados radiológicos se detectan mejor por tomografía computarizada y pueden ser variados (nódulos, cavitación, lesiones triangulares con base pleural, etc.). La infección puede diseminarse vía hematogena o extenderse a estructuras contiguas, como los grandes vasos, produciendo hemorragias en ocasiones fatales. La detección de anticuerpos frente a *Aspergillus* no tiene utilidad en el diagnóstico de la API. La mortalidad es muy elevada.

Aspergilosis pulmonar necrosante crónica. Suele afectar a ancianos con enfermedades pulmonares previas. Tiene un curso lento (meses o años), con aparición de infiltrados en los lóbulos superiores, fibrosis y cavitaciones. El paciente desarrolla anticuerpos frente a *Aspergillus* detec-

tables en el laboratorio. Aunque no suele haber complicaciones, pueden producirse neumotórax, aspergilomas o incluso aspergilosis pulmonar invasiva.

Sinusitis. La rinosinusitis aguda afecta, sobre todo, a pacientes muy inmunodeprimidos, mientras que la crónica puede aparecer en pacientes inmunocompetentes. En el primer caso no es rara la extensión a los tejidos contiguos que imita la mucormicosis rinoorbitaria o incluso la afectación del SNC por extensión local o por vía hematogena, con producción de infartos cerebrales, meningitis o abscesos intracraneales.

Otras manifestaciones sistémicas. Incluyen la endocarditis, aneurismas micóticos, infección de prótesis vasculares, osteomielitis, endoftalmitis y afección de órganos, como el cerebro, estómago, hígado, bazo y riñones. Hasta 30 % de las aspergilosis invasivas son diseminadas.

El género *Aspergillus* contiene aproximadamente 600 especies ubicuas en la naturaleza, aunque para el hombre sólo unas cuantas son patógenas, debido a que la mayoría de estos hongos son termosensibles. Las principales especies patógenas para el hombre son: *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. nidulans*, *A. clavatus*, *A. restrictus* y *A. niveus*.

Las tres primeras especies son las responsables de 80 o 90 % de los casos de aspergilosis. El género *Aspergillus* lleva ese nombre por su homología morfológica con un *aspergillum* (instrumento que dispersa agua bendita): son hongos filamentosos hialinos y la identificación de las especies se basa en características morfológicas como: color de la colonia, tamaño y forma de las cabezas conidiales (forma de la vesícula, presencia o ausencia de métulas, forma de las fiálides, color y aspecto de los conidios), morfología de los conidióforos y, en los casos de reproducción sexual, presencia de células de Hülle y de esclerocios.

La aspergilosis es un padecimiento que se diagnostica cada vez con mayor frecuencia como infección nosocomial. La enfermedad no presenta predominio por ningún sexo, raza o grupo de edad.

ESPECÍMENES BIOLÓGICOS

- Espeto.
- Producto de raspado de lesiones superficiales.
- Piezas de biopsia.
- Sangre.

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Examen directo. Las muestras clínicas como escamas, fluidos, esputo o tejido son examinadas agregando KOH al 15 % y deberán observarse hifas largas, ramificadas, hialinas y septadas de aproximadamente 3.0 μm de diámetro. Dependiendo del cuadro de aspergilosis, podrán observarse también esporas e incluso cabezas conidiales completas (fig. 6.23b). La demostración de hifas en el espécimen clínico y el aislamiento repetido de la misma especie de *Aspergillus* es crítico para apoyar el diagnóstico de aspergilosis. Asimismo, la identificación etiológica dependerá de la recuperación del hongo en cultivo, pues hongos causantes de hialohifomicosis pueden ser morfológicamente idénticos a *Aspergillus* en los tejidos.

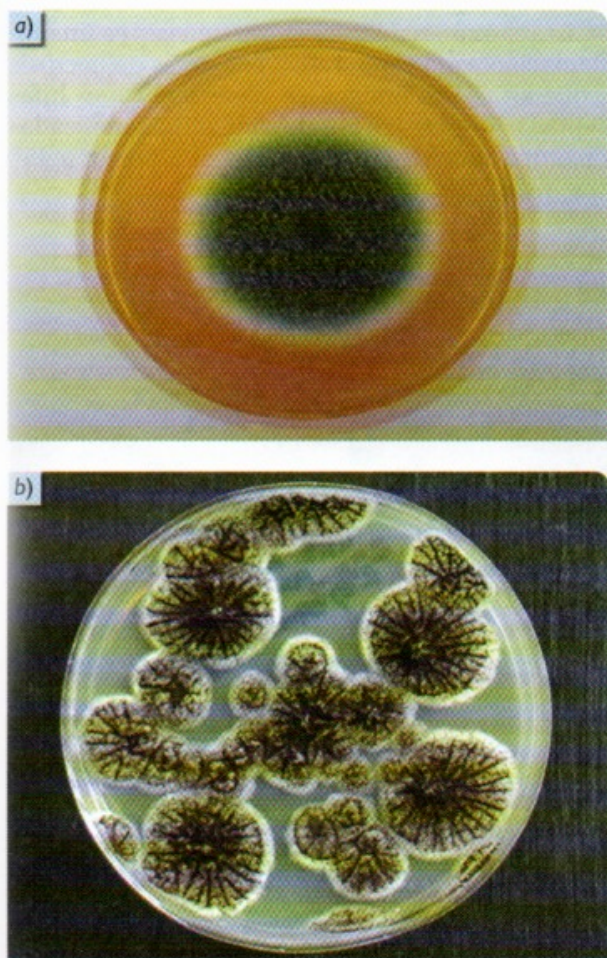
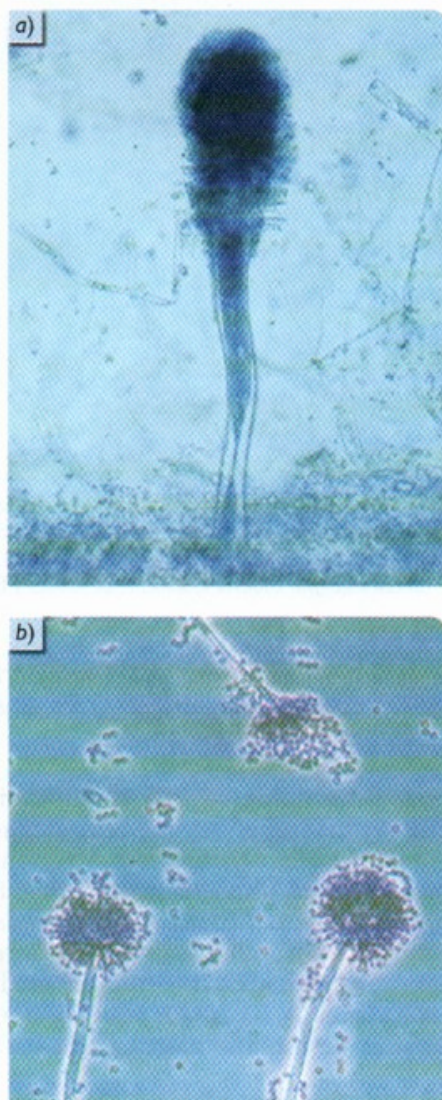


Fig. 6.24. Morfología colonial macroscópica: a) *A. fumigatus* y b) *A. niger*.

Cultivo. Todos los productos biológicos pueden ser cultivados; los medios de cultivo empleados son Sabouraud sin cicloheximida y medio de Czapeck. Los cultivos se mantienen unos a 25 °C y otros a 37 °C. Como los hongos del género *Aspergillus* se aíslan con facilidad del ambiente, se debe ser cuidadoso al emitir un diagnóstico de aspergilosis, sobre todo en aquellos casos en los que el producto biológico provenga de la superficie corporal, en cuyo caso se debe hacer el aislamiento en tres ocasiones diferentes y con cultivos casi puros (figs. 6.24 y 6.25).

Fig. 6.25. Examen directo de cultivos de *Aspergillus*: a) *A. clavatus*, cabezas aspergílicas alargadas, con fiálides grandes y cadenas cortas de filioconidios; b) *A. flavus*, vesícula esférica con fiálides que la cubren totalmente.



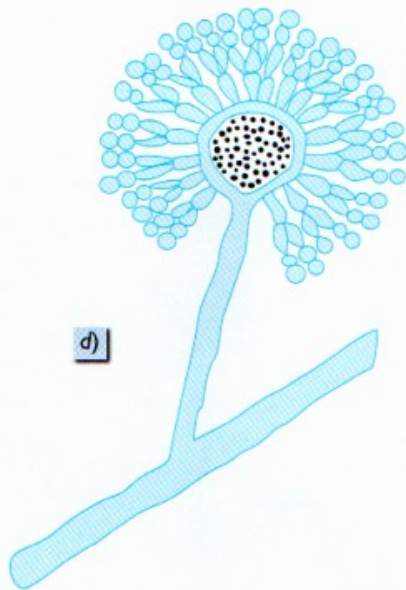


Fig. 6.25. Continuación. Examen directo de cultivos de *Aspergillus*: c) *A. fumigatus*, vesícula globosa con fiálides que abarcan aproximadamente las dos terceras partes de ella; fialoconidios en grandes cadenas; d) *A. niger*, cabeza aspergilar cubierta totalmente de fiálides y fialoconidios negros.

En el cuadro 6.4 se presentan las características morfológicas de las principales especies de *Aspergillus* causantes de enfermedad.

Pruebas inmunológicas. La identificación de anticuerpos constituyen un método diagnóstico de gran utilidad en los aspergilomas, ya que aproximadamente 90 % de los pacientes poseen anticuerpos *vs.* *Aspergillus*. La técnica más utilizada es la de inmunodifusión, aunque se han desarrollado otras con mayor sensibilidad, como el enzimoimmunoensayo (ELISA, BALISA), radioinmunoensayo y métodos de inmunofluorescencia indirecta.

A diferencia de lo que ocurre con el aspergiloma, estas técnicas no son útiles en el diagnóstico de aspergilosis pulmonar invasiva.

La identificación de antígenos como el galactomanano o de sus metabolitos, como el D-manitol, tanto en el suero como en la orina u otros líquidos corporales se ha puesto en práctica mediante el enzimoimmunoensayo, el immunoblotting y el radioinmunoensayo. Aunque estos métodos tienen una gran especificidad, su sensibilidad no es muy alta, debido a la rápida desaparición de los antígenos en los fluidos.

Histopatología. La pieza de biopsia obtenida se debe dividir en dos fragmentos: una parte se emplea para realizar un cultivo en los medios mencionados y la otra se fija para cortes histopatológicos, los cuales pueden ser teñidos con hematoxilina-eosina, PAS o Grocott.

La reacción tisular en la aspergilosis es una inflamación aguda supurativa con áreas de necrosis isquémica. Los hongos se observan como hifas septadas de 2.5-4.5 μm de diámetro, ramificadas dicotómicamente en ángulos igual o menor a 45° (fig. 6.26).

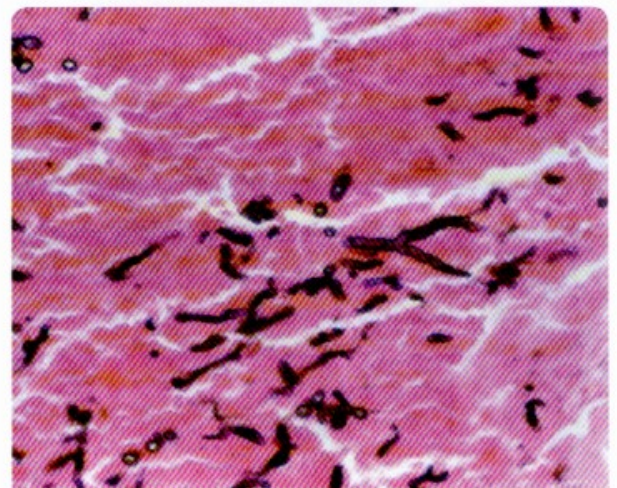


Fig. 6.26. Aspergilosis invasiva. Corte histológico teñido con PAS que muestra filamentos septados, sinuosos y dicotomizados en el tejido afectado.

Pueden observarse hifas ramificadas irregulares de apariencia similar a lo encontrado en zigomicosis. La invasión a vasos sanguíneos, trombosis, infarto y diseminación son comunes (fig. 6.27).

Cuadro 6.4. Características morfológicas de las principales especies de *Aspergillus*.

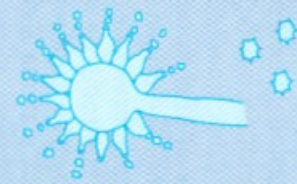
Especie	Colonia	Conidióforos	Vesícula	Disposición de conidios	Conidios	Esquema
<i>A. fumigatus</i>	Colonia polvosa, verde-azul oscuro	Lisos	Abultamiento simple 20-30 μm	Un orden en disposición paralela al conidióforo	Finamente equinulados	
<i>A. flavus</i>	Aspecto filmentoso color verde-amarillo	Rugosos	Esféricas y voluminosas, 35 a 45 μm	Uno o dos órdenes en disposición radial	Equinulados	
<i>A. nidulans</i>	Aspecto polvoso y de color verde oscuro	Lisos y cortos	Pequeñas y hemisféricas, 8 a 12 μm	Dos órdenes sobre la mitad de la vesícula	Equinulados	
<i>A. niger</i>	Aspecto granular de color negro	Lisos y largos	Esférica y muy voluminosa, 50-75 μm	Uno a dos órdenes en disposición radial	Redondos y lisos	
<i>A. terreus</i>	Aspecto aterciopelado de color marrón	Lisos	Hemisféricas, de 10 a 16 μm	Dos órdenes sobre las 2/3 partes de la vesícula	Lisos	



Fig. 6.27. Aspergiloma. Corte histológico teñido con PAS, con gran cantidad de filamentos dispuestos en forma paralela, sinuosos, septados y dicotomizados.

NEUMOCISTOSIS

DESCRIPCIÓN

La micosis es causada por el hongo ascomiceto *Pneumocystis jirovecii*. Las especies del género *Pneumocystis* pueden infectar humanos y otros mamíferos, como ratas, ratones, hurones, conejos, caballos y cerdos. Los polimorfismos frecuentemente observados en las secuencias de ADN del hongo sugieren la existencia de numerosas cepas o especies de *Pneumocystis* según el hospedero que lo alberga, situación que a su vez confirma que la infección en el hombre sólo puede ser transmitida por otro hombre y por ninguna circunstancia por otro mamífero.

El ADN de *Pneumocystis* ha sido identificado en el aire y el agua, pero los organismos no han podido ser visualizados por examen microscópico en muestras ambientales, lo que sugiere que *Pneumocystis* puede sobrevivir en la naturaleza hasta que infecte a un hospedero.

Las infecciones por *Pneumocystis* están presentes, principalmente en pacientes inmunocomprometidos (inmunodeficiencias congénitas, sida, corticoterapia prolongada, enfermedades subyacentes, terapia inmunosupresora intensa como tratamiento

de cáncer o prevención de rechazo de trasplante) y ocasionalmente de manera transitoria, en pacientes inmunocompetentes.

Clínicamente la neumocistosis puede dividirse en: a) infecciones asintomáticas; b) neumonía infantil (de origen epidémico y presentada en niños prematuros y desnutridos) y actualmente asociada al síndrome de muerte súbita infantil; c) neumonía en hospederos inmunocomprometidos (esporádica y afecta a cualquier hospedero con inmunodeficiencias congénitas o adquiridas) siendo el paciente con sida el más frecuentemente afectado, y d) infecciones extrapulmonares (resultado de una diseminación a partir de un foco pulmonar) en las que los órganos involucrados reportados son: nódulos linfáticos, bazo, médula ósea, hígado, riñones, corazón, cerebro, páncreas y piel.

Pneumocystis jirovecii no crece en medios sintéticos, aunque limitadamente sólo puede desarrollarse en monocapas de cultivos de tejidos por tiempos cortos.

La información disponible acerca del ciclo de vida y la morfología de *Pneumocystis* spp ha sido obtenida de análisis histoquímicos y ultraestructurales del tejido pulmonar de roedores y de humanos infectados. El ciclo de *Pneumocystis* spp, incluye una fase sexual y otra asexual y se ha sugerido que las formas tróficas (trofozoítos) son producidas durante el crecimiento asexual; esas formas son pleomórficas, se encuentran agrupadas en racimos y pueden reproducirse asexualmente por fisión binaria.

A través de la conjugación, los mismos trofozoítos haploides pueden replicarse sexualmente, produciendo un cigoto diploide que sufre meiosis y mitosis subsecuente para dar lugar a un prequiste que a través de la maduración se transforma en quiste. Durante la diferenciación de prequiste a quiste maduro, el organismo forma ocho esporas intraquísticas que son liberadas y se transformarán en trofozoítos cuando el quiste madura y se rompe.

Los principales especímenes patológicos para proceder al diagnóstico son todos aquellos productos de las vías respiratorias, así como tejido de los órganos afectados. Con las muestras podrá efectuarse un frotis para un análisis citoquímico en el que para ubicar las estructuras fúngicas, se podrán utilizar las tinciones de Giemsa (fig. 6.28), Gomori-Grocott o inmunofluorescencia directa (fig. 6.29).

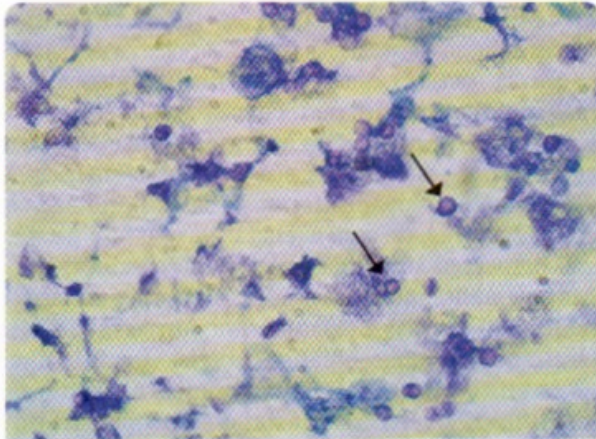


Fig. 6.28. Frotis de líquido de lavado bronquioalveolar teñido con Giemsa, donde se observan formas quísticas.

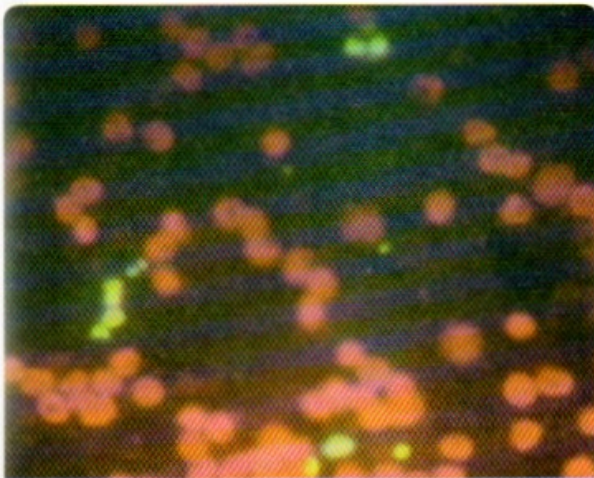


Fig. 6.29. Frotis de líquido de lavado bronquioalveolar teñido visualizado con inmunofluorescencia indirecta; se observan formas quísticas (en color verde intenso) a las que se unen los anticuerpos específicos unidos a fluoresceína y observados con microscopio de inmunofluorescencia.

Actualmente, la amplificación específica mediante PCR de fragmentos del ADN de *P. jirovecii*, a partir de las muestras patológicas, ha resultado muy útil en el diagnóstico de la enfermedad. En el estudio histopatológico se observará un material eosinofílico espumoso, compuesto por masas de *Pneumocystis* spp, macrófagos alveolares, descamación de células alveolares epiteliales, leucocitos polimorfonucleares, matriz de glucoproteínas, componentes surfactantes y otras proteínas del hospedero. Se recomienda utilizar las tinciones argénticas.

PENICILIOSIS POR *PENICILLIUM MARNEFFEI*

DESCRIPCIÓN

Penicillium marneffei es un hongo ascomiceto, dimórfico y endémico específicamente del sudeste asiático, donde las "ratas del bambú" son identificadas como los principales reservorios del parásito. El hongo es causante de la llamada peniciliosis marneffei. Es un hongo oportunista, particularmente patógeno en pacientes con sida quienes viven o han visitado el sudeste de Asia (Tailandia y países adyacentes, Taiwán e India) y cuyo aislamiento a partir de la sangre es considerado como un marcador de VIH en áreas endémicas.

La enfermedad es adquirida vía aérea, dando como resultado una infección pulmonar inicial, seguida de fungemia y diseminación de la infección al sistema linfático, hígado, bazo, huesos y piel.

Las principales manifestaciones se dan a nivel cutáneo en donde durante el curso de la enfermedad aparecen pápulas parecidas al acné sobre la cara, tronco y miembros. Desafortunadamente, la peniciliosis marneffei frecuentemente es fatal.

El dimorfismo de *P. marneffei* se considera dependiente de la temperatura. A 25 °C produce colonias filamentosas, planas, con surcos radiales o zonación.

Esas colonias son de una combinación entre los colores azul-gris-verde en el centro y blancas en la periferia; sin embargo, una característica de la colonia es el pigmento rojo soluble que se difunde en el reverso del cultivo; en su fase filamentosas, *P. marneffei* es microscópicamente similar a otros *Penicillium* spp. A 37 °C y en medios enriquecidos como el agar BHI, las colonias levaduriformes de *P. marneffei* son de color crema a ligeramente rosadas y glabras.

Al microscopio las células varían de redondas a alargadas con forma de salchicha (3 a 5 mm), las cuales se multiplican por fisión.

En los estudios histopatológicos, células semejantes a levaduras son observadas dentro de los macrófagos de los tejidos infectados.

RODOTORULOSIS

DESCRIPCIÓN

Rhodotorula es un basidiomiceto levaduriforme que se encuentra en el aire, suelo, agua de lagos y océanos y productos lácteos. Puede colonizar a

plantas y animales y está catalogado como un contaminante común, por lo que se considera que *Rhodotorula* sólo puede infectar a individuos con factores de predisposición. Existen tres especies: *Rhodotorula glutinis* (*Rhodosporidium* spp es su fase teleomórfica), *R. minuta* y *R. mucilaginosa* (*R. rubra*).

Si algún suero humano por analizar está contaminado con *R. mucilaginosa*, puede presentarse reacción cruzada con resultados falsos positivos cuando se utiliza la prueba de aglutinación del látex Pastorex® *Aspergillus*.

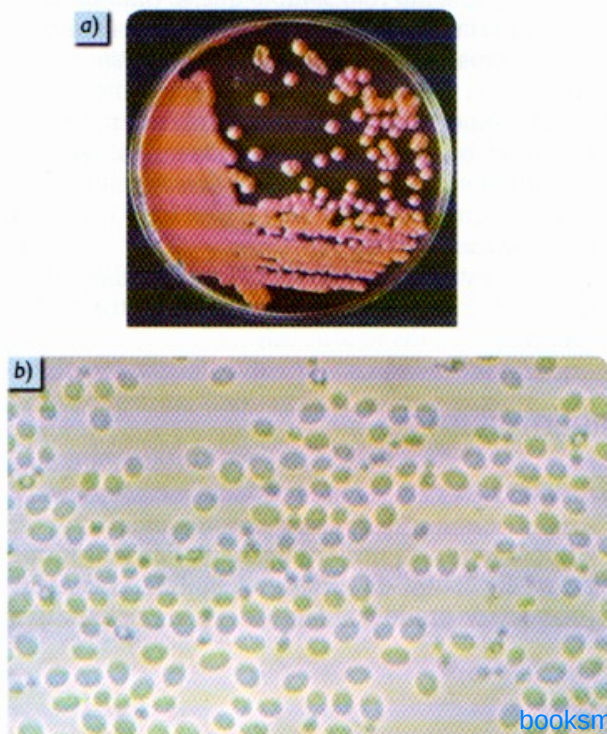
Rhodotorula spp es raramente aislado como agente causal de micosis oportunistas; sin embargo, se han reportado casos en hospederos vulnerables como pacientes con sida o leucemia aguda, en los cuales se ha asociado con meningitis, endocarditis, ventriculitis, peritonitis, endoftalmitis, fungemia y sepsis.

Las colonias tienen un crecimiento rápido y son suaves, a veces con superficies ásperas, brillantes o mates y mucoides, con color característicamente rosado, rojo coral o anaranjado (fig. 6.30).

Rhodotorula spp no fermenta carbohidratos, pero produce ureasas.

Las levaduras y blastoconidios son unicelulares, de redondos a ovalados y pueden ser encapsulados. Las pseudohifas son ausentes o muy rudimentarias y las hifas verdaderas están ausentes.

Fig. 6.30. *Rhodotorula* sp: a) colonias rojo coral, húmedas, de aspecto mucoso y blandas; b) levaduras redondas con blastoconidios.



SACAROMICOSIS

Saccharomyces cerevisiae es un organismo ambientalmente común, pero es mejor conocido como la levadura del pan. Es un hongo ascomiceto que en agar dextrosa Sabouraud, sus colonias están formadas por células levaduriformes y son color blanco a crema, glabras, de consistencia suave.

Microscópicamente se observan levaduras únicas o gemantes (blastoconidios), grandes en tamaño ($3.0-10.0 \times 4.5-21.0$ mm) y de forma redonda a elipsoidal. No poseen cápsula (véase fig. 8.18).

Es una levadura fermentadora de azúcares y su identificación puede ser fácilmente conocida a través de su perfil de asimilación.

S. cerevisiae es un componente temporal de la biota normal del tracto intestinal y de la piel. Se han reportado varios casos de fungemia, endocarditis y peritonitis en pacientes sujetos a diálisis peritoneal, o con cáncer en proceso de quimioterapia y pacientes con sida.

MICROSPORIDIOSIS

DESCRIPCIÓN

Los Microsporidia constituyen un filo de parásitos obligados unicelulares e intracelulares formadores de esporas. Se conocían como protistas, pero estudios filogenéticos actuales los ubican dentro del reino de los hongos. Se han identificado más de 1200 especies pertenecientes a 143 géneros.

Algunos microsporidios son usados como control biológico de plagas de insectos, pero aproximadamente 10 % de las especies son parásitos de vertebrados. Datos recientes demuestran que algunas aves y mamíferos domésticos y salvajes están naturalmente infectados por las especies *Encephalitozoon cuniculi*, *E. intestinalis*, *E. hellem* y *E. bienersi*. *Vittaforma corneae* ha sido identificada en aguas superficiales y las esporas de *Nosema* sp y *Brachiola algerae* se han aislado de aguas estancadas.

Los microsporidios son cada vez más reconocidos como agentes oportunistas infecciosos en todo el mundo. Hay por lo menos 14 especies de microsporidios, identificados como patógenos oportunistas que infectan a los humanos: *Brachiola algerae*, *B. connori*, *B. vesicularum*, *Encephalitozoon cuniculi*, *E. hellem*, *E. intestinalis*, *Enterocytozoon bienersi*, *Microsporidium ceylonensis*, *M.*

africanum, *Nosema ocularum*, *Pleistophora* sp, *Trachipleistophora hominis*, *T. anthropophthera* y *Vittaforma corneae*.

Posterior a la infección, los microsporidios invaden a sus hospederos de varias maneras y todos los órganos y tejidos son parasitados intracelularmente, por lo que se considera que algunas especies son letales.

En los casos más avanzados de parasitismo, los microsporidios pueden controlar completamente el metabolismo y la reproducción celular de su hospedero, causándole castración parasitaria y gigantismo con la formación consecuente de un xenoma (hiperplasia de las células hospederas, debido a que se encuentran llenas de esporas y a las diferentes etapas de desarrollo de los microsporidios).

Los Microsporidia son caracterizados por la producción de esporas resistentes que pueden sobrevivir mucho tiempo en el ambiente y, dependiendo de la especie, varían en tamaño; poseen un túbulo o filamento polar enrollado dentro de ellas.

Para infectar a la célula hospedera eucariota, las esporas extruyen su túbulo polar e inyectan un esporoplasma infeccioso que sufre múltiples divisiones por merogonia o esquizogonia. El desarrollo de la maduración llega a la esporogonia, en donde se formará una pared gruesa que rodeará al esporoplasma e individualizará a cada una de las esporas.

Cuando las esporas crecen en número y llenan completamente el citoplasma de la célula hospedera, la membrana celular de ésta se rompe y libera a las esporas maduras, las cuales continúan el ciclo infectando nuevas células.

Las esporas de especies de microsporidios asociados con infección humana miden de 1 a 4 μm . El tamaño de la espora y el filamento polar son datos utilizados para el diagnóstico, el cual puede efectuarse si se usa la técnica de tinción de Gram modificado.

HIALOHIFOMICOSIS

DESCRIPCIÓN

La hialohifomicosis es un término general usado para reunir a un grupo de infecciones del hombre y otros animales, causadas por hongos hialinos (no pigmentados de oscuro) inusualmente patógenos, que no son agentes de infecciones ya conocidas (por ejemplo aspergilosis), y en los que

la morfología del agente causal en los tejidos parasitados es micelial.

Son ocasionadas por un gran número de hongos filamentosos (hifomicetos) hialinos, pero los agentes etiológicos más frecuentemente reportados incluyen especies de *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Acremonium*, *Beauveria*, *Fusarium* y *Scopulariopsis*.

Las manifestaciones clínicas varían desde una colonización no peligrosa hasta enfermedades agudas e invasivas. Idealmente la enfermedad debería ser designada por la descripción específica de la patología y el género o especie fúngico causal (cuando se conozca), "patología A" causada por el "hongo X", por ejemplo: onicomycosis por *Scopulariopsis*.

Los factores que predisponen a la adquisición de las hialohifomicosis incluyen neutropenia prolongada, especialmente en pacientes con leucemia o en receptores de trasplante de médula ósea, terapia con corticosteroides, quimioterapia citotóxica y, en menor medida, los pacientes con sida. El paciente característico es granulocitopénico y receptor de antibióticos de amplio espectro por fiebre de origen desconocido.

Para el diagnóstico, las muestras pueden ser escamas de piel o uñas, orina, esputo o líquido de lavado bronquial, líquido cefalorraquídeo, fluido pleural, sangre, fragmentos de tejido provenientes de diferentes órganos y puntas de los catéteres.

Las escamas, esputo y productos de lavados y aspirados deberán examinarse directamente al microscopio usando KOH al 15 %, tinta Parker o blanco de calco-flúor; de igual manera se procederá para el sedimento de los exudados y fluidos corporales (especímenes que deberán centrifugarse previamente).

Los frotis y cortes histológicos deberán ser teñidos usando las coloraciones de PAS, Grocott-plata metenamina o Gram, ya que las hifas frecuentemente son difíciles de observar cuando sólo se usa hematoxilina-eosina.

La presencia de hifas hialinas, septadas y ramificadas en cualquier espécimen, a partir de un paciente con síntomas clínicos, deberá ser considerada como significativa. La evidencia de invasión tisular es de particular importancia. Cabe recordar que la microscopía directa o la histopatología pueden orientar el diagnóstico mas no la identificación específica del agente etiológico. La identificación mediante el cultivo es el único medio confiable para distinguir a los hongos causales.

Los especímenes clínicos deberán ser sembrados en agar dextrosa Sabouraud, en donde las características macroscópicas y microscópicas del cultivo son importantes para la identificación, especialmente la forma y el arreglo de los conidios y la morfología de la célula conidiógena que les da origen.

Los hifomicetos hialinos involucrados son bien reconocidos como contaminantes del aire, por lo que un cultivo positivo a partir de un espécimen no estéril, como esputo o piel, necesita estar apoyado por la evidencia microscópica y conocer si el paciente cursa con las condiciones predisponentes apropiadas para considerarlo significativo.

Actualmente no hay disponible en el comercio procedimientos serológicos para el diagnóstico de hialohifomicosis.

ACREMONIUM SP

El género *Acremonium* actualmente contiene 100 especies, de las cuales la mayoría son saprofitas y han sido aisladas del suelo. Para la identificación morfológica, se recomienda usar el agar papa-dextrosa o agar harina de maíz e incubar a la luz del día, para favorecer las características de color en los cultivos.

Las colonias son generalmente de crecimiento lento, a menudo al inicio, de aspecto compacto y húmedo, convirtiéndose con la edad en polvosas con aspecto de aterciopeladas a laxas (flocosas) y pueden ser de color blanco, gris o de rosado a anaranjado.

Las hifas son finas e hialinas y producen en su mayoría fiálides erectas, sencillas en forma de lezna. Los conidios son unicelulares (ameroconidios), hialinos o pigmentados, de redondos a cilíndricos, agregados en glioconidios en el ápice de cada fiálide (fig. 6.31). *Acremonium* puede ser confundido con especies de *Fusarium* microconidiales, pero el crecimiento rápido y colonias de apariencia esponjosa en *Fusarium* son características que ayudan a diferenciarlas.

A. falciforme, *A. kiliense*, *A. recifei*, *A. alabamensis*, *A. potroni*, *A. roseo-griseum* y *A. strictum* son reconocidas como agentes patógenos oportunistas del hombre y otros animales, aunque en varios informes la especie de *Acremonium* no es identificada. *Acremonium* spp ha sido causante de: micetoma e hialohifomicosis (oncomicosis, artritis, osteomielitis, peritonitis, endocarditis, neumonía, cerebritis e infecciones subcutáneas).

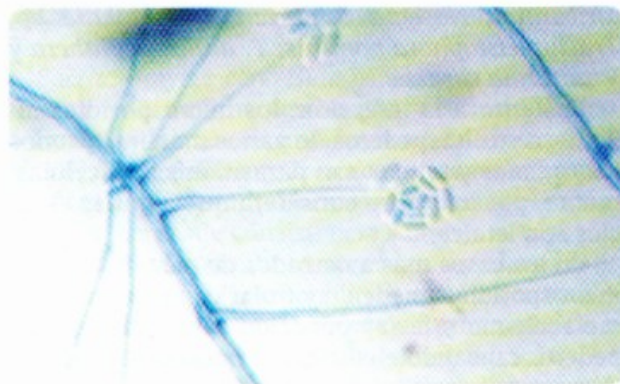


Fig. 6.31. *Acremonium*.

BLASTOSCHIZOMYCES CAPITATUS

Blastoschizomyces capitatus (*Geotrichum capitatum*) es un hongo ascomiceto (*Dipodascus capitatus* su teleomorfo) aislado del suelo, arena de playa, excremento de aves y madera, es considerado como un saprobio ambiental y forma parte de la flora microbiana de la piel y de los tractos digestivo y respiratorio en el humano.

B. capitatus es un hongo oportunista emergente potencialmente patógeno en presencia de inmunosupresión. Pacientes en riesgo: neutropénicos y aquellos que han recibido quimioterapia, corticosteroides o antibióticos, además de factores predisponentes como cirugías, abuso de drogas, catéteres y tratamientos a base de bajas dosis de azoles.

Fungemias e infecciones sistémicas en las que los pulmones, riñones, hígado, bazo, cerebro y endocardio están involucrados, han sido reportados en pacientes inmunosuprimidos. Las manifestaciones clínicas son diversas: endocarditis, osteomielitis, meningitis, encefalitis, infección del tracto urinario, micetoma y neumotórax son algunas de ellas.

Sin embargo, hospederos inmunocompetentes también pueden desarrollar infección por *B. capitatus* como oncomicosis o incluso existe el informe de infección sistémica por iatrogenia.

Blastoschizomyces capitatus puede crecer a 45 °C y en agar harina de maíz con tween 80 produce artroconidios, aneloconidios e hifas verdaderas. Las colonias crecen en aproximadamente cinco días y son planas, de aspecto levaduriforme, de color blanco a crema o ligeramente marrón, plegadas y con el tiempo desarrollan hifas aéreas.

Las hifas son abundantemente ramificadas en ángulo agudo, con células conidiógenas termina-

les e intercalares (anélides) que forman largas cadenas de aneloconidios comúnmente ovalados y agrupados en los extremos de las anélides.

En los especímenes clínicos se observan en el tejido infectado células levaduriformes pleomórficas (de 3-8 μm de diámetro) e hifas septadas; los artroconidios son raramente observados.

CHRYSONILIA SPP (MONILIA)

Las especies de *Chrysonilia* spp, aunque son popularmente conocidas como "los mohos rojos del pan", en realidad tienen una amplia distribución en el ambiente, pues son fácilmente aisladas del polvo; algunas de ellas tienen sus representantes teleomórficos dentro de los ascomicetos en el género *Neurospora* spp.

Las especies de *Neurospora* tienen ciclos de vida adaptados a los eventos relacionados con el fuego y muchos de sus aislados se han obtenido de restos de vegetación quemada. La importancia del fuego se basa en que ese elemento produce un ambiente estéril, rico en nutrientes a partir de los tejidos vegetales muertos, que constituyen un sustrato necesario para la germinación de las ascosporas.

Cuando la barrera inmunológica en los humanos está alterada, las especies de *Chrysonilia* representan un riesgo para la salud, ya que pueden ser causa de alergia, además de que las infecciones causadas por estos hongos han estado relacionadas con perforación de la córnea, cirugía mayor, diálisis peritoneal, presencia de catéter venoso y el consumo de drogas inyectables.

Son hongos de crecimiento extremadamente rápido (4 mm por hora) y sus colonias se caracterizan por ser laxas y de colores que van del rosado-salmón al anaranjado. En cultivos a 25 °C produce colonias inicialmente hialinas y posteriormente en presencia de luz se tornan de rosadas a anaranjadas.

Hifas conidiógenas postradas o ascendentes tienen paredes lisas, son septadas, generalmente reunidas en los bordes periféricos de las colonias, formando masas de aspecto algodonoso, que dan origen a largas cadenas acrópetas ramificadas de conidios de paredes lisas, formados mediante procesos holotáticos, de colores claros o brillantes (amarillo o anaranjados) de diversas formas (10-15 $\times$ 5-10 mm): elipsoidales, cilíndricos, globosos a subglobosos a veces de formas irregulares que tienden a desarticularse rápidamente.

Morfología del género *Neurospora*. Son peritecios globosos a piriformes, de color café oscuro, glabros o con algunas hifas dispersas en su peridio. Pared peritecial compuesta de varias capas de células gruesas. Ascosporas en número de 4 a 8 unicelulares, elipsoidales, uniseriadas, café oscuras con estriaciones longitudinales en su superficie y dos poros germinales inconspicuos: 23 – 26 $\times$ 10-14 μm .

CHRYSPORIUM SPP

Las especies de *Chrysosporium* son saprofitos comunes aislados del suelo y se consideran hongos contaminantes. Sus colonias son de crecimiento moderadamente rápido, planas, de color blanco a beige, en el reverso no hay pigmento, pero con la edad pueden colorearse de amarillo a marrón pálido. Su fase sexual está contemplada dentro del género *Nannizziopsis*.

Los ameroconidios o aleuroconidios, producidos directamente de la hifa vegetativa por células conidiógenas no especializadas, son hialinos, piriformes o claviformes con la base truncada (6-7 $\times$ 3.5-4 mm) y formados intercaladamente (artroconidios), lateralmente (frecuentemente sobre pedicelos) o terminales. No hay macroconidios ni hifas en espiral.

Otros organismos relacionados filogenéticamente son algunas especies de *Emmonsia* como *E. pasteuriana* que han sido ocasionalmente aisladas de escamas de piel y uñas, especialmente de los pies.

Las especies de *Chrysosporium* son queratinofílicas, termotolerantes y los cultivos se parecen mucho a los de algunos dermatofitos (*Trichophyton mentagrophytes*) al igual que a cultivos de *Histoplasma* y *Blastomyces*.

NOTA: La única especie obsoleta es *Chrysosporium parvum*, que ha sido sustituido por *Emmonsia parva*, hongo que, adquirido por inhalación, es causante de otra enfermedad oportunista denominada adiaspiromicosis.

EMMONSIA (ADIASPIROMICOSIS)

El género *Emmonsia* actualmente cuenta con las siguientes especies y variedades: *Emmonsia parva*, *Emmonsia parva* var. *crescens*, *Emmonsia parva* var. *parva* y *Emmonsia pasteuriana*. Ocasio-

nalmente, *E. parva* ha sido denominada *Chrysosporium parvum*; sin embargo, este último nombre es obsoleto.

Emmonsia es un hongo filamentoso cosmopolita aislado del suelo y de algunas especies mamíferas; su teleomorfo se ha clasificado como *Ajellomyces crescens* dentro del grupo de los ascomicetos.

Emmonsia es el agente causal de la adiaspiromicosis, particularmente en roedores y muy rara en los humanos. La adiaspiromicosis es una infección pulmonar asintomática, que puede diseminarse en hospederos inmunocomprometidos en los cuales se desarrolla la enfermedad a partir de la inhalación de los conidios (adiasporas) de *Emmonsia*; éstos se alojan en los alveolos y crecen alterando las funciones pulmonares normales.

Las adiasporas no se reproducen y es posible localizarlas en el sitio de implantación; eventualmente se calcifican produciendo una mínima reacción inflamatoria.

E. parva var. *crescens* es la principal especie aislada de los casos de adiaspiromicosis humana. *Emmonsia* spp crece moderadamente rápido, formando colonias de glabras a aterciopeladas, blancas con un centro marrón claro. Las hifas son hialinas y septadas, con conidióforos simples, ocasionalmente ramificados en ángulo recto y aleuriconidios sésiles o pedunculados, unicelulares, de pared delgada, de piriformes a esféricos de $2-5 \times 2-4 \mu\text{m}$, pueden ser solitarios o formar cadenas de dos a tres células.

In vitro el cultivo en agar sangre o infusión cerebro corazón a $37-40^\circ\text{C}$ y en los tejidos del hospedero, los conidios de *Emmonsia* spp tienden a hincharse, producen una pared gruesa y liberan conidios conocidos como adiasporas que, dependiendo de la especie, pueden alcanzar tamaños de $25 \mu\text{m}$ in vitro y $40 \mu\text{m}$ in vivo, en el caso de *Emmonsia parva* var. *parva* y respectivamente de 70 y $700 \mu\text{m}$ para *Emmonsia parva* var. *crescens*.

FUSARIUM

Fusarium es un género de hongos filamentosos, ampliamente distribuido sobre las plantas y el suelo, por lo que es muy conocido como contaminante y fitopatógeno, aunque también es encontrado como micobiota normal de cereales y leguminosas como arroz, frijol, soya y otros. Algunas especies de *Fusarium* tienen estados teleomorfos (*Gibbere-*

lla fujikuroi, *Nectria haematococca* y *Plectosphaerella cucumerina*).

La mayoría de las especies son comunes en áreas tropicales y subtropicales, pero algunas habitan en climas fríos. El género *Fusarium* actualmente contiene alrededor de 20 especies, siendo las más comunes *F. solani*, *F. oxysporum* y *F. chlamydosporum*, las cuales pueden causar varias infecciones en humanos y han sido clasificados como organismos emergentes causantes de micosis oportunistas que van de superficiales a sistémicas.

Los traumatismos son el principal factor predisponente para adquirir infecciones cutáneas. Por otra parte, las infecciones diseminadas son desarrolladas en huéspedes inmunodeprimidos, particularmente en pacientes neutropénicos trasplantados; sin embargo, los pacientes con trasplante de órganos sólidos tienden a tener un buen pronóstico a diferencia de aquellos que desarrollan la infección por enfermedades hematológicas y trasplante de médula ósea.

Los fusarios son hifomicetos reportados como causantes de queratitis, endoftalmítis, otitis media, onicomycosis, infecciones cutáneas por antecedente de quemaduras, micetoma, sinusitis, infección pulmonar, endocarditis, peritonitis, infección por catéter central venoso, artritis séptica, infecciones diseminadas y fungemia.

Además de su papel como agente infeccioso, algunas cepas de *Fusarium* spp pueden producir micotoxicosis, causando intoxicaciones en los mamíferos.

Los fusarios crecen rápidamente en agar dextrosa Sabouraud a 25°C y producen colonias de lanosas a algodonosas, planas y amplias en superficie. Por el frente, el color de la colonia puede ser blanco, crema, salmón, canela, amarillo, rojo, violeta, rosado o morado y por el reverso van desde sin color hasta marrón pasando por rojo, bronce o morado oscuro (fig. 6.32).

Macroscópicamente pueden observarse esclerocios (estructura dura formada por la masa compacta de hifas presente en condiciones ambientales desfavorables) generalmente de color azul oscuro. Ocasionalmente también podrán observarse esporodoquios (estructuras en forma de cojín o almohadón y que portan a los conidióforos en su superficie) de color crema o bronce o anaranjados y en el único caso de *Fusarium solani* los esporodoquios son de color azul-verde o azul.

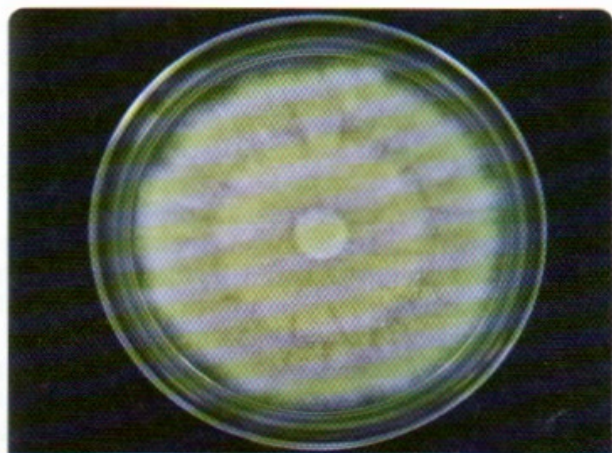


Fig. 6.32. Colonias vellosas de *Fusarium* con tinte violeta rosáceo.

Al microscopio, las colonias muestran como estructuras básicas: hifas septadas, conidióforos, fiálides, macroconidios y microconidios, y algunas especies mostrarán la formación de clamidoconidios.

Las fiálides son cilíndricas, con un pequeño collarite, solitarias o producidas como componente de un sistema ramificado, por lo que pueden observarse monofiálides o polifiálides arregladas en racimos o en cadenas.

Los macroconidios ($3-8 \times 11-70 \mu\text{m}$) son producidos a partir de las fiálides o directamente de los conidióforos simples o ramificados y tienen dos o más células, de pared gruesa, lisos y cilíndricos o con forma de canoa. Los macroconidios tienen distintas células basales y apuntan hacia el extremo distal, tienden a acumularse en grupos o manojos (fig. 6.33). Los microconidios ($2-4 \times 4-8 \mu\text{m}$) están formados sobre los conidióforos y generalmente son unicelulares, lisos, hialinos, de ovoides a cilíndricos y arreglados en grupo (ocasionalmente forman cadenas).

Cuando los clamidoconidios están presentes, son escasos, en pares, racimos o cadenas; son de pared gruesa, hialinos, intercalares o terminales.

Las características morfológicas como el color de la colonia, tamaño y forma de los macroconidios, el número, forma y arreglo de los microconidios y presencia o ausencia de clamidosporas, son características clave para la identificación de las especies de *Fusarium*.

En los estudios histopatológicos se observarán hifas hialinas con contornos regulares, septadas y ramificadas al azar.

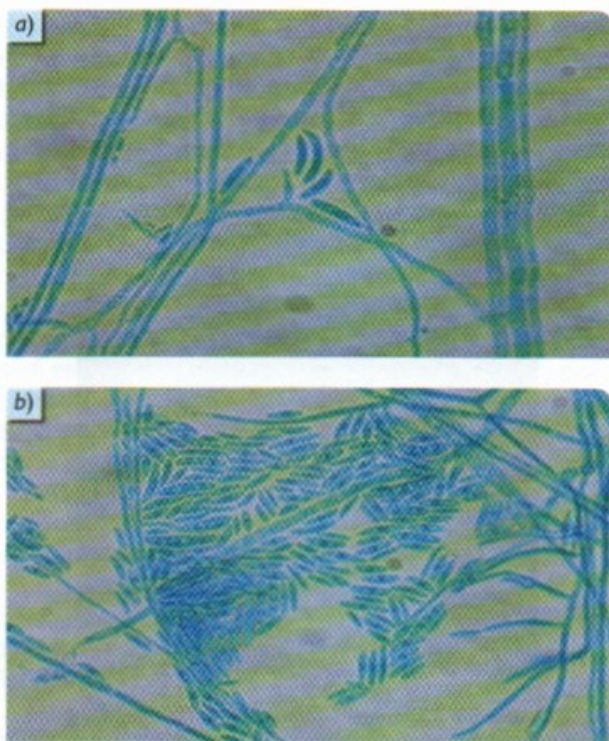


Fig. 6.33. Examen directo con azul de algodón, de colonias de *Fusarium* sp: a) macroconidios y microconidios alargados; b) gran cantidad de macroconidios multicelulares, fusiformes, arqueados y cortos.

GEOTRICHUM

El género *Geotrichum* incluye varias especies, de las cuales la más común y relacionada con patología humana es *G. candidum*. Son hongos ascomicetos y su fase teleomórfica ha sido denominada como *Galactomyces geotrichum*. *G. candidum* es un hongo con una amplia distribución mundial y extremadamente abundante en la naturaleza; puede ser aislado a partir de tierra, agua, aire, varios productos vegetales y alimentos lácteos; también se considera dentro de la biota normal de humanos, pues ha sido aislado de esputo y materia fecal.

Aunque de inicio es un hongo colonizante, *G. candidum* puede causar geotricosis, infecciones oportunistas en hospederos inmunocomprometidos, las cuales son adquiridas comúnmente vía digestiva o por inhalación. La geotricosis pulmonar es la forma más frecuentemente reportada de la enfermedad, pero infecciones en bronquios, boca, vagina, piel y tracto digestivo han sido observadas, al igual que infecciones diseminadas y fungemia.

También ha sido aislado de infecciones causadas por traumatismos.

Geotrichum spp crece rápidamente formando colonias blancas, secas, de polvosas a algodono-sas que semejan vidrio esmerilado. En ocasiones la colonia puede parecer viscosa y levaduriforme (fig. 6.34). La mayoría de las cepas no crecen a 37 °C o lo hacen muy débilmente.

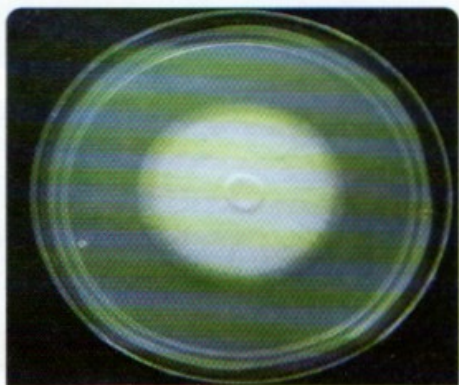


Fig. 6.34. Colonia blanca, membranosa y arrugada de *Geotrichum candidum*.

Al microscopio son observados artroconidios (6-12 × 3-6 μm) e hifas hialinas verdaderas. No hay presencia de levaduras, blastoconidios, conidióforos o pseudohifas. Los artroconidios son unicelulares, catenulados, hialinos rectangulares o en forma de barril y son el resultado de la fragmentación de hifas indiferenciadas por fisión de un doble septo (fig. 6.35). No hay células disyuntoras (vacías intercalares) que fragmenten o liberen a los artroconidios, por lo que la consecutiva formación de artroconidios es común.

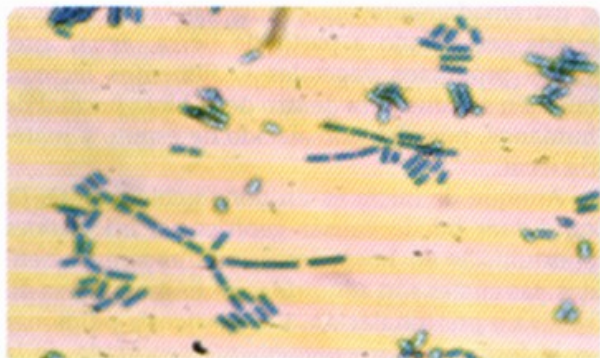


Fig. 6.35. Examen directo con azul de algodón de la colonia de *Geotrichum* sp: hifas hialinas que forman cadenas de artroconidios holoártricos de forma rectangular.

El diagnóstico puede hacerse observando en los tejidos infectados hifas septadas de 3-6 μm de ancho y artroconidios de rectangulares a ovales.

PAECILOMYCES SP

El género *Paecilomyces* puede distinguirse del muy cercanamente relacionado *Penicillium* por tener colonias de diversas tonalidades, pero nunca verdes o azul-verdes y porque presenta fiálides grandes, delgadas y divergentes.

Las colonias son de rápido crecimiento, polvosas o aterciopeladas (piel de ante), de colores oro, verde-doradas, amarillo-marrón, lilas o bronce.

Microscópicamente las fiálides están hinchadas en sus bases, disminuyendo gradualmente en un cuello más largo y delgado, se presentan solitarias o en pares, verticiladas en cabezas peniciladas.

Largas cadenas de conidios unicelulares de hialinos a oscuros, lisos o arrugados, de ovoides a fusiformes son producidas en sucesión basípeta a partir de las fiálides (véase la figura 8.16).

Paecilomyces son mohos ambientales comunes y ocasionalmente se han asociado con infección humana, aunque la frecuencia de los reportes va en aumento actualmente. Algunas especies como *P. variotii*, *P. marquandii* y *P. lilacinus* son agentes causales de queratitis micótica, peritonitis en pacientes con diálisis peritoneal continua ambulatoria y otras formas de hialohifomicosis en pacientes inmunocomprometidos que comprenden: endoftalmítis seguida de la implantación de lentes, endocarditis, pielonefritis, sinusitis y lesiones cutáneas.

PENICILLIUM

Son hongos ascomicetos (algunos *Penicillium* tienen estados teleomorfos incluidos en los géneros *Eupenicillium*, *Talaromyces*, *Hamigera* y *Trichocoma*), filamentosos y con excepción de la especie *P. marneffei*, son mohos ampliamente distribuidos en suelos ricos en materia orgánica vegetal y el aire, por lo que comúnmente son considerados como contaminantes; sin embargo, ocasionalmente pueden causar infecciones, llamadas peniciliosis, sobre todo en hospederos inmunocomprometidos.

Las especies de *Penicillium* asociadas con procesos patológicos en el humano son *P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *P. janthinellum*, *P. marneffei* y *P. purpurogenum*. La identificación de las especies

se basa en las características macroscópicas y microscópicas de las colonias. *Penicillium* ha sido aislado de pacientes con queratitis (infecciones generalmente postraumáticas), endoftalmitis, otomícosis, esofagitis necrotizante, neumonía, endocarditis, peritonitis e infecciones del tracto urinario.

Además del potencial infeccioso de *Penicillium* spp, se conoce que algunas especies también son productoras de micotoxinas, con repercusión nefrotóxica y carcinógena.

Con excepción de *P. marneffei*, el resto de los penicilios producen colonias de rápido crecimiento, planas, filamentosas, con textura lanosa, algodonosa o de terciopelo. Las colonias son blancas inicialmente y con la maduración van cambiando a azul-verde, gris-verde, gris-olivo y ocasionalmente amarillas o rosadas.

Microscópicamente, los penicilios muestran hifas hialinas y septadas (de 1.5 a 5.0 μm de diámetro), conidióforos simples o ramificados, métulas, fiálides y conidios. Las métulas son ramas secundarias formadas sobre los conidióforos y portan a las fiálides (células conidiógenas en forma de matraz Erlenmeyer); la organización de las fiálides y las puntas de los conidióforos son muy características, pues forman agrupaciones parecidas a pinceles (*penicilli*).

Los conidios (2.5 a 5.0 μm de diámetro) son redondos, unicelulares y agrupados en cadenas lineales a partir de las puntas de las fiálides (véase fig. 8.16).

SCEDOSPORIUM APIOSPERMUM

Pseudallescheria boydii es un hongo ascomiceto homotálico, filamentoso y con amplia distribución mundial. Ha sido aislado del suelo, así como de drenajes, aguas contaminadas y estiércol de animales de granja. Es un patógeno oportunista emergente y puede causar varias infecciones en el humano, denominadas pseudoalergias. *P. boydii* es el teleomorfo de *Scedosporium apiospermum* y *Graphium eumorphum*.

Los hospederos infectados son generalmente inmunosuprimidos por enfermedades hematológicas, trasplante de órganos o sida. *P. boydii* está entre los agentes causantes de micetoma por grano blanco, pero en esta sección sólo nos enfocaremos a las hialohifomicosis, infecciones causadas por su estado anamórfico: *Scedosporium apiospermum*.

S. apiospermum puede causar infección en va-

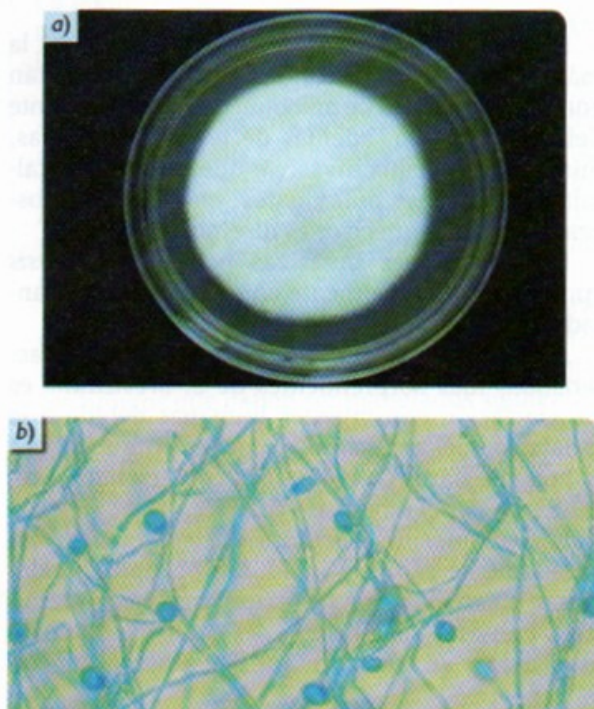
rios órganos y sistemas del cuerpo humano, lo cual incluye infecciones cutáneas, sinusitis, keratitis, linfadenitis, endoftalmitis, meningoencefalitis, abscesos cerebral y pulmonar, endocarditis, neumonía, bola fúngica pulmonar, bursitis, artritis, osteomielitis, uretritis e infecciones diseminadas que si no son tratadas, frecuentemente son fatales. Las infecciones cerebrales se asocian como una complicación, en pacientes a punto de ahogarse.

Morfológicamente *S. apiospermum* o *P. boydii* crecen rápidamente a 25 °C. La textura de las colonias es de lanosa a algodonosa inicialmente blanca y después se transforma en gris oscuro o marrón, en el reverso de la colonia es pálida con zonas oscuras marrón-negro (fig. 6.36a).

Microscópicamente las estructuras reproductoras asexuales son hifas septadas e hialinas (2-4 μm de diámetro); los conidióforos son diferenciados de las células conidiógenas únicamente por las anérides producidas en el desarrollo de aneloconidios ovales con la base truncada y unicelulares (4-7 $\times$ 5-12 mm) (fig. 6.36b).

Los conidióforos de *S. apiospermum* son sencillos, mientras que los de *Graphium eumorphum* son largos, erectos, anchos y cementados forman-

Fig. 6.36. Morfología colonial de *S. apiospermum*: a) colonias lanosas de crecimiento rápido, inicialmente blancas y posteriormente marrón claro; b) examen al microscopio con azul de algodón, que muestra conidios que emergen de anérides.



do un *synema* (la estructura erecta consiste de conidióforos unidos). Los conidios en *S. apiospermum* con frecuencia se forman individualmente sobre los conidióforos, mientras que aquellos de *G. eumorphum* están arreglados en racimos en los ápices de cada *synema*. *Scedosporium*, *Graphium* o ambas formas pueden estar presentes en el mismo aislamiento.

En medios de cultivo especiales puede obtenerse *P. boydii*, el teleomorfo, identificándose por la presencia de cleistotecios, ascas y ascosporas.

Histopatológicamente, al microscopio se observan hifas septadas en los tejidos infectados.

SCOPULARIOPSIS

Scopulariopsis es un género de hongos filamentosos, pertenecientes a los ascomicetos que habitan en el suelo, materiales vegetales, plumas de aves e insectos. Tiene una amplia distribución mundial. Varias especies de *Scopulariopsis* tienen representantes teleomorfos clasificados en el género *Microascus* spp, ya que *Scopulariopsis* es contaminante común y las infecciones humanas son causadas particularmente en pacientes inmunocomprometidos (por ejemplo, receptores del trasplante de médula ósea).

Es un hongo débilmente queratinofílico y muy resistente al benomil (antifúngico utilizado en los vegetales).

El género *Scopulariopsis* contiene especies; la más común es *S. brevicaulis*. Estos hongos están entre los causantes de onicomycosis especialmente del primerortejo, además de lesiones cutáneas, micetoma, sinusitis invasiva, queratitis, endoftalmitis, infecciones pulmonares, endocarditis, absceso cerebral e infecciones diseminadas.

Las infecciones invasivas por *Scopulariopsis* spp, vistas principalmente en receptores trasplantados de médula ósea, son altamente mortales.

Además de las infecciones, una de las características más sorprendentes de *S. brevicaulis* es su asociación con muertes humanas debido a la inhalación del gas arsino, el cual es producido por el hongo a partir de colorantes con arsenato, presentes en papel tapiz para paredes.

Las colonias de *Scopulariopsis* spp crecen moderadamente rápido y maduran en aproximadamente cinco días. Son de textura que va de granular a polvosa. Por el frente, el color inicialmente es blanco y se transforma a ligeramente marrón

o beige con el tiempo (fig. 6.37a). Al reverso, el color es bronce con centro marrón.

Algunas especies pueden formar colonias oscuras, las que en su caso, deberán estar contempladas dentro de las feohifomicosis (micosis causadas por hifomicetos dematiaceos). Al microscopio se observan hifas septadas, conidióforos, anélides, conidios y ocasionalmente podrán apreciarse clamidoconidios.

Los conidióforos son indistintos de la hifa y pueden ser individuales o ramificados. Las anélides (cilíndricas) son solitarias, en grupos o en forma de penicilios. Los conidios son unicelulares, de redondos a piriformes, la mayoría con textura rugosa con espinas, truncados (planos por un lado) y formando cadenas basípetas (fig. 6.37b).

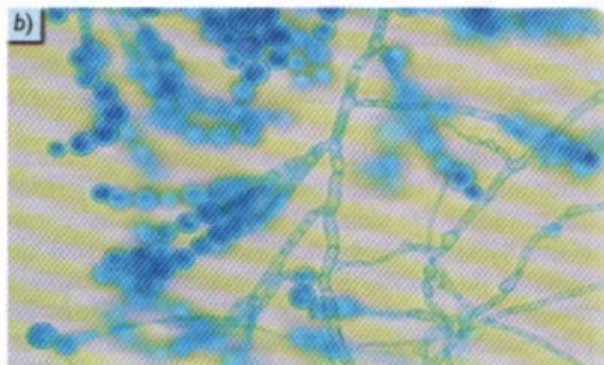
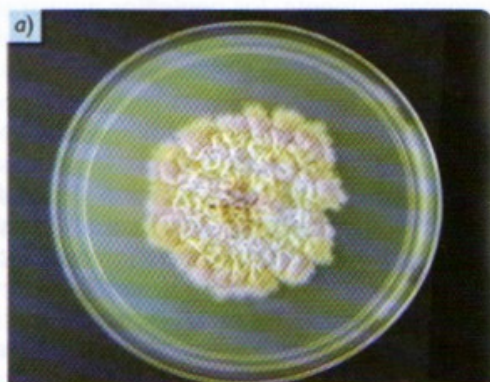


Fig. 6.37. Morfología colonial de *Scopulariopsis brevicaulis*: a) el cultivo en Sabouraud presenta colonias polvosas, plegadas, con zonación y color marrón claro; b) examen directo con azul de algodón, revela anélides y cadenas de aneloconidios redondos.

TRICHODERMA SP

Trichoderma es un género muy común especialmente del suelo y de madera en descomposición.

Gliocladium (con fiálides fuertemente convergentes) y *Verticillium* (con fiálides rectas y moderadamente divergentes) son géneros cercanamente relacionados.

Las colonias tienen crecimiento rápido, primero blancas y vellosas y posteriormente de color amarillo-verde a verde formando mechones compactos frecuentemente en pequeñas áreas o en zonas concéntricas sobre la superficie del agar.

Los conidióforos son repetidamente ramificados, verticilados irregularmente, llevando grupos de fiálides divergentes, a menudo curvas y en forma de matraz. La mayoría de los conidios son verdes, algunas veces hialinos, con paredes lisas o rugosas y están arreglados en cabezas viscosas (gliosporas o gliconidios) agrupados en la punta de las fiálides (véase fig. 8.23). *Trichoderma viridae* ha sido reportado como un agente causal de bola fúngica pulmonar y con peritonitis en pacientes con diálisis peritoneal continua ambulatoria.

VERTICILLIUM SP

Los miembros de este género son frecuentemente aislados del ambiente. Las colonias son de crecimiento rápido con apariencia de aterciopeladas a vellosas, de color blanco a amarillo pálido, transformándose en rosadas-marrón, rojas, verdes con reverso sin color, amarillo o rojo-marrón.

Microscópicamente los conidióforos son erectos y están bien diferenciados, y casi en su totalidad son ramificados en verticilios, con fiálides divergentes en forma de punzón delgado. Los conidios son hialinos o de colores brillantes, la mayoría unicelulares y generalmente surgen formando cabezas viscosas (gliconidios) (fig. 6.38). Con poca frecuencia los hongos del género *Verticillium* se han reportado como agentes de queratitis micótica o incluso de absceso hepático.

FEOHIFOMICOSIS

DESCRIPCIÓN

Término acuñado por Ajello L. y colaboradores en 1974 para agrupar a las infecciones micóticas cutáneas, subcutáneas y sistémicas causadas por hongos pigmentados o dematiáceos, los cuales producen hifas y/o células levaduriformes en el tejido del hospedero. La frecuencia de estas in-



Fig. 6.38. *Verticillium*.

fecciones depende del sitio de la infección, de la rapidez del diagnóstico y de la respuesta al tratamiento antifúngico.

La mortalidad se presenta hasta en 80 % de los casos de feohifomicosis sistémica. Los factores de riesgo asociados a las formas clínicas diseminadas o fungemias son: neutropenia, tratamiento con corticosteroides, hemodiálisis, trasplante de médula ósea y cirugías cardíacas.

En general, las formas superficiales de estas infecciones se presentan en pacientes inmunocompetentes y son secundarias a inoculación traumática; los casos diseminados se observan en inmunocomprometidos y el mecanismo de infección es por inhalación de la estructura infectante de los hongos.

Por las diferentes descripciones se considera que más de 100 especies y 60 géneros de los hongos dematiáceos son causantes de feohifomicosis. La pigmentación es la característica común de estos hongos, dada por la presencia de melanina en la pared celular de los conidios e hifas.

Los agentes más frecuentes son *Cladophialophora bantiana*, *Bipolaris spicifera*, *Exophiala dermatitidis*, *Ochroconis gallopava*, *Alternaria alternata*, *Phialophora richardsiae*, *Exserohilum rostratum* y *Curvularia lunata*. Estos hongos son ubicuos en la naturaleza y se aíslan del suelo, aire, plantas y detritus orgánicos.

En el cuadro 6.5 se muestran los géneros y especies reportados causantes de esta micosis. Recientemente *C. bantiana* se incluye en la lista de los hongos que deben ser manejados siguiendo las indicaciones del nivel 2 de bioseguridad.

Las infecciones pueden ser superficiales, subcutáneas y diseminadas a otros órganos. En el cuadro 6.6 se muestran las formas clínicas y sus agentes etiológicos causales más comunes.

Superficial. En las onicomicosis es común que se afecten las uñas de los pies; las características

clínicas similares a las onicomycosis por dermatofitos. Las formas cutáneas son polimorfas y pueden manifestarse como placas eritematosas, infiltradas, verrugosas y con escama blanca adherente.

Cuadro 6.5. Géneros y especies reportados como causantes de feohifomicosis.

Género	Especie
<i>Alternaria</i>	<i>alternata</i> <i>chartarum</i> <i>infectoria</i> <i>tenuissima</i>
<i>Bipolaris</i>	<i>australiensis</i> <i>hawaiiensis</i> <i>specifera</i>
<i>Chaetomium</i>	<i>atrobrunneum</i> <i>globosum</i> <i>perlucidum</i> <i>strumarium</i>
<i>Cladophialophora</i>	<i>bantiana</i> <i>devriesii</i> <i>modesta</i>
<i>Curvularia</i>	<i>geniculata</i> <i>lunata</i> <i>pallens</i>
<i>Exophiala</i>	<i>castellani</i> <i>dermatitidis</i> <i>jeanselmei</i> <i>mansonii</i>
<i>Exserohilum</i>	<i>rostratum</i>
<i>Ochroconis</i>	<i>gallopavum</i>
<i>Phaeoacremonium</i>	<i>parasiticum</i>
<i>Phialophora</i>	<i>richardsiae</i>
<i>Rhinocladiella</i>	<i>atrovirens</i>

Cuadro 6.6. Formas clínicas de feohifomicosis y géneros causantes.

Forma clínica	Agente etiológico
Onicomycosis	<i>Onychocola</i> , <i>Alternaria</i>
Quiste micótico	<i>Exophiala</i> , <i>Alternaria</i>
Queratitis	<i>Curvularia</i> , <i>Bipolaris</i>
Neumonía	<i>Ochroconis</i> , <i>Rhinocladiella</i>
Sinusitis	<i>Bipolaris</i> , <i>Curvularia</i> , <i>Alternaria</i>
Absceso cerebral	<i>Cladophialophora</i>
Infección diseminada	<i>Bipolaris</i> , <i>Wangiella</i>

Subcutánea. El quiste micótico se localiza en las áreas expuestas como una lesión de aspecto quístico.

Diseminada. Afecta diversos órganos, las manifestaciones clínicas dependerán del órgano afectado y los signos y síntomas son inespecíficos.

ESPECÍMENES BIOLÓGICOS

- Pus de abscesos.
- Escamas de piel.
- Fragmentos de tejidos.
- Líquido cefalorraquídeo.
- Aspirado bronquial.
- Líquido pleural.
- Exudado de úlcera de córnea.

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Examen directo. En los diferentes especímenes biológicos se observan hifas pigmentadas, septadas, fragmentadas de 2-6 μm de diámetro, hifas irregulares (moniliformes), con o sin estructuras levaduriformes, alargadas y esféricas de 25 μm de diámetro. Las células esféricas son de pared delgada y en ocasiones se aprecia una división interna en un solo plano.

Cultivo. Los especímenes se inoculan en agar dextrosa Sabouraud, agar extracto de malta y agar papa dextrosa. Incubación: de 10 a 20 días, a temperatura de 30 a 37 °C. La diferenciación de los géneros y especies se hace con base en el estudio morfológico macroscópico y microscópico. El crecimiento de las colonias fúngicas requiere una cuidadosa interpretación, debido a que es posible que sean considerados como contaminación.

Cladophialophora bantiana. El crecimiento óptimo se da a 30 °C y lento a 37 °C. Macroscópicamente la colonia es lisa a elevada, pulverulenta o aterciopelada, de color verde olivo y al reverso negro. Los conidios se producen de los lados o de la punta de la hifa o conidióforo; son alargados a elípticos, de pared lisa, los extremos son puntiagudos, de 6-12.5 $\times$ 3-5 μm de diámetro, dispuestos en cadenas de 5 a 10 conidios, de color marrón pálido (fig. 6.39). Esta especie puede desarrollarse en presencia de cicloheximida, pero no crece en medio de infusión cerebro-corazón.

Bipolaris spicifera. Las colonias son de creci-

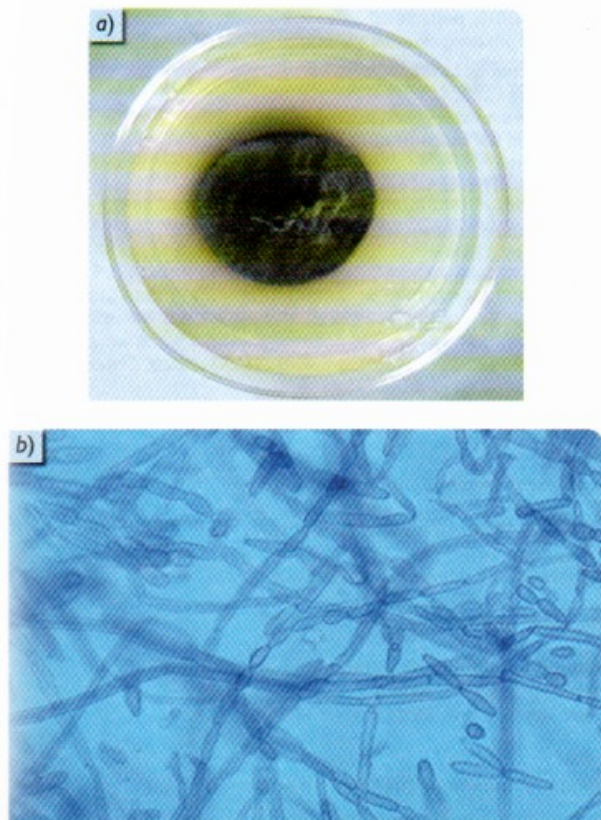


Fig. 6.39. *Cladophialophora bantiana*: a) colonia aterciopelada, verde olivo a marrón; b) conidios elípticos, de pared lisa, dispuestos en largas cadenas.

miento rápido a 25 °C en agar dextrosa Sabouraud, aterciopeladas, planas, de color marrón. Microscópicamente presenta hifas septadas, no ramificadas, con conidios cilíndricos, de pared gruesa, con tres septos y dispuestos en el conidióforo en zigzag.

Exophiala dermatitidis. Inicialmente las colonias son húmedas, gelatinosas de color negro y con las continuas resiembras toman un aspecto velloso. Microscópicamente en los cultivos jóvenes se observan células ovoides, unigemantes y en cultivos maduros predominan hifas septadas, con anélides tubulares, elongadas, con extremo terminal estrecho; conidios elipsoides, unicelulares, de $1-3 \times 3-6 \mu\text{m}$, dispuestos en racimo a los lados o en el ápice de la anélide.

Alternaria alternata. Las colonias son de color verde olivo, grisáceo o marrón grisáceo. Los conidióforos son simples o ramificados, rectos y lisos. Los conidios multicelulares son muriformes con un pico corto o largo, de formas oblongadas a piriformes, con septos en sentido longitudinal y

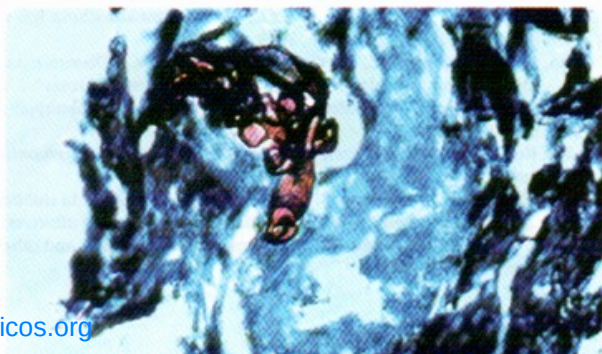
transversal, punta redonda, de $20-63 \times 9-18 \mu\text{m}$, dispuestos en largas cadenas.

Phialophora richardsiae. Las colonias presentan un crecimiento rápido a 30 °C, con zonas concéntricas, ligeramente elevadas, velloosas, de coloración variable (verde olivo y marrón grisáceo). En los cultivos viejos, el pigmento se difunde al medio. Microscópicamente las células conidiógenas son filídes, las cuales son producidas directamente de la hifa vegetativa, son abundantes, simples, delgadas, cuya base mide de $1-3 \mu\text{m}$ y de $2-30 \mu\text{m}$ de longitud y el extremo distal estrecho, con un collar simple o "en forma de campana" de $4 \mu\text{m}$ de diámetro. Los conidios pueden ser hialinos, de pared delgada, elípticos, $1-2 \times 2-4 \mu\text{m}$ de diámetro o de color marrón, esféricos, de $2.5-3 \mu\text{m}$ de diámetro.

Curvularia lunata. Forma colonias de crecimiento rápido, de aspecto algodonoso o aterciopelado, de color variable (pardo, gris o negro). Los conidios son curvos o casi rectos, con tres septos, de $20-32 \times 9-15 \mu\text{m}$ y la pared celular de la segunda célula de los conidios es gruesa e hiperpigmentada. Los conidios están dispuestos en racimo en el ápice del conidióforo.

Histopatología. En los cortes de los tejidos teñidos con H-E se observan las estructuras parásitas pigmentadas (hifas septadas, fragmentadas o moniliformes o células levaduriformes, alargadas, esféricas) (fig. 6.40). Los cambios celulares dependerán de la forma clínica de la enfermedad. Lo característico es la observación de abscesos circunscritos dentro de un granuloma, caracterizado por células epiteliales, histiocitos y gigantes. En el centro del granuloma presenta necrosis con fibrina y polimorfonucleares degenerados. Con la tinción de Fontana-Masson se tiñe fuertemente la estructura parásita. Esta tinción es específica para resaltar la presencia de melanina.

Fig. 6.40. Corte histológico donde se observan hifas tortuosas de color marrón en un caso de feohifomicosis.



BIBLIOGRAFÍA

- Ajello, L. "Hyalohyphomycosis and phaeohyphomycosis: two global disease entities of public health importance", *Eur. J. Epidemiol.*, **2**:243, 1986.
- Álvarez-Martínez, M. J., Miró, J. M., Valls, M. E. y cols., "Prevalence of dihydropteroate synthase genotypes before and after the introduction of combined antiretroviral therapy and their influence on the outcome of *Pneumocystis pneumonia* in HIV-1-infected patients", *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **68**:60, 2010.
- Anane, S., Attouchi, H., Kaouech, E. y cols., "Epidemiological and clinical characteristics of intestinal microsporidiosis", *Sante.*, **20**:21, 2010.
- Andrioli, J. L., Oliveira, G. S., Barreto, C. S. y cols., "Frequency of yeasts in vaginal fluid of women with and without clinical suspicion of vulvovaginal candidosis", *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.*, **31**:300, 2009.
- Baddley, J. W., Andes, D. R., Marr, K. A. y cols., "Factors associated with mortality in transplant patients with invasive aspergillosis", *Clin. Infect. Dis.*, **50**:1559, 2010.
- Bartlett, M. S. y Lee, C. H., "Airborne spread of *Pneumocystis jirovecii*", *Clin. Infect. Dis.*, **51**:266, 2010.
- Bitar, D., Van Cauteren, D., Lanternier, F. y cols., "Increasing incidence of zygomycosis (mucormycosis), France, 1997-2006", *Emerg. Infect. Dis.*, **15**:1395, 2009.
- Calderón, E. J., Gutiérrez-Rivero, S., Durand-Joly, I. y Dei-Cas, E., "*Pneumocystis* infection in humans: diagnosis and treatment", *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, **8**:683, 2010.
- Calderone, R. A., *Candida and Candidiasis*, American Society Microbiology Press, 2002, 488 págs.
- Casadevall, A. y Perfect, J. R., *Cryptococcus neoformans*, ASM Press, 1998, 541 págs.
- Castón-Osorio, J. J., Rivero, A. y Torre-Cisneros, J., "Epidemiology of invasive fungal infection", *Int. J. Antimicrob. Agents*, **32**:S103, 2008.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDCP), "Emergence of *Cryptococcus gattii*-Pacific Northwest, 2004-2010", *Morb. Mortal Wkly Rep.*, **59**:865, 2010.
- Champion, L., Durbach, A., Lang, P. y cols., "Fumagillin for treatment of intestinal microsporidiosis in renal transplant recipients", *Am. J. Transplant.*, **10**:1925, 2010.
- Cheng, V. C., Chan, J. F., Ngan, A. H. y cols., "Outbreak of intestinal infection due to *Rhizopus microsporus*", *J. Clin. Microbiol.*, **47**:2834, 2009.
- Chittick, P., Palavecino, E. L., Delashmitt, B. y cols., "Case of fatal *Blastoschizomyces capitatus* infection occurring in a patient receiving empiric micafungin therapy", *Antimicrob. Agents Chemother.*, **53**:5306, 2009.
- De Hoog, G. S., Queiroz-Telles, F. y cols., "Black fungi: clinical and pathogenic approaches", *Med. Mycol.*, **38**:243, 2000.
- De Hoog, G. S., Guarro, J. y cols., *Atlas of clinical fungi* (2a. ed.), ASM Press, 2001.
- Denson, J. L., Keen, C. E., Froeschle, P. O. y cols., "Adiaspiromycosis mimicking widespread malignancy in a patient with pulmonary adenocarcinoma", *J. Clin. Pathol.*, **62**:837, 2009.
- Dutkiewicz, R. y Hage C. A., "Aspergillus infections in the critically ill", *Proc. Am. Thorac. Soc.*, **7**:204, 2010.
- Elston, D. M., "Fusarium sepsis, voriconazole, and the skin", *Cutis*, **85**:176, 2010.
- Gazzoni, A. F., Oliveira, F. M., Salles, E. F. y cols., "Unusual morphologies of *Cryptococcus* spp in tissue specimens: report of 10 cases", *Rev. Inst. Med. Trop.*, **52**:145, 2010.
- Hartel, P. H., Shilo, K., Klassen-Fischer, M. y cols., "Granulomatous reaction to *Pneumocystis jirovecii*: clinicopathologic review of 20 cases", *Am. J. Surg. Pathol.*, **34**:730, 2010.
- Henrich, T. J., Marty, F. M., Milner, D. A. y Thorner, A. R., "Disseminated *Geotrichum candidum* infection in a patient with relapsed acute myelogenous leukemia following allogeneic stem cell transplantation and review of the literature", *Transpl. Infect. Dis.*, **11**:458, 2009.
- Houbraken, J., Verweij, P. E., Rijs, A. J. y cols., "Identification of *Paecilomyces variotii* in clinical samples and settings", *J. Clin. Microbiol.*, **48**:2754, 2010.
- Kantarcioglu, A. S., Celkan, T., Yücel, A. y cols., "Fatal *Trichoderma harzianum* infection in a leukemic pediatric patient", *Med. Mycol.*, **47**:207, 2009.
- Latgé, J. P. y Steinbach, W. J., *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis, ASM Press, 2009, 568 págs.
- Lee, S. C., Corradi, N., Byrnes, E. J. y cols., "Microsporidia evolved from ancestral sexual fungi", *Curr. Biol.*, **18**:1675, 2008.
- Li, H., Sang, J., Li, R., Liu, Y. y Zhang, J., "Disseminated *Penicillium marneffei* infection with verrucoid lesions in an AIDS patient in Beijing, a non-endemic region", *Eur. J. Dermatol.*, **20**:378, 2010.
- Li, S. S. y Mody, C. H., "Cryptococcus", *Proc. Am. Thor. Soc.*, **7**:186, 2010.
- Machida, M. y Gomi, K., *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*, Caister Academic Press, 2010, 238 págs.
- Mazuelos, E. M. y García, A. I., "Microbiological aspects of the cryptococcosis in the post-HAART era", *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, **28**:S40, 2010.
- Mohanty, D., Dhar, M. y Dwivedi, S., "Mucormycosis", *Trop. Doct.*, **40**:127, 2010.
- Monzón, S., Gil, J., Ledesma, A. y cols., "Occupational asthma IgE mediated due to *Chrysomilia sitophila* in coffee industry", *Allergy*, **64**:1686, 2009.
- Morio, F., Horeau-Langlard, D., Gay-Andrieu, F. y cols., "Disseminated *Scedosporium/Pseudallescheria* infection after double-lung transplantation in patients with cystic fibrosis", *J. Clin. Microbiol.*, **48**:1978, 2010.
- Naggie, S. y Perfect, J. R., "Molds: Hyalohyphomycosis, phaeohyphomycosis, and zygomycosis", *Clin. Chest Med.*, **30**:337, 2009.
- Nedret Koç, A., Mutlu Sarigüzel, F. y Artış, T., "Isolation of *Acremonium strictum* from pleural fluid of a patient with colon adenocarcinoma", *Mycoses*, **52**:190, 2009.
- Pineda, G., Scollo, K., Santiso, G. y cols., "Isolation of *Candida dubliniensis* in different clinical samples. Analysis of phenotypical methods to differentiate it from *Candida albicans*", *Rev. Argent. Microbiol.*, **40**:211, 2008.
- Quan, C. y Spellberg, B., "Mucormycosis, pseudallescheriasis, and other uncommon mold infections", *Proc. Am. Thor. Soc.*, **7**:210, 2010.

BIBLIOGRAFÍA

- Ajello, L. "Hyalohyphomycosis and phaeohyphomycosis: two global disease entities of public health importance", *Eur. J. Epidemiol.*, **2**:243, 1986.
- Álvarez-Martínez, M. J., Miró, J. M., Valls, M. E. y cols., "Prevalence of dihydropteroate synthase genotypes before and after the introduction of combined antiretroviral therapy and their influence on the outcome of *Pneumocystis pneumonia* in HIV-1-infected patients", *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **68**:60, 2010.
- Anane, S., Attouchi, H., Kaouech, E. y cols., "Epidemiological and clinical characteristics of intestinal microsporidiosis", *Sante.*, **20**:21, 2010.
- Andrioli, J. L., Oliveira, G. S., Barreto, C. S. y cols., "Frequency of yeasts in vaginal fluid of women with and without clinical suspicion of vulvovaginal candidiasis", *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.*, **31**:300, 2009.
- Baddley, J. W., Andes, D. R., Marr, K. A. y cols., "Factors associated with mortality in transplant patients with invasive aspergillosis", *Clin. Infect. Dis.*, **50**:1559, 2010.
- Bartlett, M. S. y Lee, C. H., "Airborne spread of *Pneumocystis jirovecii*", *Clin. Infect. Dis.*, **51**:266, 2010.
- Bitar, D., Van Cauteren, D., Lanternier, F. y cols., "Increasing incidence of zygomycosis (mucormycosis), France, 1997-2006", *Emerg. Infect. Dis.*, **15**:1395, 2009.
- Calderón, E. J., Gutiérrez-Rivero, S., Durand-Joly, I. y Dei-Cas, E., "Pneumocystis infection in humans: diagnosis and treatment", *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, **8**:683, 2010.
- Calderone, R. A., *Candida and Candidiasis*, American Society Microbiology Press, 2002, 488 págs.
- Casadevall, A. y Perfect, J. R., *Cryptococcus neoformans*, ASM Press, 1998, 541 págs.
- Castón-Osorio, J. J., Rivero, A. y Torre-Cisneros, J., "Epidemiology of invasive fungal infection", *Int. J. Antimicrob. Agents*, **32**:S103, 2008.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC), "Emergence of *Cryptococcus gattii*-Pacific Northwest, 2004-2010", *Morb. Mortal Wkly Rep.*, **59**:865, 2010.
- Champion, L., Durrbach, A., Lang, P. y cols., "Fumagillin for treatment of intestinal microsporidiosis in renal transplant recipients", *Am. J. Transplant.*, **10**:1925, 2010.
- Cheng, V. C., Chan, J. F., Ngan, A. H. y cols., "Outbreak of intestinal infection due to *Rhizopus microsporus*", *J. Clin. Microbiol.*, **47**:2834, 2009.
- Chittick, P., Palavecino, E. L., Delashmitt, B. y cols., "Case of fatal *Blastoschizomyces capitatus* infection occurring in a patient receiving empiric micafungin therapy", *Antimicrob. Agents Chemother.*, **53**:5306, 2009.
- De Hoog, G. S., Queiroz-Telles, F. y cols., "Black fungi: clinical and pathogenic approaches", *Med. Mycol.*, **38**:243, 2000.
- De Hoog, G. S., Guarro, J. y cols., *Atlas of clinical fungi* (2a. ed.), ASM Press, 2001.
- Denson, J. L., Keen, C. E., Froeschle, P. O. y cols., "Adiaspiromycosis mimicking widespread malignancy in a patient with pulmonary adenocarcinoma", *J. Clin. Pathol.*, **62**:837, 2009.
- Dutkiewicz, R. y Hage C. A., "Aspergillus infections in the critically ill", *Proc. Am. Thorac. Soc.*, **7**:204, 2010.
- Elston, D. M., "Fusarium sepsis, voriconazole, and the skin", *Cutis*, **85**:176, 2010.
- Gazzoni, A. F., Oliveira, F. M., Salles, E. F. y cols., "Unusual morphologies of *Cryptococcus* spp in tissue specimens: report of 10 cases", *Rev. Inst. Med. Trop.*, **52**:145, 2010.
- Hartel, P. H., Shilo, K., Klassen-Fischer, M. y cols., "Granulomatous reaction to *Pneumocystis jirovecii*: clinicopathologic review of 20 cases", *Am. J. Surg. Pathol.*, **34**:730, 2010.
- Henrich, T. J., Marty, F. M., Milner, D. A. y Thorner, A. R., "Disseminated *Geotrichum candidum* infection in a patient with relapsed acute myelogenous leukemia following allogeneic stem cell transplantation and review of the literature", *Transpl. Infect. Dis.*, **11**:458, 2009.
- Houbraeken, J., Verweij, P. E., Rijs, A. J. y cols., "Identification of *Paecilomyces variotii* in clinical samples and settings", *J. Clin. Microbiol.*, **48**:2754, 2010.
- Kantarcioglu, A. S., Celkan, T., Yücel, A. y cols., "Fatal *Trichoderma harzianum* infection in a leukemic pediatric patient", *Med. Mycol.*, **47**:207, 2009.
- Latgé, J. P. y Steinbach, W. J., *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis, ASM Press, 2009, 568 págs.
- Lee, S. C., Corradi, N., Byrnes, E. J. y cols., "Microsporidia evolved from ancestral sexual fungi", *Curr. Biol.*, **18**:1675, 2008.
- Li, H., Sang, J., Li, R., Liu, Y. y Zhang, J., "Disseminated *Penicillium marneffei* infection with verrucoid lesions in an AIDS patient in Beijing, a non-endemic region", *Eur. J. Dermatol.*, **20**:378, 2010.
- Li, S. S. y Mody, C. H., "Cryptococcus", *Proc. Am. Thor. Soc.*, **7**:186, 2010.
- Machida, M. y Gomi, K., *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*, Caister Academic Press, 2010, 238 págs.
- Mazuelos, E. M. y García, A. I., "Microbiological aspects of the cryptococcosis in the post-HAART era", *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, **28**:S40, 2010.
- Mohanty, D., Dhar, M. y Dwivedi, S., "Mucormycosis", *Trop. Doct.*, **40**:127, 2010.
- Monzón, S., Gil, J., Ledesma, A. y cols., "Occupational asthma IgE mediated due to *Chrysomilia sitophila* in coffee industry", *Allergy*, **64**:1686, 2009.
- Morio, F., Horeau-Langlard, D., Gay-Andrieu, F. y cols., "Disseminated *Scedosporium/Pseudallescheria* infection after double-lung transplantation in patients with cystic fibrosis", *J. Clin. Microbiol.*, **48**:1978, 2010.
- Naggie, S. y Perfect, J. R., "Molds: Hyalohyphomycosis, phaeohyphomycosis, and zygomycosis", *Clin. Chest Med.*, **30**:337, 2009.
- Nedret Koç, A., Mutlu Sarıgüzel, F. y Artış, T., "Isolation of *Acremonium strictum* from pleural fluid of a patient with colon adenocarcinoma", *Mycoses*, **52**:190, 2009.
- Pineda, G., Scollo, K., Santiso, G. y cols., "Isolation of *Candida dubliniensis* in different clinical samples. Analysis of phenotypical methods to differentiate it from *Candida albicans*", *Rev. Argent. Microbiol.*, **40**:211, 2008.
- Quan, C. y Spellberg, B., "Mucormycosis, pseudallescheriasis, and other uncommon mold infections", *Proc. Am. Thor. Soc.*, **7**:210, 2010.

- Sahand, I. H., Maza, J. L., Eraso, E. y cols., "Evaluation of CHROM-Pal medium for the isolation and direct identification of *Candida dubliniensis* in primary cultures from the oral cavity", *J. Med. Microbiol.*, **58**:1437, 2009.
- Sanjay, G. y Revankar, M. D., "Phaeohyphomycosis", *Infect. Dis. Clin. N. Am.*, **20**:609, 2006.
- Sherif, R. y Segal, B. H., "Pulmonary aspergillosis: clinical presentation, diagnostic tests, management and complications", *Curr. Opin. Pulm. Med.*, **16**:242, 2010.
- Szentai, J. A., Kam, J. K., Yohendran, J. y cols., "Presumed *Scopulariopsis brevicaulis* chorioretinitis in a stem cell transplant recipient", *Clin. Experiment. Ophthalmol.*, **38**:314, 2010.
- Talabani, H., Sarfati, C., Pillebout, E. y cols., "Disseminated infection with a new genovar of *Encephalitozoon cuniculi* in a renal transplant recipient", *J. Clin. Microbiol.*, **48**:2651, 2010.
- Unal, A., Koc, A. N., Sipahioglu, M. H. y cols., "CAPD-related peritonitis caused by *Rhodotorula mucilaginosa*", *Perit. Dial. Int.*, **29**:581, 2009.
- Wong, K. F., "Marrow penicilliosis: a readily missed diagnosis", *Am. J. Clin. Pathol.*, **134**:214, 2010.
- Wu, C. J., Chang, T. C., Lee, H. C. y cols., "Verticillium infection -a rare cause of hepatosplenic abscesses", *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **62**:427, 2008.
- Zupan, J. y Raspor, P., "Invasive growth of *Saccharomyces cerevisiae* depends on environmental triggers: a quantitative model", *Yeast.*, **27**:217, 2010.

Seudomicosis

SEUDOMICOSIS SUPERFICIALES

Las seudomicosis son un grupo de patologías que, a pesar de no ser causadas por hongos, producen cuadros clínicos en muchas ocasiones difíciles de distinguir de las micosis verdaderas. Por otra parte, durante mucho tiempo, los agentes etiológicos de estas seudomicosis fueron considerados hongos.

En la actualidad la mayoría se ubica entre el grupo de las bacterias y unos cuantos corresponden a algas aclorofílicas. Las infecciones más importantes de este grupo son eritrasma, tricomicosis axilar y prototecosis.

ERITRASMA

DESCRIPCIÓN

Es una afección cutánea causada por *Corynebacterium minutissimum*, bacilo difterioide gram-positivo que se puede aislar de la piel de personas clínicamente sanas. No se conoce la frecuencia real del padecimiento y se ha observado que, en muchas ocasiones, el paciente ignora que tiene la enfermedad, sobre todo en casos leves.

Las formas clínicas son variables y pueden ser:

Lesiones de grandes pliegues. Como los genitocrurales, submamarios o axilares; se caracteri-

zan por producir lesiones de color marrón rojizo, de 3 a 10 centímetros de diámetro, de bordes precisos, son descamativas, exudativas y pruriginosas.

Lesiones de áreas interdigitales. Son lesiones en placa, eritematosas, redondas, con borde escamoso, o bien, lesiones vesiculosas que son pruriginosas al inicio y posteriormente dolorosas a la presión, cuando la vesícula se ha roto.

Formas generalizadas. Se observan placas brillantes descamativas que afectan a varias partes de la piel, principalmente a la del tronco. El padecimiento es más frecuente en los hombres. La humedad y el calor realizan un papel importante para el desarrollo de esta infección; es poco contagiosa y en la mayoría de los casos se considera que es una infección oportunista, ya que se observa en individuos con diversos factores de inmunodeficiencia.

ESPECÍMENES BIOLÓGICOS

- Escamas.
- Exudados.

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Examen directo. En las escamas aclaradas con KOH a 15 % se observan estructuras redondas de 1 micra de diámetro, bacilos aislados de 1 a 3 μ m de longitud y filamentos cortos fragmentados, for-

mados por elementos cocoides o bacilares, estos últimos de 4 a 7 μm de talla.

Frotis. Se observan los mismos elementos descritos anteriormente, los cuales son positivos a la tinción de Gram. En la mayoría de los casos basta con estos procedimientos para establecer el diagnóstico (fig. 7.1).

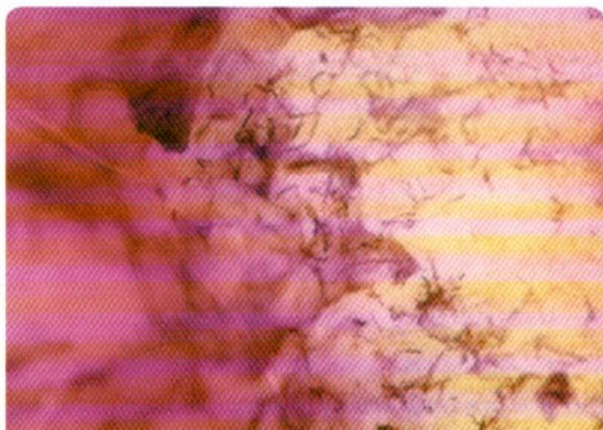


Fig. 7.1. Eritrasma. Escamas teñidas con tinción Gram, donde se observan los pseudofilamentos formados por bacilos de *Corynebacterium minutissimum*.

Cultivo. Los medios más útiles, incubados a 37 °C, son el agar sangre, medio de Loeffler o un medio especial para *C. minutissimum*, constituido por 20 % de suero fetal de bovino, 2 % de agar y 78 % de medio de cultivo de tejido número 199. El cultivo es difícil de obtener aun en estos medios. En caso de ser positivo, entre las 12 y 24 horas siguientes se presentan colonias de 2 a 4 mm de diámetro, brillantes y translúcidas. El frotis y la tinción de Gram revelan a los elementos difteroides grampositivos.

Pruebas especiales. Las lesiones clínicas, al ser examinadas bajo luz de Wood, así como también los cultivos presentan una fluorescencia rojo ladrillo, coral o naranja (ver pruebas especiales para dermatofitos).

TRICOMICOSIS AXILAR

DESCRIPCIÓN

Es una infección bacteriana de los pelos del pubis y de las axilas causada por *Corynebacterium tenuis*, bacilo difterioide grampositivo.

La afección es asintomática y se caracteriza por la presencia de nodosidades blandas, dispuestas a lo largo y alrededor de los pelos afectados. Habitualmente, el color de estas concreciones es blanco amarillento, aunque en ocasiones puede ser rojo o negro.

El padecimiento es más frecuente en personas del sexo masculino, la mayoría de las veces jóvenes, en quienes la hiperhidrosis y probablemente la mala higiene sean los factores desencadenantes. En algunos pacientes que presentan esta patología, la transpiración, al combinarse con los productos metabólicos de las bacterias, produce manchas en la ropa y es esto lo que motiva la consulta médica.

ESPÉCIMEN BIOLÓGICO

- Pelos.

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Examen directo. Macroscópicamente se observan nódulos blancos, blandos y poco adherentes a lo largo de los pelos afectados. Microscópicamente, las preparaciones a partir de los nódulos aclaradas con KOH al 15 % presentan organismos bacilares y cocoides inmersos en un material mucilaginoso. Se pueden observar los pelos teñidos con una gota de azul de algodón (fig. 7.2).

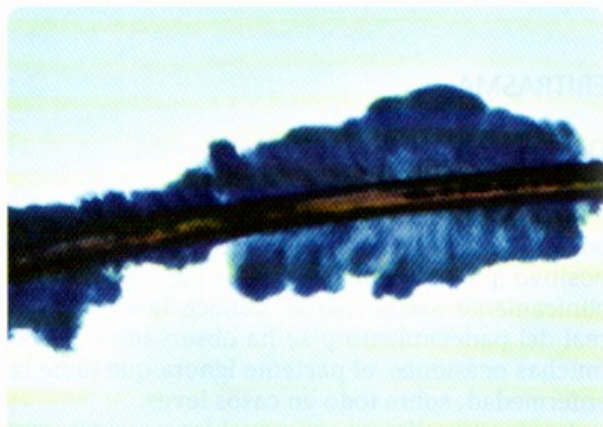


Fig. 7.2. Pelo teñido con azul de algodón, en donde se observan las concreciones formadas por estructuras cocoides correspondientes a *Corynebacterium tenuis*.

Frotis. Las nodulaciones desprendidas del pelo son positivas a la tinción de Gram y se observan elementos cocoides de 1 micra de diámetro y elementos bacilares de 2 a 4 μm de longitud. Ambos tipos de estructuras fijan el colorante de manera irregular (fig. 7.3).

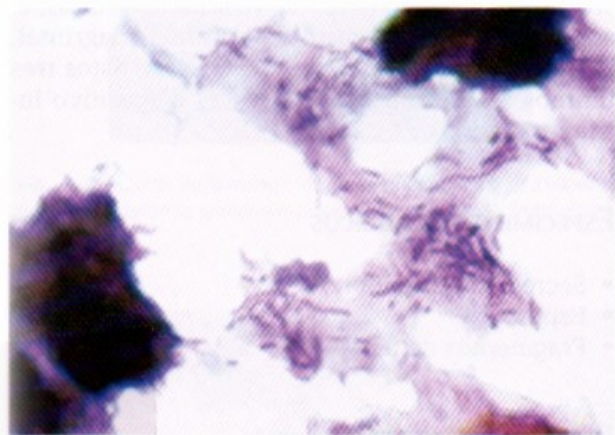


Fig. 7.3. Frotis teñido con Gram, a partir de nodulaciones formadas por *C. tenuis* en pelo.

Cultivo. Se realiza en medios enriquecidos, como el agar sangre de carnero con 1 % de Tween 80, se incuba a 37 °C y en un plazo de 24 a 48 horas se obtienen colonias brillantes, de color blanco grisáceo y duras. El frotis teñido con tinción de Gram muestra pseudofilamentos ramificados y elementos difteroides aislados.

PROTOTECOSIS

DESCRIPCIÓN

Es un padecimiento ocasionado por miembros del género *Prototheca* spp que son algas sin clorofila. Estos agentes fueron clasificados inicialmente como levaduras y después reclasificados como *Prototheca* sp. Biológicamente son muy semejantes a otro género de algas con clorofila, llamado *Chlorella* sp.

Las formas clínicas de la prototecosis son las siguientes:

- Cutáneas y subcutáneas.
- Retroolecraneana.
- Intestinal.

- Onixis.
- Generalizada (sólo un caso notificado).

Son tres las especies de *Prototheca* que tienen importancia desde el punto de vista clínico: *P. wickerhamii*, *P. zopfii* y *P. stagnora*. Algunos autores hablaron anteriormente de *P. filamenta*, pero actualmente se le considera entre otro género, que es *Fisuricella filamenta*, el cual no produce prototecosis.

ESPECÍMENES BIOLÓGICOS

- Escamas.
- Material de biopsia.
- Exudado de lesiones.

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Examen directo. Los productos se montan en KOH al 15 % o en azul de algodón, y en algunos casos es posible observar estructuras redondeadas de 10 a 20 μm de diámetro.

Cultivo. Se obtiene fácilmente en medio de Sabouraud, la morfología microscópica es muy parecida a las colonias de levaduras, siendo las de *Prototheca* de un color blanco amarillento. En el microscopio se observan estructuras generalmente redondas, de 8 a 20 μm de diámetro, que contienen endosporas en su interior en número de 2 a 20 según la especie.

Histopatología. Las algas se observan fácilmente en los cortes histopatológicos, sobre todo con la tinción PAS o la de Grocott-Gomori. Se observan estructuras redondas u ovoides de 15 a 20 μm de diámetro.

SEUDOMICOSIS SUBCUTÁNEAS POR ACTINOMICOSIS

DESCRIPCIÓN

Es una enfermedad tumoral producida por actinomicetos, de evolución crónica, granulomatosa y supurativa, en la que se observan granos amarillos. Se disemina por contigüidad y en raras ocasiones por vía hematógena.

Los agentes etiológicos son bacterias anaerobias o microaerófilas, de forma bacilar, poco ra-

mificadas y que se dividen por fragmentación; son grampositivas y no ácido alcohol resistentes.

En la mayoría de los casos, *Actinomyces israelii* es el causante de la actinomicosis; sin embargo, actualmente *A. viscosus* y *Arachnia propionica* han mostrado un aumento en la frecuencia de aislamiento. Otros agentes etiológicos son: *A. naeslundii*, *A. odontolyticus*, *A. bovis* y *Bifidobacterium dentium* (*eriksonii*). Todos ellos forman parte de la biota anaerobia habitual del cuerpo humano y se aíslan con relativa facilidad de la cavidad bucal.

La actinomicosis se presenta en forma esporádica y su distribución geográfica es cosmopolita, se presenta en todos los grupos de edad, pero es más frecuente entre los 30 y los 40 años.

El sexo y la ocupación no influyen aparentemente en su incidencia. Se encuentra asociada a factores de oportunismo, entre los cuales los más importantes son los traumatismos o fracturas y la higiene bucal deficiente. La enfermedad también se da en animales mamíferos, como vacas, caballos, ovejas, perros y gatos.

Existen varias formas de actinomicosis y dependiendo de su localización se han dividido en:

Cervicofacial. Es la forma clínica más común y se presenta después de un traumatismo en la mucosa bucal, como es una extracción dentaria o una fractura de la maxila. Se caracteriza por dolor leve al principio, edema blando de la región afectada que posteriormente se vuelve duro, masas nodulares granulomatosas que se abscesan y drenan material purulento, y granos amarillentos constituidos por las colonias del agente etiológico. En algunos casos, la infección se extiende y puede afectar los huesos del cráneo y las meninges.

Pulmonar. Los actinomicetos llegan al pulmón por extensión directa de una infección del cuello o por la aspiración de microorganismos provenientes de las caries dentarias. Las lesiones se desarrollan principalmente en la región hiliar y los síntomas son: febrícula, tos productiva, hemoptisis, pérdida de peso y dolor pleural. El padecimiento ataca a la pleura y se extiende a la pared torácica hasta drenar un material seropurulento por fístulas a la piel.

Abdominal y pélvica. Es el resultado de una perforación intestinal accidental con objetos diversos, por ejemplo: espinas de pescado, huesos de pollo, heridas con armas punzocortantes o de fuego; sin embargo, la causa más frecuente se debe

a infecciones primarias a nivel de la tuba uterina, vesícula biliar e hígado. Los síntomas iniciales son insidiosos y se relacionan con el órgano primario afectado. También se presenta invasión de la pared abdominal, formándose fístulas que drenan secreción purulenta con granos.

Otros sitios. Los órganos y tejidos afectados son: el riñón, el húmero, las válvulas cardíacas, el sistema nervioso central, el conducto lagrimal, el útero, el cuello uterino y la vagina; estos tres últimos se asocian con el uso del dispositivo intrauterino.

ESPECÍMENES BIOLÓGICOS

- Secreción purulenta.
- Espujo.
- Fragmentos de tejido.

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Antes de efectuar los exámenes correspondientes es aconsejable lavar la secreción purulenta con solución salina isotónica tres veces.

Examen directo. Se realiza a partir de la secreción purulenta o del espujo. Se observan granos de color amarillo, también llamados "granos de azufre" que llegan a medir hasta 2.5 mm de diámetro y que presentan finas prolongaciones periféricas llamadas clavos.

Frotis. Se efectúa a partir del espujo y se tiñe con la coloración de Gram; se observan granos y masas de filamentos grampositivos.

Cultivo. Los productos se deben sembrar en medios anaeróbicos especiales, como tioglicolato, medio de Garrod, medio de anaerobiosis o medio especial para crecimiento de *Actinomyces* o, en su defecto, cultivar el microorganismo en caldo infusión-cerebro corazón o agar sangre en condiciones de anaerobiosis (fig. 7.4).

Si los granos son muy grandes, pueden macerarse con solución salina en un mortero estéril y posteriormente hacer un frotis y el cultivo (fig. 7.5).

El desarrollo de colonias suspendidas en los medios líquidos para anaerobios da la certeza del crecimiento del organismo; sin embargo, la morfología colonial es muy variable, por lo que es necesario efectuar otras pruebas para la correcta caracterización del microorganismo.

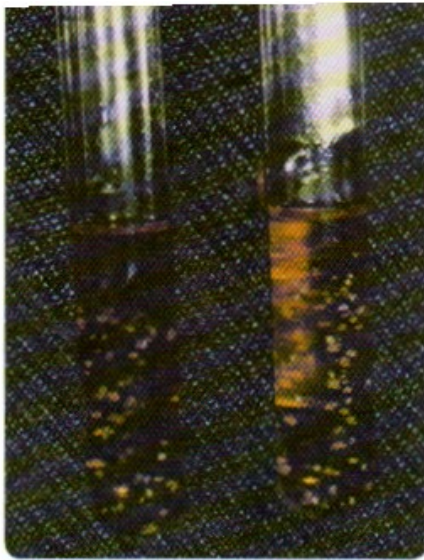


Fig. 7.4. Aspecto de la colonia de *A. israelii* en medio de cultivo de tioglicolato, colonias granulosas suspendidas en el medio (ocho días de incubación).

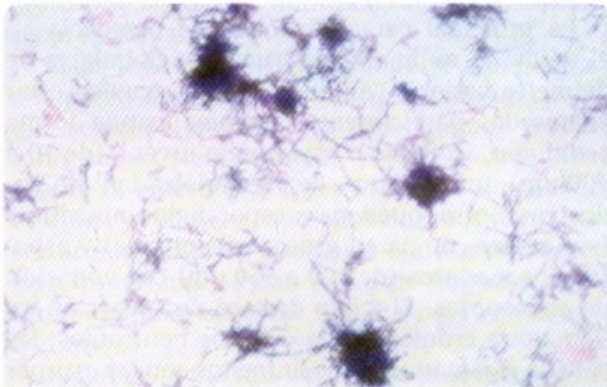


Fig. 7.5. Frotis de *A. israelii* teñido con Gram, efectuado a partir de una colonia de *A. israelii*.

Pruebas especiales. En el cuadro 7.1 se anotan las principales características bioquímicas y fisiológicas que ayudan a establecer la identificación de las diferentes especies de agentes de actinomicosis.

Histopatología. Se observa una reacción granulomatosa crónica, abscesos y supuración. Los granos (fig. 7.6), que miden de 100 a 300 μm , muestran tres capas estructurales:

- Centro con filamentos ramificados en una disposición radial.
- Cuerpos cocoides en la parte media.
- Zona periférica, formada por clavaz que probablemente sean depósitos de complejos antígeno-anticuerpo y neutrófilos.

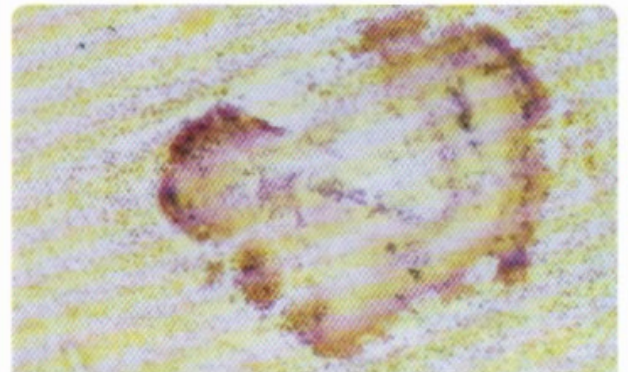


Fig. 7.6. Actinomicosis. Corte histológico que muestra un grano de *A. israelii* formado de elementos cocoides, bacilares y clavaz periféricas. (Cortesía de E. Macotela-Ruiz.)

Cuadro 7.1. Características fisiológicas y bioquímicas de los principales agentes causantes de actinomicosis.

Características	<i>Actinomyces bovis</i>	<i>Actinomyces israelii</i>	<i>Actinomyces naeslundii</i>	<i>Bifidobacterium eriksonii</i>	<i>Arachnia propionicus</i>
Aerobio	var	var	var	0	var
Anaerobio	+	+	+	+	+
Catalasa	0	0	0	0	0
Leche tornasolada	red	red	red	red con grumos	red
Producción de ácido propiónico	0	0	0	0	0 ⁺
Hidrólisis de almidón	+	0	0	+	0
Fermentación					
Glucosa	A	A	A	A	A
Manitol	0	A	0	A	A/var
Manosa	0/var	A	A	A	A
Xilosa	A/var	A	0	A	0
Rafinosa	0	A	A	A	A

var, variable.

red, reducida.

A, producción de ácido.

RINOSPORIDIOSIS

DESCRIPCIÓN

La rinosporidiosis es un padecimiento caracterizado por el desarrollo de pólipos y papilomas sobre las mucosas, principalmente la nasal y la conjuntival y raramente sobre la piel. El agente etiológico *Rhinosporidium seeberi* sólo se conoce en forma parasitaria. Actualmente *Rhinosporidium seeberi* no se considera un hongo sino un mesomicetozooario, según estudios de biología molecular; sin embargo, su posición taxonómica aún no está claramente definida.

Esta infección se considera de baja frecuencia. Es un padecimiento de los habitantes del continente asiático, aunque se ha encontrado también en África, América, Oceanía y Europa. Las personas del sexo masculino se afectan más frecuentemente y el grupo etario, en el que se observa esta micosis, es el de los 20 a los 35 años, aunque se han presentado casos raros en niños.

Se ignora mucho acerca de la biología de este organismo, así como de la epidemiología del padecimiento; se cree que el contacto prolongado de las personas con el agua estancada de lagos, lagunas, estanques, etc., realiza un papel importante en el mecanismo de infección. Animales como los caballos, las mulas y los bovinos pueden también ser atacados.

Hasta el momento no se conoce ningún factor de inmunosupresión asociado al padecimiento; sin embargo, puede ser que ciertas actividades como la pesca y la natación en estos lugares estén ligadas a la enfermedad.

En cuanto al aspecto clínico, los pólipos se presentan como masas sésiles o pediculadas, rojas y friables, que sangran fácilmente y están cubiertas de pequeños puntos blancos que ponen en evidencia la presencia del parásito.

En 50 % de los casos las lesiones se encuentran en la mucosa nasal, pero el número de casos de localización conjuntival se observa cada vez con mayor frecuencia. Otros sitios afectados pueden ser el oído, faringe, laringe, uretra y vagina. Esta micosis es de pronóstico benigno.

ESPECÍMENES BIOLÓGICOS

- Material de biopsia.
- Exudados.

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Examen directo. Se efectúa con KOH al 15 %, por medio del cual se observan los esporangios redondos, de pared gruesa y cuyo diámetro varía, de acuerdo con el estado de madurez, entre los 100 y 350 μm . Contienen en su interior endosporas de 7 a 10 μm y a veces éstas se ven libres en la secreción.

Cultivo. Hasta el momento no ha sido posible cultivar este organismo.

Histopatología. *Rhinosporidium seeberi* puede verse fácilmente en los cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina, por lo cual no se requieren de tinciones especiales para el diagnóstico; sin embargo, se pueden hacer las de Gridley, PAS o de Gomori.

La principal característica es la presencia en el tejido de numerosas estructuras globulares de diámetro variable. Algunas de ellas pueden estar colapsadas parcialmente, asumiendo una forma semilunar, trofocito o esporangio juvenil (de 10 a 100 μm), unicelulares, de pared delgada y sin endosporas; otras pueden ser esporangios inmaduros (sin núcleo, de pared gruesa bilaminada) y esporangios maduros (de 100 a 350 μm) con zonación de endosporas. El tejido destaca una reacción inflamatoria crónica, en la cual los neutrófilos, las células plasmáticas y los linfocitos son las estirpes celulares presentes (fig. 7.7).

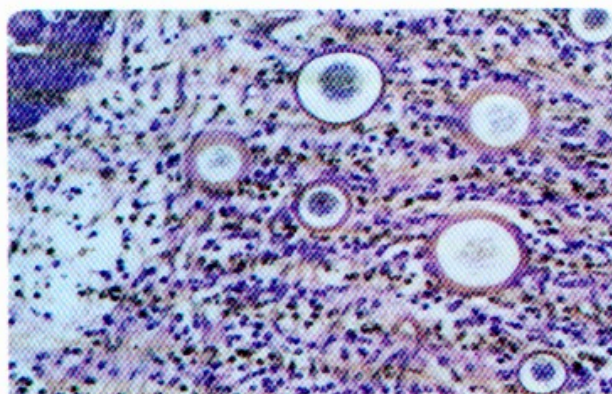


Fig. 7.7. Corte histológico teñido con hematoxilina-eosina, donde se observan las estructuras redondas de pared muy gruesa, de diámetro variable y con endosporas en el interior, características de *R. seeberi*. [Cortesía de R. Mayorga.]

SEUDOMICOSIS SISTÉMICAS, NOCARDIOSIS

DESCRIPCIÓN

La nocardiosis es una enfermedad aguda o crónica, generalmente supurativa, causada por la inhalación o el contacto traumático con actinomicetos aerobios que habitan en el suelo y se asocia a pacientes con inmunodepresión, en quienes el agente se desarrolla en forma de seudofilamentos. La localización inicial de las lesiones puede ser pulmonar primaria y cutánea primaria.

La infección pulmonar primaria constituye 75 % de los casos conocidos y de esta forma se desarrolla una neumonía que puede ser lobular y frecuentemente de evolución crónica. La lesión puede ser un absceso pulmonar solitario, una neumonía necrotizante aguda, un infiltrado difuso o una fibrosis progresiva.

Estas lesiones pueden extenderse a la pleura y a la pared torácica y dar por resultado un cuadro que semeje cualquier otro padecimiento respiratorio, no existen síntomas y signos característicos de la enfermedad, por lo que el diagnóstico es difícil y requiere exámenes de laboratorio para confirmarlo. En los pacientes con inmunodepresión importante se dan casos de diseminación a otros órganos, como el sistema nervioso central o el riñón.

En un pequeño número de casos se presenta en forma cutánea primaria con lesiones que incluyen edema, pústulas y un síndrome linfocutáneo que semeja a una esporotricosis. Esta afección es relativamente benigna y algunas veces cura en forma espontánea o con un tratamiento corto a base de sulfonamidas.

El agente etiológico más común es *Nocardia asteroides*, aun cuando se conocen casos provocados por *N. brasiliensis*, *N. otitidiscaviarum* y otras especies emergentes, como *N. cyriacigeorgica* y *N. veterana*.

La nocardiosis es cosmopolita y no tiene predisposición racial ni ocupacional. En las revisiones de casos clínicos se ha observado que hay un promedio de 2:1 o 3:1 del sexo masculino sobre el femenino; la incidencia es mayor entre los 30 y los 50 años de edad. Solamente en 50 % de los casos se conocen alguno o varios factores predisponentes o de oportunismo.

ESPECÍMENES BIOLÓGICOS

- Esputo.
- Material de biopsia.
- Pus y exudado de lesiones.

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Frotis. A partir de cualquiera de los productos biológicos se realiza un frotis y se tiñe con las técnicas de Gram, Fite o Kinyoun. Se observan filamentos largos, sinuosos, ramificados y fragmentos bacilares grampositivos y parcialmente ácido con alcohol resistente (fig. 7.8).

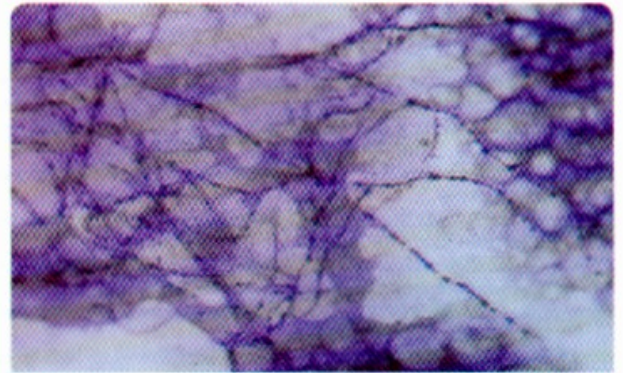


Fig. 7.8. *Nocardia asteroides*. Frotis de esputo teñido con la técnica de Fite. Obsérvense los filamentos formados por elementos bacilares.

Cultivo. Se emplean los mismos productos biológicos y se siembran en los medios de Lowenstein-Jensen y Sabouraud sin antibióticos, con extracto de levadura al 0.5 %. Véase la descripción morfológica, colonial y pruebas bioquímicas para la diferenciación de la especie en el capítulo del micetoma (fig. 7.9).

Fig. 7.9. *Nocardia asteroides* en agar Sabouraud, colonias de superficie rugosa, cerasas, circunscritas y de color coral.



Histopatología. Con mayor frecuencia las lesiones son fibróticas. Hay un infiltrado denso de leucocitos polimorfonucleares dentro de los nódulos, así como fibrina, linfocitos y células plasmáticas. En los nódulos de gran tamaño puede presentarse necrosis seguida de cavitación, algunas veces fibrosis, células de Langhans y necrosis caseosa, lo que permite diferenciar las lesiones de la nocardiosis de aquéllas producidas por la tuberculosis. Algunas veces se presentan lesiones encapsuladas, especialmente en el cerebro.

Cuando se utiliza la tinción de hematoxilina-eosina, se confunden fácilmente los microorganismos causales debido a que no se tiñen. Con la tin-

ción de Gram modificada se observan delicados filamentos muy ramificados, además de cadenas de cuerpos bacilares.

Con la tinción de Kinyoun se observan los microorganismos, pero por su tendencia a fragmentarse en formas bacilares cortas, se confunden con los bacilos de la tuberculosis. Los filamentos se observan bien con la tinción de plata-metamina, siempre y cuando la exposición al colorante sea prolongada.

Pruebas especiales. Véanse las pruebas bioquímicas para actinomicetales en el capítulo del micetoma.

BIBLIOGRAFÍA

- Abid, M., Ben-Amar, M., Damak, Z. y cols., "Intrauterine device and pelvic tumor: two case reports of pelvic actinomycosis with pseudotumor from tropical zones", *Med. Trop. (Mars.)*, 70:285, 2010.
- Ambrosioni, J., Lew, D. y Garbino, J., "Nocardiosis: updated clinical review and experience at a tertiary center", *Infection*, 38:89, 2010.
- Arce, M. y Villarreal, I. P., "¿Pseudomicosis superficiales o corinebacteriosis cutáneas?", *Dermatología Rev. Mex.*, 43:510, 1999.
- Bryant, E., Davis, C. L., Kucenic, M. J. y Mark, L. A., "Lymphocutaneous nocardiosis: a case report and review of the literature", *Cutis*, 85:73, 2010.
- Couble, A., Rodríguez-Nava, V., De Montclos, M. P. y cols., "Direct detection of *Nocardia* spp. in clinical samples by a rapid molecular method", *J. Clin. Microbiol.*, 43:1921, 2005.
- Formiga, L. C., Malburg, T. C. y De Assis, T. L., "Tricomicose axilar: Isolamento e Caracterizacao de Difteroides", *An. Bras. Dermatol.*, 58:21, 1983.
- González-Mendoza, R., "Rinopsporidiasis en México. Revisión de la literatura nacional y comentarios epidemiológicos. A propósito de la observación de dos nuevos casos", *Bol. Soc. Mex. Mic.*, 9:149, 1975.
- Holdiness, M., "Management of cutaneous erythrasma", *Drugs*, 62:1131, 2000.
- Jang, S. M., Na, W., Jun, Y. J. y Paik, S. S., "Primary vesical actinomycosis diagnosed by routine urine cytology", *Acta Cytol.*, 54:658, 2010.
- Lee, J. H., Lee, K. G., Oh, Y. H. y cols., "Actinomycosis of the pancreas: a case report and review of the literature", *Hepatogastroenterology*, 57:358, 2010.
- Lee, J. H., Whitby, M. y Hall, B. I., "*Nocardia cyriacigeorgica* abscess of the conus medullaris in an immunocompetent host", *J. Clin. Neurosci.*, 17:1194, 2010.
- Levit, F., "Trichomycosis axillaris", *J. Am. Acad. Dermatol.*, 22:858, 1990.
- Maki, K., Shinagawa, N., Nasuhara, Y. y cols., "Endobronchial actinomycosis associated with a foreign body-successful short-term treatment with antibiotics", *Intern. Med.*, 49:1293, 2010.
- Mathew, J. S., Padhy, S., Lata, S. y cols., "Case report: teleryngoscopy-guided flexible fiberoptic intubation for laryngeal rhinopsporidiosis", *Anesth. Analg.*, 110:1066, 2010.
- Michel Nguyen, A., Nourrit, J., Penaud, A. y Nicoli, R. M., "Isolament de *Fissuricella filamenta* a partir de lésions cutanées humaines", *Bull. Soc. Fr. Mycol. Med.*, 17:189, 1988.
- Nishida, R., Mori, Y., Iwasaki, H. y cols., "Pulmonary nocardiosis developed in a hematopoietic stem cell transplant recipient with bronchiolitis obliterans", *Intern. Med.*, 49:1441, 2010.
- Pore, R.S., "Fissuricella gen. nov. a new taxon for *Prototheca filamenta*", *Saburaudia*, 15:69, 1977.
- Rodrigues, C., Costa, T., Martins, V. y Matos, F., "Thoracic nocardiosis", *Rev. Port. Pneumol.*, 15:1199, 2009.
- Salinas Carmona, M. C., Castro Corona, M. A. y Zúñiga de Jesús, J. M., "Actinomicetos patógenos para el hombre y la nocardiosis", *Med. Univer.*, 1:178, 1999.
- Schlebusch, S., Nimmo, G. y Carter, R., "Bowel abscess with *Nocardia veterana* associated with colon carcinoma", *Pathology*, 42:306, 2010.
- Shetty, A., Ganpule, A. y Desai, M. R., "Solitary renal actinomycosis", *Urol. J.*, 7:80, 2010.
- Sullivan, D. C. y Chapman, S. W., "Bacteria that masquerade as fungi: actinomycosis/nocardia", *Proc. Am. Thor. Soc.*, 7:216, 2010.
- Timoteo, A. T., Branco, L. M., Pinto, M. y cols., "Nocardial endocarditis after mitral valve replacement: case report and review of the literature", *Rev. Port. Cardiol.*, 29:291, 2010.
- Uzcátegui-Negron, M., Serrano, J. A., Boiron, P. y cols., "Clasificación e identificación de especies de actinomicetos: un estudio fenotípico comparativo", *Rev. Soc. Ven. Microbiol.*, 29:91, 2009.

Hongos contaminantes comunes de laboratorio

En el laboratorio de micología médica, el aislamiento de hongos contaminantes a partir de productos biológicos es un hecho muy frecuente, lo cual se debe a que muchos de los especímenes provienen de áreas habitualmente no estériles, además de que muchas micosis afectan tejidos superficiales que se encuentran en contacto con el ambiente y, por tanto, con los hongos contaminantes del aire, tierra o agua.

Debido a que día a día aumenta el número de factores de oportunismo en los pacientes, la importancia de los hongos considerados como "contaminantes" radica en que, dependiendo del sistema inmune del paciente, pueden llegar a ser la causa directa de una infección micótica o, en el mejor de los casos, ser la causa directa de problemas alérgicos en pacientes con hipersensibilidad.

Por lo anterior, es necesario que el personal de laboratorio de micología médica conozca y sea capaz de identificar los hongos "contaminantes" aislados con mayor frecuencia a partir de productos biológicos e interpretar el significado patológico que puedan tener.

A continuación se presentan las características morfológicas de algunos hongos contaminantes (ordenados alfabéticamente) comunes en el aislamiento para el diagnóstico micológico.

Acremonium. Revisar descripción y figura en hialohifomicosis en el capítulo 6.

Alternaria. Es un dematiáceo que se aísla con gran frecuencia en el laboratorio; este género de

hongos puede ocasionar cuadros respiratorios de tipo alérgico, feohifomicosis y aun invasión de las uñas.

Los conidios de *Alternaria* son de forma variable, aunque la gran mayoría son alargados, con una base ancha y el extremo distal un poco más delgado. Presentan septos longitudinales y transversales (antiguamente se conocía a estos conidios como dictiosporas).

Los conidios pueden estar aislados o formando cadenas, en las cuales el primer conidio se origina de un orificio pequeño en el extremo del conidióforo, y a partir del extremo distal del primer conidio se origina otro, y así de manera sucesiva hasta formarse cadenas de cinco conidios o más (fig. 8.1).



Fig. 8.1. *Alternaria*.

El cultivo es de crecimiento rápido, llegando a cubrir por completo una caja de Petri en un periodo de cinco a 10 días. Es de color gris oscuro, verde oscuro o negro, de superficie lanosa y bordes irregulares. La forma de reproducción sexual de este hongo lo ubica en el phylum Ascomycotina, los géneros *Pleospora* sp y *Clathrospora* sp.

Aureobasidium. Es un ascomiceto homotálico que al principio presenta un aspecto levaduriforme, de color blanco o rosado, que con el tiempo se torna negro y adquiere un aspecto plegado. Las hifas son cortas, multiseptadas, de paredes gruesas y pigmentadas. Produce pequeñas espículas a partir de las cuales se producen conidios hialinos, los cuales se forman a un mismo tiempo en diferentes puntos de la célula conidiógena. Los conidios posteriormente sufren un proceso de gemación para formar cadenas de otros conidios que se pigmentan (fig. 8.2).

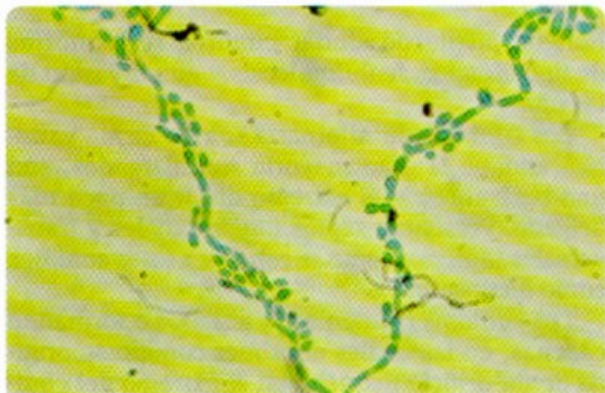


Fig. 8.2. *Aureobasidium*. Hifas hialinas tabicadas y conidios blásticos.

Chrysonilia (Monilia). Revisar descripción en hialohifomicosis (fig. 8.3) en el capítulo 6.

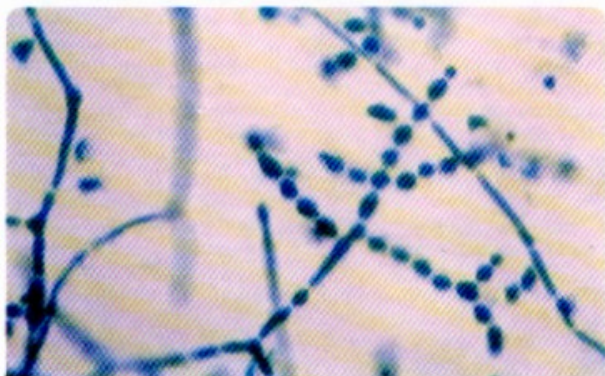


Fig. 8.3. *Monilia* sp.

Chrysosporium. Revisar descripción en hialohifomicosis (fig. 8.4) en el capítulo 6.

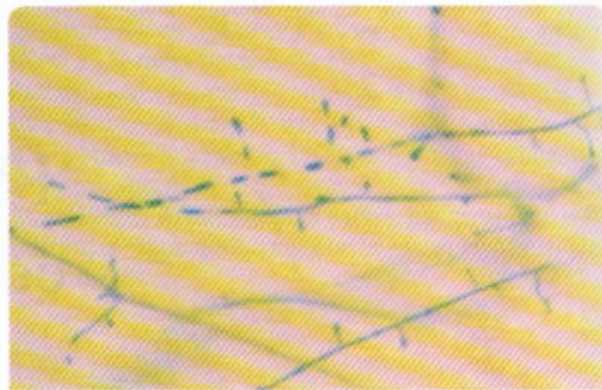


Fig. 8.4. *Chrysosporium*.

Cladosporium. Es un hongo dematiáceo que se cultiva con gran frecuencia a partir del ambiente y detritus vegetales. Su crecimiento es rápido y el cultivo presenta color gris oscuro o verde oscuro.

Microscópicamente se caracteriza por la presencia de cadenas de blastoconidios, cadenas que pueden ser simples o ramificadas. Los conidios miden de 2 a 4 μm de diámetro, son de forma oval, su crecimiento es de tipo acrópeto y entre una y otra parece existir un material hialino en el sitio de unión (fig. 8.5).

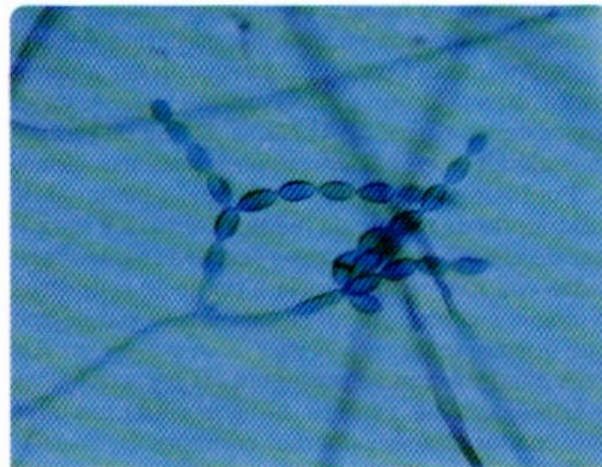


Fig. 8.5. Examen microscópico de *Cladosporium* sp.

Cunninghamella bertholletiae (C. elegans o C. echinulata). Ver descripción en mucormicosis (fig. 8.6) en el capítulo 6.

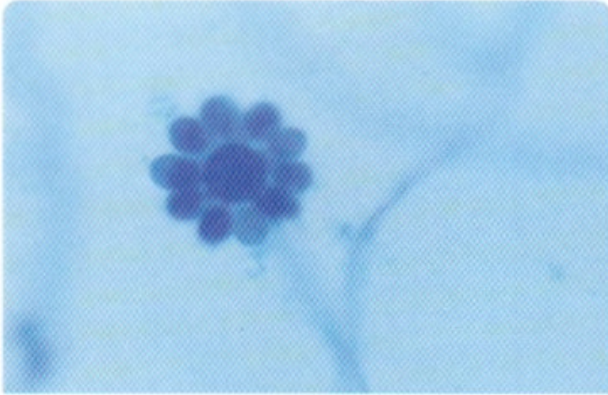


Fig. 8.6. Imagen microscópica de *Cunninghamella* sp.

Curvularia. Es un dematiáceo de micelio septado, con conidióforos en grupos o aislados, que producen poroconidios fragmentados, de forma cilíndrica o ligeramente curvada con septo transversal (fig. 8.7). Se aísla con alguna frecuencia a partir de los cultivos de productos biológicos, es agente etiológico de queratitis micótica y en contadas ocasiones lo es de la feohifomicosis. La fase sexual de este hongo pertenece al género *Cochiliobolus* sp.

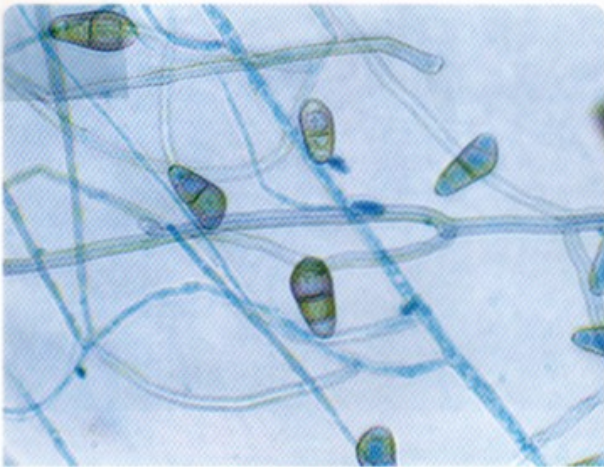


Fig. 8.7. *Curvularia*.

Drechslera. Es un hongo contaminante, cuya reproducción asexual se lleva a cabo por un proceso de tipo simpodial proliferativo. Los conidios pertenecen a los poroconidios, son alargados, ovalados, con una doble pared muy evidente y presentan septos transversales. La célula conidiógena toma un aspecto de zigzag conforme va ori-

ginando los conidios. Este hongo es responsable de algunos casos de queratitis micótica (fig. 8.8). Su forma sexual se ubica en dos géneros, que son *Cochiliobolus* y *Pyrenophora*.



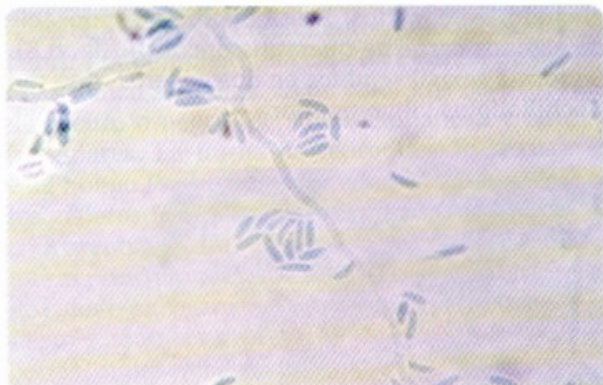
Fig. 8.8. *Drechslera*.

Epicoccum. Las colonias presentan generalmente una coloración amarilla o naranja, aunque algunas producen un pigmento rojo púrpura que difunden al medio y que es más evidente al reverso. A medida que los conidios maduran, la colonia presenta áreas oscuras. Los conidióforos se agrupan en esporodioquios, son cortos, oscuros y dan lugar a conidios oscuros y multiseptados en sentido longitudinal y transversal (fig. 8.9).

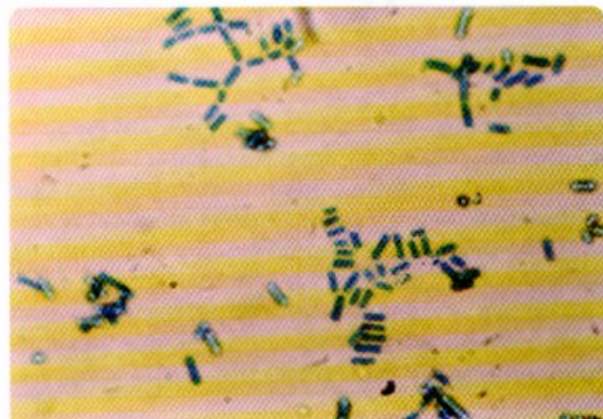


Fig. 8.9. *Epicoccum*.

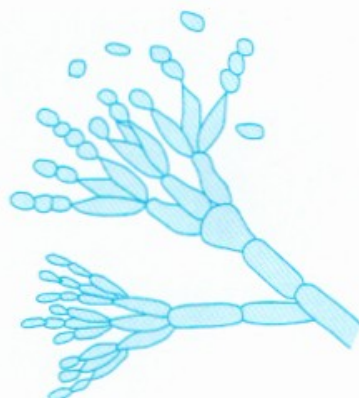
Fusarium. Revisar descripción en hialohifomicosis (fig. 8.10).

Fig. 8.10. *Fusarium*.

Geotrichum. Revisar descripción en hialohifomicosis (fig. 8.11) en el capítulo 6.

Fig. 8.11. Arthroconidios de *Geotrichum* sp.

Gliocladium. Es muy parecido a *Penicillium*, pero con conidios viscosos. Las colonias son de crecimiento rápido, con aspecto de ante y de textura suave, de color blanco o rosado salmón, en un primer momento, llegando a ser de verde pálido a oscuro con la esporulación. El rasgo más característico del género es una hifa erecta con densos conidióforos penicilados, cuyas fiálides producen un material hialino y viscoso que cubre a los conidios, generalmente de color verde. Algunas veces las especies pueden producir conidióforos verticilados y catenulados, lo que puede confundirlo con *Verticillium* o *Trichoderma*. Las especies de *Gliocladium* tienen una distribución amplia en la naturaleza y son comúnmente aisladas de restos de plantas y de suelos (fig. 8.12).

Fig. 8.12. *Gliocladium*.

Helminthosporium. Es un hongo que produce conidióforos marrón oscuro, con poroconidios del mismo color, en ocasiones agrupados en racimos, de doble pared muy evidente. Son de forma alargada con una base un poco más ancha que el extremo distal. Se distingue de *Drechslera* porque la célula conidiógena no es de tipo proliferativo, ni tampoco existe el aspecto de zigzag en la célula conidiógena. El aislamiento en el laboratorio es frecuente (fig. 8.13).

Fig. 8.13. *Helminthosporium*.

Mycocladus (*Absidia*) corymbifera. Ver descripción en mucormicosis (fig. 8.14) en el capítulo 6.

Nigrospora. Es un hongo de crecimiento micelial vellosito, blanco al principio y posteriormente oscuro, con un reverso negro. Microscópicamente presenta conidios holoblásticos negros, de una célula, solitarios, lisos, subglobosos u ovoides,

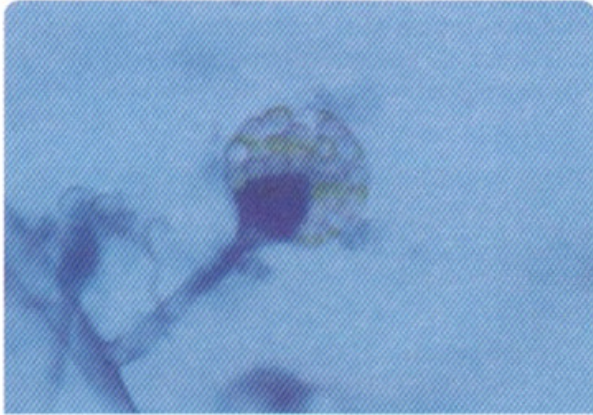


Fig. 8.14. Esporangio de *Mycocladus corymbifera*.

aplanados horizontalmente, que nacen a partir de conidióforos hialinos. Los conidióforos crecen perpendiculares a la hifa (fig. 8.15).

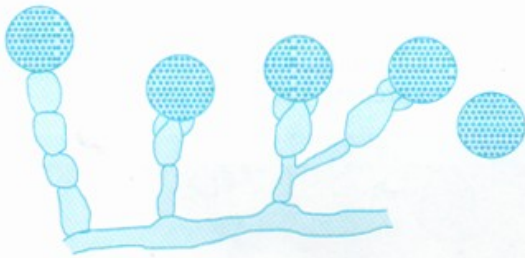


Fig. 8.15. *Nigrospora*.

Paecilomyces. Revisar descripción en hialohifomicosis (fig. 8.16) en el capítulo 6.

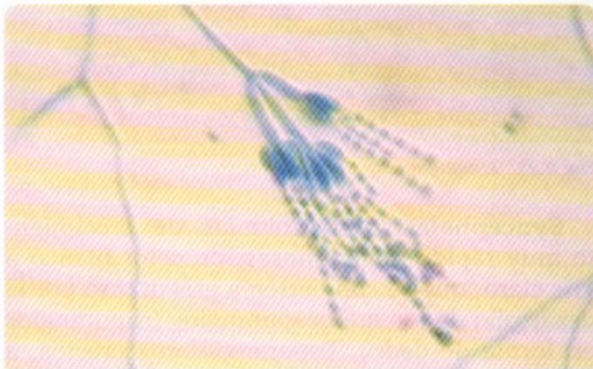


Fig. 8.16. Aspecto microscópico de *Paecilomyces* sp.

Penicillium. Revisar descripción en hialohifomicosis (fig. 8.17) en el capítulo 6.

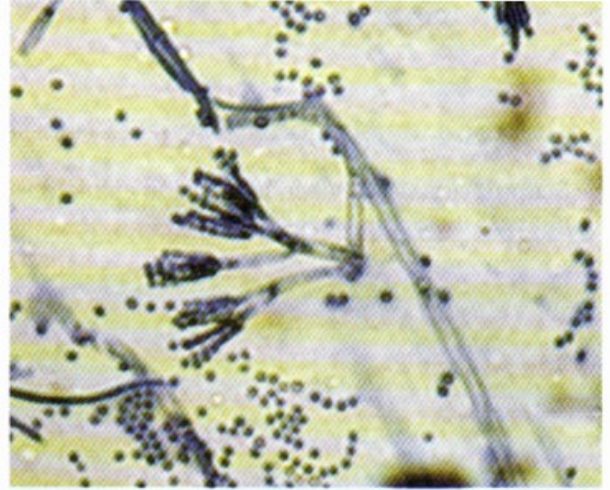


Fig. 8.17. Aspecto microscópico de *Penicillium* sp, que muestra un aparato conidial constituido por conidióforo, métulas, fiálides y fialoconidios en cadena.

Rhizomucor pusillus, Rhizopus oryzae (R. arrhizus). Ver descripción en mucormicosis en el capítulo 6.

Rhodotorula. Revisar descripción y figura en rodotorulosis en el capítulo 6.

Saccharomyces. Revisar descripción en sacaromicosis (fig. 8.18) en el capítulo 6.

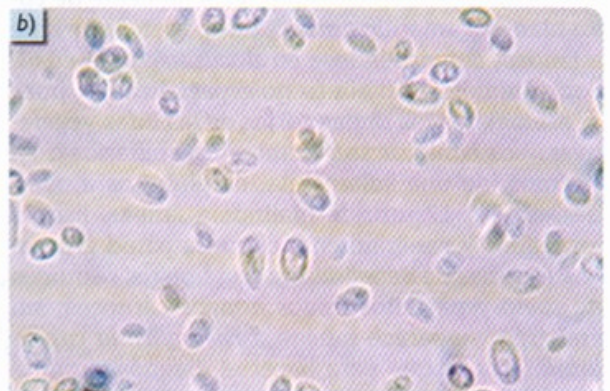
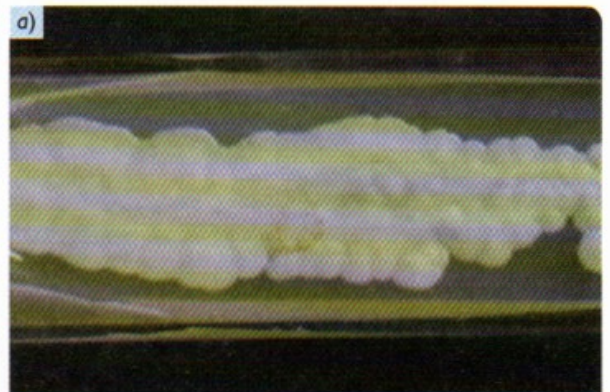


Fig. 8.18. Aspecto macroscópico (a) y microscópico (b), de *Saccharomyces cerevisiae*.

Scopulariopsis. Revisar descripción en hialohifomicosis (fig. 8.19) en el capítulo 6.

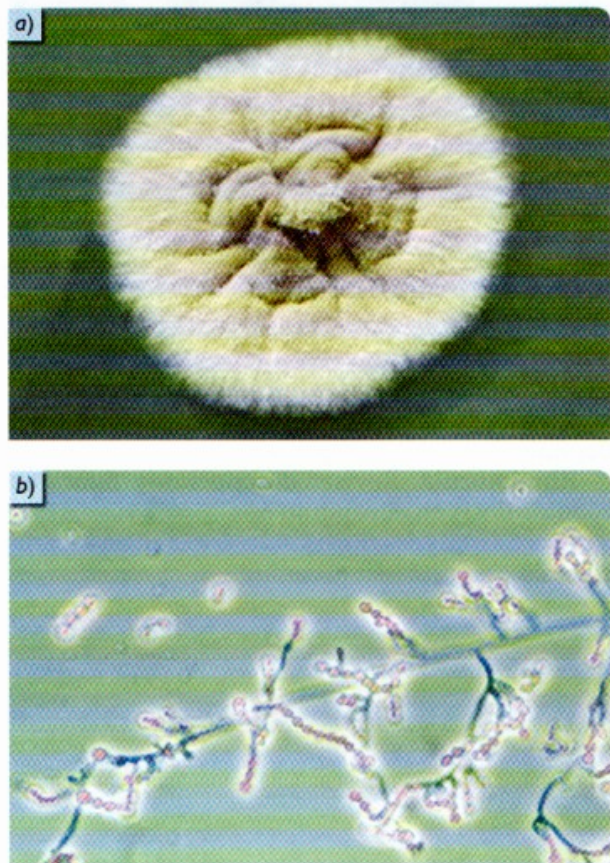


Fig. 8.19. *Scopulariopsis* sp: a) aspecto macroscópico, y b) microscópico.

Sepedonium sp. Las colonias son moderadamente de rápido crecimiento, generalmente de color blanco a amarillo dorado, de apariencia de ante a lanoso, convirtiéndose en floccosas con la edad. Son conidióforos hialinos no especializados, pues se asemejan a las ramas cortas de las hifas vegetativas. Los conidios son terminales, solitarios o en racimos, de una sola célula, de globosos a ovoides, de 7 a 17 μm , de hialinos a ámbar, lisos o arrugados y generalmente con una pared gruesa. Las especies de *Sepedonium* son hongos comunes de suelo y parásitos de los hongos carnosos; sin embargo, se parece mucho a *Histoplasma capsulatum*, por lo que para hacer el diagnóstico diferencial deberá recurrirse a la conversión de la forma parasitaria, crecimiento a 37 °C o prueba de exoantígenos (fig. 8.20).

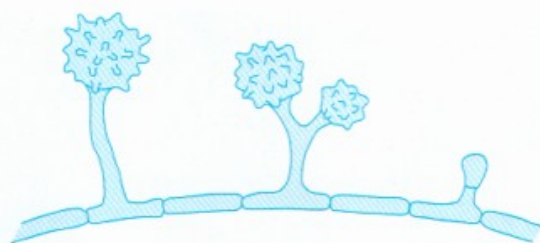


Fig. 8.20. *Sepedonium*.

Stemphylium. Este hongo es macroscópicamente indistinguible de otros dematiáceos. Microscópicamente se caracteriza por presentar conidióforos pigmentados cortos, simples o ramificados, septados, con el extremo distal voluminoso, a partir del cual se forman los conidios por un proceso de proliferación percurrente. Los conidios tienen forma de mora, son solitarios, de colores marrón claros o negros, grandes, de pared rugosa o lisa y generalmente tienen una constricción en la parte central. Debe diferenciarse del género *Ulocladium*, el cual produce poroconidios muriformes, pero por un proceso simpodial (fig. 8.21).



Fig. 8.21. *Stemphylium*.

Syncephalastrum. Colonias de crecimiento muy rápido, algodonosas, de color blanco a gris claro, que se convierten a gris oscuro por el desarrollo de los merosporangios (esporangios en forma de dedo). Esporangióforos erectos, a menudo con rizoides, mostrando ramificación simpodial (ramificación racemosa) con producción de ramas laterales curvas. El tallo principal y las ramas terminan en una vesícula hinchada de globosa a ovoide y que da lugar al merosporo-

rangio, que cuando llegan a la madurez contienen de 10 a 50 esporangiosporas de pared lisa. La temperatura óptima de crecimiento es de 20-40 °C (fig. 8.22).

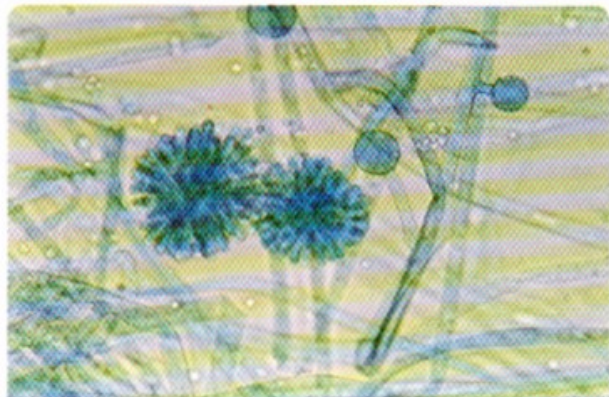


Fig. 8.22. *Syncephalastrum*.

Trichoderma. Revisar descripción en hialohifomicosis (fig. 8.23) en el capítulo 6.

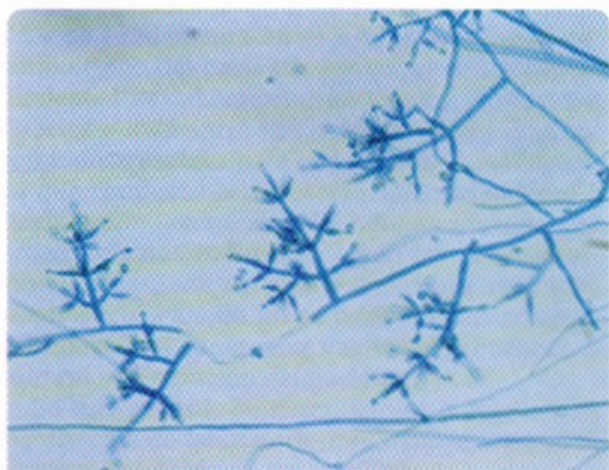


Fig. 8.23. *Trichoderma*.

Ulocladium. Es un hongo dematiáceo que produce conidióforos simples o ramificados. Los conidios se originan de un proceso simpodial y son de forma ovoide y de color marrón o negro. Presentan septos transversales y longitudinales, por lo que pueden confundirse con *Alternaria*, aunque *Ulocladium* no forma cadenas de conidios (fig. 8.24).

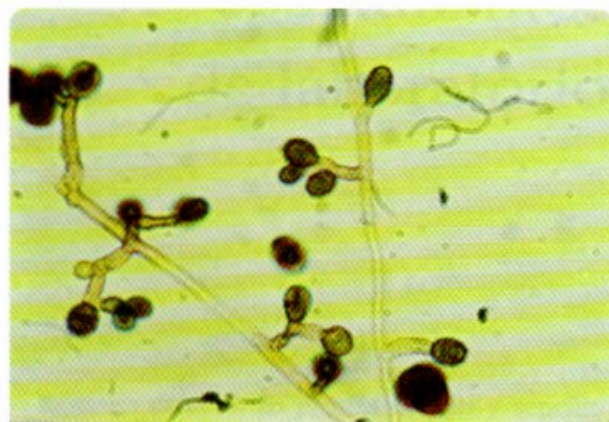


Fig. 8.24. *Ulocladium*.

Verticillium. Revisar descripción en hialohifomicosis (fig. 8.25) en el capítulo 6.



Fig. 8.25. *Verticillium*.

BIBLIOGRAFÍA

- Cabral, J. P., "Can we use indoor fungi as bioindicators of indoor air quality? Historical perspectives and open questions", *Sci. Total Environ.*, **408**:4285, 2010.
- De Hoog, G. S., Guarro, J., Gene, J. y cols., "Atlas of Clinical Fungi" (2a. ed.), ASM Press, 2001, 1160 págs.
- Dugan, F. M., *The Identification of Fungi: An illustrated introduction with keys, glossary, and guide to literature*, Am. Phytopathological Society, 2006, 184 págs.
- Fournel, I., Sautour, M., Lafon, I. y cols., "Airborne *Aspergillus* contamination during hospital construction works: efficacy of protective measures", *Am. J. Infect. Control.*, **38**:189, 2010.
- Gonçalves, F. L., Bauer, H., Cardoso, M. R. y cols., "Indoor and outdoor atmospheric fungal spores in the São Paulo metropolitan area (Brazil): species and numeric concentrations", *Int. J. Biometeorol.*, **54**:347, 2010.

- Hardin, B. D., Kelman, B. J. y Saxon, A., "Adverse human health effects associated with molds in the indoor environment", *J. Occup. Environ. Med.*, **45**:470, 2003.
- Moreno, G. y Arenas, R., "Other fungi causing onychomycosis", *Clin. Dermatol.*, **28**:160, 2010.
- Oliveira, M., Ribeiro, H., Delgado, L. y cols., "Outdoor allergenic fungal spores: comparison between an urban and a rural area in northern Portugal", *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.*, **20**:117, 2010.
- Samson, R. A., Hoekstra, E. S. y Frisvad, J. C., *Introduction to Food And Airborne Fungi* (7a. ed.), ASM Press, 389 págs. 2004.
- Watanabe, T., *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi: Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species* (3a. ed.), CRC Press, 2010, 426 págs.

Procedimientos de laboratorio

INTRODUCCIÓN

El diagnóstico integral de las infecciones micóticas se fundamenta en el estudio clínico y epidemiológico del paciente, así como en los procedimientos de laboratorio, los cuales pueden ser directos o indirectos. Los procedimientos directos son indispensables para el diagnóstico etiológico, ya que conducen a la observación, aislamiento y clasificación taxonómica del hongo causante. Los procedimientos indirectos, como las pruebas inmunológicas, son de gran valor como auxiliares diagnósticos cuando no es posible el aislamiento del hongo, así como para valorar el pronóstico o confirmar la curación del paciente.

En este capítulo se describen los procedimientos directos de laboratorio que, realizados con el conocimiento teórico de la micología y el adiestramiento adecuado, conducen en la mayoría de los casos a un diagnóstico de certeza. Asimismo, se agrega una parte que describe las técnicas de conservación y colección de cultivos de hongos, lo que es indispensable para mantener en el laboratorio de micología cepas de referencia o de interés para su estudio. Se ha incluido una parte relacionada con los procedimientos de extracción de ADN y ARN, que constituye la base de la biología molecular; para mayor información sobre técnicas específicas, el lector debe remitirse a la literatura citada o relacionada.

Examen directo. Es el más común y sencillo de los procedimientos para la observación microscópica de los hongos tanto a partir de productos biológicos como de su desarrollo en medios de cultivo. A través del examen directo se establece el diagnóstico en la mayoría de las micosis. El examen directo se efectúa tanto para observar las estructuras parasitarias del hongo en especímenes patológicos como para observar sus características microscópicas a partir de cultivos desarrollados. La morfología de los hongos, tanto en estado parasitario como en estado de vida libre, en general es muy característica, con la cual se establece su identificación taxonómica. Es importante evitar los errores de interpretación; algunas estructuras fúngicas pueden confundirse con artefactos diversos.

HIDRÓXIDO DE POTASIO (KDH)

Esta solución se puede utilizar en concentraciones desde 10 a 40 %. A menor concentración, el tiempo para visualizar las estructuras parasitarias será mayor; a mayor concentración la visibilidad es más rápida y la formación de cristales es más rápida, lo cual puede obstruir la detección de estructuras fúngicas. La solución es transparente y su función es destruir uniones intercelulares favoreciendo la dispersión de células, lo cual favorece la visualización de estructuras micóticas.

- Hidróxido de potasio, 15 g.
- Agua destilada, 100 ml.

Mezclar bien los ingredientes y utilizar. No requiere tratamiento adicional.

PREPARACIÓN DEL AZUL DE ALGODÓN

Reactivos

- | | |
|----|------------------------|
| a) | Solución de lactofenol |
| | Fenol líquido, 20 ml |
| | Ácido láctico, 20 ml |
| | Glicerol, 40 ml |
| | Agua destilada, 20 ml |
| b) | Azul de anilina, 0.5 g |

Mezclar *a* y *b*, filtrar y conservar en frasco ámbar.

OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE PRODUCTOS PATOLÓGICOS

Cuando éstos son líquidos como la orina, el líquido cefalorraquídeo y los diversos exudados, basta agregar una gota de KOH al 10 a 15 % (potasa) en un portaobjetos y una gota del producto biológico por estudiar; sobre la preparación se coloca un cubreobjetos y se observa directamente con el microscopio, de preferencia con óptica de contraste de fases para diferenciar mejor las estructuras fúngicas de los elementos tisulares.

En ocasiones se puede agregar a la preparación una gota de algún colorante simple, como eritrosina al 1 %, azul de metileno, azul de algodón o lugol bacteriológico, para contrastar y precisar los elementos fúngicos.

Cuando los elementos patológicos son pelos o escamas, se deposita sobre el portaobjetos una gota de KOH o de lactofenol, para aclarar las estructuras tisulares y destacar las células fúngicas. Se deja actuar al aclarante por 5 a 10 minutos y se observa al microscopio. Se puede preparar una solución combinando 80 ml de KOH con 20 ml de glicerina, para evitar la precipitación rápida de la potasa y conservar las preparaciones durante un periodo mayor.

Algunas veces se requiere agregar a la preparación una gota de azul de metileno para teñir los bacilos de *Corynebacterium minutissimum*, en el caso de diagnóstico presuntivo de eritrasma. En

otras se puede agregar al KOH una gota de tinta azul (marca Parker) para observar con mayor claridad las levaduras y filamentos de *Malassezia* sp.

La técnica del examen directo de escamas con cinta adhesiva transparente (diurex) para el diagnóstico de pitiriasis versicolor consiste en aplicar la superficie adhesiva, presionando un poco sobre las lesiones discrómicas; después se adhiere la cinta sobre un portaobjetos y se observa directamente al microscopio. Esta técnica requiere experiencia en el reconocimiento de *Malassezia*, que sin teñirse ni aclararse se oculta entre las anfractuosidades de las escamas y del pegamento. También se puede agregar al portaobjetos, antes de pegar la cinta, una gota de azul policromo para teñir los elementos fúngicos.

El examen directo de líquido cefalorraquídeo para la observación de *Cryptococcus* spp se realiza agregando al producto una gota de tinta china, para destacar en el campo oscuro las cápsulas de estas levaduras.

La técnica del *blanco de calcoflúor* es útil para la observación microscópica directa de estructuras micóticas, sobre todo de filamentos de dermatofitos, *Malassezia* y otras levaduras.

Las escamas por analizar se montan en un portaobjetos y se agrega una gota de KOH, más una gota de la solución blanco de calcoflúor. Los elementos fúngicos se observan contrastados con el material biológico en una fluorescencia verde-amarillo brillante al microscopio de fluorescencia.

MONTAJE Y CONSERVACIÓN DE PREPARACIONES HÚMEDAS

Cuando se desea conservar temporalmente preparaciones de exámenes directos, como dermatofitos en pelos y escamas, granos de micetoma en secreciones, levaduras de *Cryptococcus* spp en LCR, o bien, preparaciones de cultivos contrastados con azul de algodón, se recomienda hacer un doble montaje cubriendo el espécimen por conservar con un cubreobjetos; se sellan perfectamente los cuatro lados del cubreobjetos con barniz de uñas transparente y se deja secar. Estas preparaciones deben almacenarse en posición horizontal para que no se decanten los elementos fúngicos y vigilarse periódicamente para evitar su desecación.

Observación microscópica de cultivos. Si se trata de cultivos levaduriformes, basta con tomar

una pequeña cantidad de la colonia con el asa bacteriológica y homogeneizarla en una o dos gotas de agua, solución salina o algún colorante como eritrosina o azul de algodón, para después observar la preparación en el microscopio, de preferencia por contraste de fases. Si se trata de colonias filamentosas, con el asa micológica tomar un fragmento del centro de la colonia y disgregarlo con la ayuda de una aguja de disección; agregar una o dos gotas de azul de algodón, colocar un cubreobjetos y observar al microscopio. Otro método consiste en tomar una "impronta" de la colonia con cinta adhesiva transparente, colocarla en un portaobjetos en el que previamente se ha colocado una gota de eritrosina o azul de lactofenol, colocar un cubreobjetos y observar al microscopio.

Frotis e impronta. Estos procedimientos se realizan con las mismas técnicas descritas en bacteriología, cuidando que los portaobjetos estén limpios y desengrasados y que la película del frotis sea delgada para no obstaculizar la observación.

Los frotis se preparan a partir de los productos biológicos en fase líquida, como orina, sangre, secreción vaginal, bucal y nasal, líquido pleural, LCR, etc. Es recomendable centrifugar los líquidos y utilizar el sedimento. Ambos procedimientos son útiles cuando la observación de los elementos fúngicos no es clara; por tanto, es necesario teñir los hongos para facilitar su observación, particularmente si se trata de levaduras de *Candida* o de *H. capsulatum*.

Las improntas se preparan aplicando la superficie del portaobjetos sobre las lesiones por estudiar, ejerciendo una presión moderada. Cuando se trata de biopsias, el tejido se aplica sobre varios puntos del portaobjetos, de tal manera que quede el tejido adherido a la superficie. Una vez que los frotis y las improntas se han secado al aire, se fijan con calor o con alcohol metílico y se tiñen con las técnicas indicadas en cada caso.

TÉCNICAS DE MONTAJE

Tinción de pelos y escamas. Generalmente, estos especímenes se procesan a través de un examen directo y las estructuras micóticas son fácilmente observables. Sin embargo, cuando se desea colorearlos y conservarlos con fines de enseñanza o de ilustración, se requiere una técnica de montaje y es necesario adherirlos al portaobjetos antes

de la tinción, para realizar con facilidad el procedimiento tintoreo elegido.

Albúmina de Meyer. Esta preparación es útil cuando se requiere hacer una tinción de especímenes como escamas o pelo y es necesario adherirlos al portaobjetos. La preparación es la siguiente:

- Batir una clara de huevo a punto de turrón.
- Agregar un volumen de glicerina igual a la clara prebatida.
- Mezclar lentamente hasta homogeneizar.
- Agregar un cristal de timol como conservador y filtrar.
- Mantener en reposo a 4 °C durante 24 horas.

PROCEDIMIENTO

Colocar una pequeña gota de albúmina de Meyer sobre el centro del portaobjetos limpio y desengrasado. Extender la gota hasta hacer una fina película. Colocar los pelos o las escamas parasitadas y presionar ligeramente con una superficie roma (como el mango del asa micológica). Se seca lentamente a la flama del mechero y se deja la preparación toda la noche a una temperatura de 30 a 35 °C. Una vez que están bien adheridos los productos, se fijan con alcohol metílico, cubriendo la totalidad del portaobjetos y dejando que se evapore totalmente. Se debe realizar la técnica de coloración deseada y montar con resina sintética.

TÉCNICAS DE TINCIÓN

En micología, las técnicas de tinción empleadas pueden ser simples, compuestas o especiales para el estudio histopatológico. La elección de la técnica depende del producto que se va a procesar y de la finalidad que se persiga al realizar el procedimiento. Las técnicas de tinción más útiles en micología son descritas a continuación.

EXAMEN DIRECTO CON AZUL DE ALGODÓN (AZUL DE LACTOFENOL)

Es útil para realizar el examen directo de cultivos, ya que es una técnica rápida que tiñe la pared, lo que permite visualizar perfectamente las estructuras fúngicas.

La técnica consiste en depositar una gota de colorante sobre un portaobjetos y sobre ella colocar un fragmento pequeño del cultivo por estudiar, disgregándolo perfectamente para poder hacer una buena observación; se coloca un cubreobjetos sobre la preparación y se procede a la observación de ésta.

También es útil para observar estructuras fúngicas filamentosas tomadas de una colonia con cinta adhesiva transparente.

La técnica también puede ser aplicada a los microcultivos; sólo se aplica una gota del colorante entre el portaobjetos o el cubreobjetos que contiene el hongo crecido.

Con esta técnica también se pueden teñir preparaciones para conservación a largo plazo; para esto es necesario sellar los bordes de la preparación con barniz transparente para uñas.

Azul de metileno

Azul de metileno	1 g
Alcohol	60 ml
Agua destilada	250 ml

Mezclar los tres componentes y utilizarla directamente. Los hongos adquieren un color azul semejante al azul de algodón, aunque el hongo se observa más intenso que el fondo del campo. Es muy útil también para la observación de *C. minutissimum* (agente causal del eritrasma).

Safranina acuosa

Safranina	0.5 g
Agua destilada	100 ml

Mezclar el colorante con el agua destilada y utilizar la solución. Los elementos fúngicos se tiñen de color rojo intenso y el resto del campo toma un tono incoloro o rosa pálido. Esta técnica de tinción es útil para el estudio de cultivos y productos biológicos líquidos.

TINCIÓN NEGATIVA CON TINTA CHINA

Es un procedimiento de contraste especial para visualizar la cápsula de *Cryptococcus* spp en LCR, improntas o exámenes directos de cultivos.

En México se utiliza tinta china marca *Pelikan* en una dilución de 1:2 con agua destilada. La técnica consiste en colocar una gota del producto biológico por examinar y una gota de tinta china,

ambas gotas separadas por unos 3 mm, sobre ellas se coloca un cubreobjetos y se procede a la observación. *Cryptococcus* se observa sin teñir con la cápsula refringente y una pequeña levadura en su interior, en tanto que el resto del campo de observación tiene un fondo negro.

HIDRÓXIDO DE POTASIO-TINTA AZUL (PARKER)

Es útil principalmente para teñir filamentos y levaduras en escamas de pacientes con pitiriasis versicolor. Las escamas pueden obtenerse por raspado de la lesión, o bien, por medio de la cinta adhesiva transparente.

La técnica es simple y consiste en aplicar sobre las escamas por estudiar una gota de una mezcla de KOH-tinta *Parker*; después se aplica un cubreobjetos y se procede a observar.

Reactivos

KOH 10 %	94 ml
Tinta azul marca <i>Parker</i>	6 ml

GRAM

Se emplea para teñir productos biológicos líquidos, exudados de lesiones, improntas y macerados de biopsia. Todos los hongos son positivos a la coloración de Gram, excepto *Cryptococcus*, que por la presencia de la cápsula no capta adecuadamente los colorantes. Esta tinción también es útil para teñir algunos Actinomicetales causantes de seudomicosis.

Procedimiento

- Hacer un frotis y fijarlo con calor.
- Cubrir con cristal violeta durante un minuto y después lavar ligeramente con agua corriente.
- Cubrir con lugol durante un minuto y lavar con agua corriente.
- Decolorar con una cantidad de 10 a 20 gotas de una solución de alcohol-acetona al 50 % y lavar ligeramente con agua corriente.
- Cubrir con safranina durante 30 segundos y lavar ligeramente con agua corriente, dejar secar y observar.
- Las estructuras fúngicas se observan de color azul violeta.

GIEMSA

Es útil para detectar *H. capsulatum*, *P. marneffe* y *Pneumocystis* spp, hongos que con otras técnicas en ocasiones son difíciles de observar. La técnica consta de los pasos siguientes:

- Hacer un frotis y cubrir con metanol al 100 %.
- Dejar secar al aire.
- Cubrir con el colorante de Giemsa durante 1 minuto.
- Cubrir con el buffer de Giemsa durante 5 minutos.
- Lavar con agua corriente y dejar secar.

Las levaduras de los tres organismos mencionados se observan de color rojo violeta, rodeadas de una zona sin teñir en el interior de los macrófagos o fuera; se observa un fondo azul.

FITE

Esta tinción es aplicada tanto a frotis como a tejidos obtenidos por biopsia para detectar microorganismos pertenecientes al orden Actinomicetales. El procedimiento es el siguiente:

- Pasar el frotis por dos baños de 5 minutos cada uno en una mezcla de tolueno (dos volúmenes) y aceite mineral o vegetal (un volumen).
- Secar con papel filtro.
- Aplicar fucsina en frío durante 20 minutos.
- Lavar con agua corriente.
- Decolorar con alcohol ácido (5 % de ácido láctico).
- Lavar con agua corriente.
- Teñir con azul de metileno como contraste durante 3 minutos.
- Lavar con agua corriente.
- Secar al aire y observar.

Las bacterias del género *Nocardia* toman un color rojo y cualquier otro género toma un color azul igual a la coloración del fondo.

TINCIÓN DE ASCAS Y ASCOSPORAS DE LEVADURAS

Esta técnica permite visualizar las ascas y ascosporas de todos los hongos y es especialmente útil

cuando se trata de visualizar levaduras en los Hemiascomycetes, ya que con las tinciones habituales es muy difícil distinguir sus formas sexuales.

Reactivos

Verde de malaquita	7.60 g
Agua destilada	100 ml
Safranina acuosa	0.25 g
Agua destilada	100 ml

Procedimiento

- Preparar un frotis y fijar con calor o metanol.
- Cubrir con verde de malaquita y calentar durante 5 minutos.
- Lavar con agua corriente.
- Cubrir con safranina durante 30 segundos.
- Lavar con agua corriente y dejar secar.

Las ascas y ascosporas se tiñen de color verde, en tanto que las levaduras toman una coloración roja.

TINCIÓN DE KINYOUN

Es útil para teñir bacilos parcialmente resistentes al alcohol ácido. Es principalmente valioso en el caso de los Actinomicetales del género *Nocardia* que se decoloran en exceso con la técnica de Ziehl-Neelsen habitual.

Soluciones

Fucsina de Kinyoun	
Fucsina básica	4 g
Etanol al 95 %	20 ml
Fenol en cristales	8 g
Agua destilada	100 ml

Disolver la fucsina en el etanol, agregar el fenol previamente fundido, el alcohol ácido y el agua. Mezclar.

Alcohol ácido	
HCl concentrado	3 ml
Alcohol al 95 %	97 ml
Etanol al 95 %	
Etanol absoluto	5 ml
Agua destilada	95 ml
Ácido sulfúrico al 1 %	
Ácido sulfúrico concentrado	1 ml
Agua destilada	99 ml
Azul de metileno	
Azul de metileno	0.3 g
Agua destilada	100 ml

Procedimiento

- Preparar un frotis y fijar con calor o metanol.
- Cubrir durante cinco minutos con fucsina de Kinyoun.
- Lavar con agua corriente.
- Cubrir con alcohol ácido y decantar.
- Lavar con agua corriente.
- Decolorar con ácido sulfúrico al 1 % durante 2 a 3 minutos.
- Lavar con agua corriente.
- Cubrir con azul de metileno durante 1 minuto.
- Lavar con agua corriente, dejar secar y observar.

Los actinomicetos se tiñen de rojo y se observan en un fondo azul.

ÁCIDO PERYÓDICO DE SCHIFF

Este procedimiento de tinción es útil para hacer el estudio de especímenes, sobre todo en aquellos casos en los que el examen con KOH ha resultado negativo.

*Composición***Solución de hidrosulfito de sodio**

Ácido tartárico o HCl	0.5 g
Hidrosulfito de sodio	1 g
Agua destilada	100 ml

Mezclar y almacenar a temperatura ambiente en un recipiente perfectamente cerrado.

Ácido peryódico

Solución al 5 % en agua destilada

Reactivo de Schiff

Fucsina básica	0.1 g
Etanol al 95 %	5 ml
Agua destilada	95 ml

Mezclar y almacenar a temperatura ambiente en un recipiente perfectamente cerrado.

Verde brillante

Verde brillante	1 g
Ácido acético glacial	0.25 ml
Agua destilada	100 ml

Mezclar y almacenar a temperatura ambiente.

Procedimiento

- Preparar un frotis y fijarlo con calor.
- Sumergir la preparación en etanol al 95 % por 1 minuto.
- Sumergir la preparación en ácido peryódico y retirarla rápidamente.
- Sumergir la preparación en fucsina básica por 2 minutos y enjuagar suavemente.
- Contrateñir con verde brillante por 5 segundos.
- Cubrir la preparación con etanol al 95 % por 10 segundos y después con etanol absoluto por 1 minuto.
- Aclarar con dos pasos rápidos por xileno.
- Montar en resina sintética.

Los filamentos fúngicos, conidios y esporas aparecen de color rojo o rosa intenso. El cemento de algunos granos en los micetomas (*Madurella mycetomatis*) adquieren un color amarillo o naranja. Los núcleos celulares y la colágena se observan de color verde claro; el glucógeno y la mucina, rojos. El citoplasma, que es verde en general, adquiere un tinte rosa (granuloso en ciertas células gigantes).

AZUL DE ALCIAN PARA CRYPTOCOCCUS

En esta técnica las levaduras de *Cryptococcus* se observan de color azul claro, los núcleos en color rojo y los mucopolisacáridos de azul turquesa.

Procedimiento

- Teñir los cortes con azul de Alcian durante 5 minutos.
- Lavar con agua corriente.
- Teñir con safranina durante 5 minutos.
- Deshidratar por medio de pases sucesivos en alcoholes al 50, 70 y 95 %, y alcohol absoluto.
- Montar en resina sintética.

Para preparar el azul de Alcian se necesita:

- Azul de Alcian 1 g.
- Solución de ácido acético 3 % 100 ml.

TINCIÓN DE GROCOTT (METENAMINA DE PLATA)

Composición

Ácido crómico, 10 %	
Ácido crómico	10 g
Agua destilada	100 ml
Metenamina, 3 %	
Hexametilanetetramina	3 g
Agua destilada	100 ml
Nitrato de plata, 5 %	
Nitrato de plata	5 g
Agua destilada	100 ml
Borato de sodio, 5 %	
Borato	5 g
Agua destilada	100 ml
Solución de metenamina de plata	
Metenamina de plata al 3 %	20 ml
Nitrato de plata al 5 %	1 ml
Borato de sodio al 5 %	1.5 ml
Agua destilada	17 ml

Guardar en el refrigerador de 3 a 4 días.

Bisulfito de Na, 1 %	
Bisulfito o metabisulfito de Na	1 g
Agua destilada	100 ml
Cloruro de oro al 0.2 %	
Cloruro de oro	1 g
Agua destilada	500 ml
Tiosulfito de Na, 2 %	
Tiosulfito de Na	2 g
Agua destilada	100 ml
Verde brillante, 2 %	
Verde rápido	2 g
Ácido acético glacial	0.2 ml
Agua destilada	100 ml

Procedimiento

- Hacer un frotis y fijarlo con metanol.
- Secar al aire.
- Cubrir con el ácido crómico al 10 % por 10 minutos.
- Lavar con agua destilada.
- Cubrir con el metabisulfito de Na al 1 % por 1 minuto.
- Lavar con agua destilada.
- Colocar los frotis en una caja de Coplin con la solución de metenamina de plata y calentar con el microondas por 45 s.
- Lavar con agua destilada.
- Cubrir con cloruro de oro por 10 s.

- Lavar con agua destilada.
- Cubrir con tiosulfito de Na por 1 minuto.
- Lavar con agua destilada.
- Cubrir con verde rápido por 3 minutos.
- Dejar secar y observar. Las preparaciones pueden ser conservadas en resina sintética.

Con esta técnica los hongos se tiñen de color negro al igual que algunas bacterias (*Nocardia* y *Actinomyces*). *Nocardia* puede requerir mayor tiempo de incubación en la solución de plata metenamina. La mucina adquiere un color gris oscuro; las partes internas del micelio, rosa oro; el fondo aparece de color verde claro. Debe tenerse cuidado al observar los cortes teñidos con esta técnica, ya que algunas fibras como las reticulares o las de elastina también se tiñen de color negro.

TÉCNICAS DE MICROCULTIVO

CULTIVO EN PORTAOBJETOS

Es una técnica de gran utilidad para el estudio de los hongos filamentosos mitospóricos, con aplicaciones diversas, por ejemplo:

- Identificación taxonómica.
- Estudios de ontogenia de los conidios.
- Obtención de material para microscopía de luz y electrónica.
- Elaboración de preparaciones permanentes útiles en la enseñanza.
- Como apoyo para identificaciones diferenciales.
- Como control para las cepas de colecciones de hongos.

Los medios de cultivo y tiempos de incubación son variables, dependiendo del hongo por procesar y de los fines que se persiguen al realizar la técnica. En general puede decirse que los medios de cultivo más empleados son: agar dextrosa Sabouraud con y sin antibióticos, agar papa dextrosa, agar extracto de malta, agar Borelli y agar Czapek.

El tiempo de incubación normalmente es de 2 a 15 días y la temperatura habitual es de 25 a 28 °C.

TÉCNICA TRADICIONAL

1. En la base de una caja de Petri de 10 cm de diámetro se coloca una varilla de vidrio doblada en forma de "V" (caballete).
2. Sobre la varilla se fija un portaobjetos, con ayuda de cinta adhesiva. Se deposita en la misma caja un cubreobjetos.
3. Se esteriliza el material durante 15 minutos a 15 libras de presión.
4. Se prepara una caja de Petri con el medio seleccionado de aproximadamente 5 mm de espesor.
5. Se corta el medio en cuadros de 10 mm por lado, con ayuda de un bisturí estéril.
6. Se coloca un cuadro del medio de cultivo en el centro del portaobjetos de la caja de Petri.
7. Se inocula en cada uno de los lados del fragmento del medio una pequeña porción del hongo por estudiar.
8. Se coloca el cubreobjetos sobre el medio inoculado.
9. Se adicionan a la caja 10 ml de agua glicerina al 10 %, teniendo cuidado de no mojar el cultivo.
10. Se incuba en la oscuridad durante 2 a 15 días a 25 o 28 °C (estas condiciones son variables dependiendo del género y especie de hongo de interés).
11. Se retira el cubreobjetos y se coloca sobre un portaobjetos limpio en el que previamente se ha depositado una gota de azul de algodón, que quedará en contacto con la superficie sobre la que se ha desarrollado el hongo de interés.
12. Se retira y desecha el fragmento del medio de cultivo del portaobjetos; se deposita una gota de azul de algodón en el centro del portaobjetos y se coloca un cubreobjetos nuevo.
13. En caso de querer conservar la preparación durante largo tiempo, se sellan los bordes de los cubreobjetos con barniz de uñas transparente o con resina.

TÉCNICA DEL EMPAREDADO

1. Sobre una placa de agar se depositan de cinco a ocho fragmentos del hongo por estudiar. También como inóculo se puede depositar una suspensión de conidios o fragmentos micelia-

les y distribuir de forma homogénea sobre la superficie del agar.

2. Se introducen en el agar de cuatro a seis cubreobjetos estériles en un ángulo aproximado de 5 °C.
3. Se cierra la caja y se incuba durante 2 a 15 días a temperatura ambiente o a otra temperatura deseada.
4. Cuando el cultivo ha alcanzado su madurez se retira un cubreobjetos de la caja y se coloca sobre un portaobjetos, sobre el cual previamente se ha depositado una gota de azul de algodón.
5. Se deposita una gota de azul de algodón sobre el cubreobjetos y se cubre con otro cubreobjetos.
6. Se repite el procedimiento con los demás cubreobjetos contenidos en la caja de cultivo.

Con esta técnica se tienen dos planos de enfoque.

MÉTODO DE RIVALIER Y SEYDEL

Es una técnica de microcultivo que permite evidenciar de forma clara las estructuras morfológicas fúngicas en su arreglo y disposición natural; se realiza para la identificación de cultivos, o bien, para preparar material de enseñanza.

- Sumergir un portaobjetos estéril en medio de cultivo a 56 °C.
- Colocar el portaobjetos sobre un caballete en una caja de Petri.
- Inocular el centro del portaobjetos con el hongo que se va a estudiar.
- Depositar en la caja de Petri 10 ml de agua destilada estéril, sin mojar el portaobjetos.
- Incubar a 25 °C en la oscuridad.
- Cuando el cultivo alcance su madurez, desprender el exceso de agar y secar en la estufa a 37 °C durante 24 horas.
- Sumergir la preparación en colodión ligero.
- Escurrir el exceso de colodión y dejar secar durante 24 horas en posición horizontal.

Preparación del colodión

Colodión oficial (sin aceite de ricino)	1 ml
Alcohol absoluto	2 ml
Éter sulfúrico	2 ml

TINCIÓN PARA MICROCULTIVOS

Se utiliza para realzar las estructuras morfológicas, sobre todo en hongos hialinos. El procedimiento es el siguiente:

- Teñir durante 10 minutos con azul de algodón.
- Retirar el exceso de colorante con alcohol al 70 %.
- Deshidratar con alcohol al 95 % y después con alcohol absoluto.
- Montar en alcohol polivinílico.

MEDIOS DE CULTIVO

Después de un examen en fresco, el espécimen patológico deberá ser cultivado. En algunas ocasiones el cultivo es difícil (histoplasmosis) o imposible (rinospordiosis). Como ya se ha explicado, la identificación primaria de los hongos depende del criterio morfológico; por tanto, la morfología, color o producción de conidios de la colonia fúngica sólo podrá ser demostrado a través del crecimiento en el cultivo.

El medio de cultivo estándar utilizado universalmente en micología médica es el agar dextrosa Sabouraud. Durante muchos años fue el medio ideal para el primoaislamiento y la conservación de aislados fúngicos. También ha sido el medio de referencia en el cual se ha basado la descripción morfológica de los hongos patógenos. Este medio ha sido mejorado gracias a la adición de antibacterianos como la penicilina, la estreptomycin, el cloranfenicol, o bien, antifúngicos como difenil, actidiona o amonio, o incluso un pH modificado con el objetivo de inhibir el crecimiento de bacterias u hongos contaminantes.

La temperatura de incubación de un primoaislamiento es variable, desde la temperatura ambiente, que es de alrededor de 25 hasta 35 °C, dependiendo del género. La incubación a 37 °C se recomienda en posteriores cultivos y de preferencia en cultivos puros. Esta temperatura es usada para la obtención de las formas parasitarias.

El tiempo de crecimiento también es variable de acuerdo con el género y especie de hongo. Las levaduras se desarrollan en un periodo de 24 a 48 horas después de la siembra, los hongos filamentosos (*Aspergillus* spp, *Penicillium* spp, Mucorales, etc.) crecen en dos a cuatro días y, finalmente,

la mayor parte de los hongos patógenos crecen después de seis días y hasta dos a tres semanas después de la siembra.

Frecuentemente la sola descripción de la morfología no es suficiente para efectuar la determinación de la especie, por lo que es necesario conocer características bioquímicas y fisiológicas del organismo. Para esto se han desarrollado medios de cultivo especiales para la determinación de género y especie del hongo. La determinación se logra a través de los cambios que se producen en el cultivo, según el tipo de desarrollo que tenga el microorganismo en ese medio.

Existen medios de cultivo que pueden cumplir con dos o más funciones, por ejemplo, medios de cultivo primarios que al mismo tiempo dan la determinación específica del hongo (como el medio de Staib para *Cryptococcus* spp) o ayudan a obtener la fase parasitaria de un hongo dimórfico (como el medio de infusión cerebro-corazón para *Sporothrix* spp y para *H. capsulatum*). Es necesario hacer notar que la mayoría de los medios de cultivo están disponibles en el mercado.

Todos los medios de cultivo, con excepción del medio de tioglicolato, deben mantenerse en refrigeración, previa prueba de esterilidad, que consiste en dejar las placas o tubos ya preparados a temperatura ambiente para detectar cualquier crecimiento en un lapso de 24 a 48 horas.

AGAR DEXTROSA SABOURAUD

Es un medio utilizado universalmente para el aislamiento, identificación y mantenimiento de la gran mayoría de los hongos saprobios y patógenos.

Composición

Peptona especial	10 g
Glucosa	20 g
Agar-agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación

- Disolver los ingredientes en el agua.
- Dejar reposar durante 10 minutos.
- Ajustar el pH a 5.6.
- Esterilizar durante 15 minutos a 121 °C.

Para preparar el medio líquido, debe prescindirse del agar.

AGAR DEXTROSA SABOURAUD CON ANTIBIÓTICOS

Es un medio que se emplea para el aislamiento de la mayoría de los hongos patógenos. La cicloheximida inhibe el desarrollo de los hongos contaminantes y el cloranfenicol inhibe el crecimiento de las bacterias.

Composición

Peptona de soya	10 g
Glucosa	10 g
Agar-agar	15 g
Cloranfenicol	50 mg
Actidiona (cicloheximida)	400 mg
Agua destilada	1000 ml

Preparación

- Disolver en el agua la peptona, la glucosa y el agar.
- Ajustar el pH a 6.9.
- Dejar reposar 10 minutos.
- Esterilizar 15 minutos a 121 °C.
- Dejar enfriar a 50 °C aproximadamente.
- En ambiente estéril, agregar los antibióticos.

El medio líquido se prepara de la misma forma, pero sin agar.

AGAR DIXON MODIFICADO

Es un medio recomendado para el aislamiento y la conservación de especies de *Malassezia*.

Composición

Extracto de malta	36 g
Peptona	6 g
Bilis deshidratada de buey	20 g
Tween 40	10 ml
Glicerol	2 ml
Ácido oleico	2 ml
Agar	12 g
Agua desionizada	1000 ml

Preparación

- Mezclar todos los componentes.
- Ajustar el pH a 6.0.
- Calentar hasta obtener un homogenado.
- Esterilizar a 121 °C por 15 min.
- Distribuir en cajas de Petri.

AGAR ACEITE DE OLIVA

Es un medio que se utiliza para el aislamiento de las levaduras lipofílicas del género *Malassezia* spp.

Composición

Agar Dextrosa Sabouraud	65 g
Tween 80	2 ml
Aceite de oliva	2 ml
Vitamina A	10 gotas
Cloranfenicol	0.05 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación

- Disolver el ADS en el agua y ponerlo en ebullición 5 minutos.
- Agregar el resto de ingredientes.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

AGAR EXTRACTO DE LEVADURA-FOSFATO CON AMONIACO

Es un medio que se utiliza para el aislamiento de *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides* spp y *Blastomyces dermatitidis* a partir de productos biológicos.

Composición

Extracto de levadura	1 g
Amortiguador de fosfatos	2 ml
Agar	20 g
Cloranfenicol	0.5 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación

- Mezclar los ingredientes con el agua destilada y agitar.
- Poner en ebullición, agitando con frecuencia.
- Depositar 18 ml en tubos con tapón de rosca.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.
- Ajustar el pH de 6.0 a temperatura ambiente.

Amortiguador de fosfatos

Composición

Na ₂ HPO ₄	40 g
KH ₂ PO ₄	60 g
Agua destilada	400 ml

Procedimiento

- Disolver el fosfato de sodio en 300 ml de agua.
- Agregar el fosfato de potasio.
- Ajustar el pH a 6.0.
- Aforar a 400 ml.

Empleo con amoníaco

- Vaciar el medio contenido en 2 tubos en una caja de Petri en el momento de usarlo.
- Inocular 0.5 a 1.0 ml del espécimen en la superficie del medio.
- Inmediatamente después de la inoculación, agregar una gota de NH_4OH (amoníaco) concentrado en la superficie del agar, permitiendo su difusión.

El amoníaco a altas concentraciones inhibe el crecimiento de hongos no patógenos.

AGAR TIIOGLICOLATO

Es un medio que se usa para el aislamiento de *Actinomycetes* anaerobios.

Composición

Peptona	20 g
L-cistina	0.25 g
Glucosa	6 g
Cloruro de sodio	2.5 g
Tioglicolato de sodio	0.5 g
Sulfito de sodio	0.1 g
Agar	0.7 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación

- Disolver los ingredientes.
- Ajustar el pH a 7.2.
- Esterilizar a 121 °C por 15 minutos.
- Almacenar a temperatura ambiente.

AGAR PAPA DEXTROSA

Composición

Infusión de papa	200 ml
Glucosa	10 g
Agar	15 g
Agua destilada, aforar a	1000 ml

Preparación

- Pelar la papa y cortarla en pedazos finos.
- Poner en ebullición durante 30 minutos.
- Filtrar a través de una gasa y medir 200 ml.
- Añadir el agar y la glucosa.
- Disolver por calentamiento y aforar con el agua a 1000 ml.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.
- Envasar.

AGAR EXTRACTO DE SUELO (AGAR TIERRA)

Es un medio que se recomienda para el mantenimiento de la forma micelial de *B. dermatitidis* y *H. capsulatum*; además, favorece la formación de cleistotecios de *Ajellomyces dermatitidis*. Es muy útil para el crecimiento de *Chyso sporium* y para estimular la conidiación de otros hongos como los dermatofitos.

Composición

Tierra de jardín	20 g
Glucosa	5 g
Extracto de levadura	1 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml
Estreptomina	30 mg
Ciprofloxacina	50 mg

Preparación

- Mezclar la tierra con el agua.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 min.
- Filtrar a través de papel filtro mientras esté caliente.
- Reponer el volumen hasta 1000 ml.
- Añadir los demás ingredientes, excepto los antibióticos.
- Ajustar el pH a 7.0.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.
- Dejar enfriar a 50 °C y agregar los antibióticos en ambiente estéril.
- Envasar.

AGAR CZAPEK-DOX

Es un medio que se usa para el aislamiento y conservación de algunos actinomicetos y se utiliza

también para la identificación de *Aspergillus* spp y *Penicillium* spp.

Composición	
Sacarosa	30 g
Nitrato de sodio	2 g
Fosfato dipotásico	1 g
Sulfato de magnesio	0.5 g
Cloruro potásico	0.5 g
Sulfato ferroso	10 mg
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación

- Disolver con calor todos los ingredientes.
- Ponerlos en ebullición durante 10 minutos.
- Esterilizar a 121 °C durante 20 minutos.
- Envasar.

AGAR DE GARROD

Se utiliza para aislar y conservar los actinomicetos.

Composición	
Extracto de carne	3 g
Cloruro de sodio	5 g
Peptona	10 g
Almidón soluble	1 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación

- Disolver todos los ingredientes en el agua.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.
- Envasar.

AGAR HARINA DE AMARANTO (*AMARANTHUS* SP)

Es un medio útil para favorecer la conidiación de diversos hongos mitospóricos y también en dermatofitos.

Composición	
Harina de amaranto	25 g
Dextrosa	10 g
Agar	16 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación

- Disolver la harina y la dextrosa en 800 ml de agua.
- Calentar a ebullición durante 30 minutos.
- Dejar sedimentar durante 3 horas.
- Recuperar el sobrenadante por decantación y ajustar el pH a 6.7.
- Agregar el agar y homogeneizar.
- Aforar a 1000 ml.
- Distribuir en tubo (antes de esterilizar a 121 °C por 15 minutos) o en caja (después de esterilizar).

AGAR-NÍGER (STAIB-SEELIGER)

Se utiliza para la identificación de *Cryptococcus* spp y su aislamiento a partir de sustratos muy contaminados. Las levaduras de *Cryptococcus*, particularmente *neoformans*, adquieren un color marrón oscuro al desarrollarse en este medio de cultivo.

Composición

Semilla de níger (<i>Guizotia abyssinica</i>)	50 g
Glucosa	1 g
Fosfato de potasio dihidrogenado	1 g
Creatinina	1 g
Penicilina	20 U/ml
Estreptomina	40 mg/ml
Cloranfenicol	1 mg/ml
Difenil	100 mg/ml
Etanol	1 ml
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación

- Pulverizar la semilla de níger.
- Ponerla en ebullición en agua destilada durante 30 minutos.
- Filtrar a través de una gasa y aforar a 1000 ml.
- Añadir y disolver la glucosa, el fosfato, la creatinina y el agar.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.
- Enfriar a 50 °C.
- Disolver en baño María el difenil en etanol.
- Añadir el difenil al medio en ambiente estéril.
- Añadir los antibióticos en ambiente estéril.
- Homogeneizar.
- Envasar.

AGAR STAIB

Se utiliza para diferenciar los clamidoconidios producidos por *Candida albicans* (únicos y escasos o ausentes) de los de *C. dubliniensis* (en pares o en racimos y abundantes). Cuando se prepara para aislados puros, no es necesario adicionar los antibióticos.

Composición

Semilla de níger (<i>G. abyssinica</i>)	50 g
Glucosa	1 g
Fosfato de potasio dihidrogenado	1 g
Creatinina	1 g
Penicilina	20 U/ml
Estreptomicina	40 mg/ml
Agar	18 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación

- Pulverizar la semilla de níger.
- Hervirla en agua destilada durante 30 minutos.
- Filtrar a través de una gasa y reponer el volumen de agua perdido.
- Añadir y disolver la glucosa, el potasio, la creatinina y el agar.
- Esterilizar a 121 °C durante 20 minutos.
- Dejar que baje la temperatura del medio a 50 °C y añadir los antibióticos en ambiente estéril.
- Homogeneizar.
- Envasar.

AGAR CANAVANINA-GLICINA-AZUL DE BROMOTIMOL

El medio se emplea para diferenciar *C. neoformans* de *C. gattii*.

Composición

Solución A	
Glicina	10 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄	1 g
Tiamina-HCl	1 mg
Sulfato de L-canavanina	30 mg
Agua destilada	100 ml

Disolver los ingredientes y esterilizar por filtración (0.45 µm), pH = 5.6

Solución B

Azul de bromotimol	0.4 g
NaOH al 0.01 N	64 ml
Agua destilada	36 ml

Preparación

- Agar 20 g
- Solución B 20 ml
- Agua destilada 880 ml

Procedimiento

- Mezclar y esterilizar a 121 °C por 15 minutos.
- Enfriar a 50 °C y agregar 100 ml de la solución A estéril.
- Mezclar muy bien y verter.

Después de la inoculación, la lectura se realiza a las 72 horas. *C. neoformans* var. *neoformans* no cambia el color original del medio (amarillo), ni hay desarrollo de la colonia. *C. neoformans* var. *gattii* cambia el color del medio a azul cobalto y se presenta crecimiento de la levadura.

AGAR DEXTROSA-LECHE-PÚRPURA DE BROMOCRESOL

Es un medio que se utiliza para diferenciar *T. mentagrophytes* de *T. rubrum* y de *Microsporum persicolor*. También es útil para obtener las características comunes de otros dermatofitos y para detectar contaminación.

Preparación

Solución A

Agua destilada	1000 ml
Leche descremada en polvo (marca Carnation)	80 g
Púrpura de bromocresol (sol. al 1.6 %)	2 ml

Disolver los ingredientes en un matraz de 2 l y esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 min.

Solución B

Glucosa	40 g
Agua destilada	200 ml

Disolver y esterilizar en autoclave a 121 °C por 8 minutos.

Solución C

Agar	30 g
Agua destilada	800 ml

Hacer la mezcla en un matraz de 3 l y dejarla reposar por 15 minutos, esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 minutos y después adicionar las soluciones A y B a la solución C. Ajustar el pH 6.6 y distribuir el medio (lo más frío posible) en condiciones de esterilidad en tubos con tapón de rosca y mantenerlos inclinados.

Precauciones: no sustituir la leche por caseína. Algunos autores sugieren un pH de 6.8, pero a 6.6 es más evidente el cambio de pH.

La inoculación debe hacerse colocando un fragmento de 1 mm² de la colonia que se va a estudiar en el centro de la superficie del medio; dejar ligeramente floja la tapa del tubo. Inocular como control un tubo que contenga agar Sabouraud antibiótico. Leer a los 7, 10 y 14 días y registrar los datos siguientes:

- Comparar el crecimiento entre los dos medios (púrpura de bromocresol y Sabouraud antibiótico).
- Cambio de pH: alcalinidad (color púrpura), acidez (color amarillo); sin cambio respecto a un tubo sin inocular; puede observarse hidrólisis (zona transparente en la periferia o reverso de la colonia). *T. mentagrophytes* alcaliniza el medio y, en consecuencia, en su cultivo se observa un color púrpura; en *T. rubrum* no hay cambio hasta los 14 días.
- Producción de pigmento: rojo en el caso de *T. rubrum*.

AGAR EXTRACTO DE MALTA

Es un medio que se conserva estable por varias semanas y es útil para el aislamiento y caracterización morfológica de la mayoría de hongos filamentosos, particularmente de *Aspergillus fumigatus*.

Composición

Extracto de malta	20 g
Peptona	1 g
Dextrosa	20 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación

- Mezclar los ingredientes (excepto la dextrosa).
- Calentar hasta ebullición.
- Añadir la dextrosa y homogeneizar.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.
- Distribuir en cajas de Petri o en tubos.

AGAR EXTRACTO DE LEVADURA

Se utiliza para inducir la conidiación y reducir el crecimiento vegetativo.

Composición

Extracto de levadura	15 g
Agar	20 g
Agua destilada	1100 ml

Preparación

- Disolver el extracto de levadura en 100 ml de agua.
- Esterilizar por filtración.
- Disolver el agar en 1000 ml de agua.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.
- Enfriar a 45 °C.
- Añadir 6 ml de la solución de extracto de levadura. El resto de la solución inicial se guarda en el refrigerador para su uso posterior.
- Envasar.

AGAR BORELLI

Se utiliza para favorecer la conidiación y producción de pigmento de los dermatofitos, particularmente de *M. canis*.

Composición

Harina de arroz o de trigo	14 g
Leche descremada en polvo	14 g
Miel de abeja	7 g
Agar	14 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación

- Disolver en el agua los ingredientes.
- Esterilizar a 110 °C durante 10 minutos.

AGAR ASCOSPORA

Se utiliza para inducir la formación de ascas y ascosporas de *Saccharomyces cerevisiae*.

Composición	
Acetato de potasio	10 g
Extracto de levadura	2.5 g
Dextrosa	1 g
Agar	30 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación

- Mezclar y homogeneizar los ingredientes.
- Ponerlos en ebullición durante 1 minuto.
- Ajustar el pH a 6.5.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.
- Envasar.

MEDIO DE GORODKOWA

Se usa para obtener ascas y ascosporas de *Saccharomyces cerevisiae*.

Composición	
Glucosa	0.1 g
Peptona	1.0 g
Cloruro de sodio	0.5 g
Agar	1.5 g
Agua destilada	100 ml

Preparación

- Mezclar los ingredientes.
- Poner la mezcla en ebullición durante 5 minutos.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

AGAR ALFACEL

Se usa para la obtención de cleistotecios de *Ajellomyces capsulatus*.

Composición	
Alfacel (celulosa)	20 g
MgSO ₄	1 g
KH ₂ PO ₄	1.5 g
NaNO ₃	1 g
Extracto de levadura	0.5 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación

- Disolver por calentamiento todos los ingredientes.
- Ajustar el pH a 5.7.
- Esterilizar a 121 °C por 15 minutos.
- Envasar.

AGAR AVENA-JITOMATE

Se utiliza para obtener ascosporas de *Arthroderma* spp.

Composición	
Harina de avena para bebé	10 g
Puré de jitomate	10 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 g
NaNO ₃	1 g
Agar	18 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación

- Disolver por calentamiento los ingredientes en el agua.
- Ajustar el pH a 5.6.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.
- Envasar.

AGAR CEREAL

Se utiliza para la producción de ascocarpos de los hongos Gymnoascaceae.

Composición	
Cereal mixto precocido	10 g
Fosfato dipotásico	1.5 g
Sulfato de magnesio	1 g
Nitrato de sodio	1 g
Agar	18 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación

- Disolver en el agua los componentes con calor.
- Ajustar el pH a 5.6.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.
- Envasar.

MEDIO DE GIS

Se usa para obtener la fase sexual de *Saccharomyces cerevisiae* y permite diferenciarlo de otras levaduras no ascosporadas.

Procedimiento

- En un tubo de ensayo de 15 × 150, colocar un fragmento de gis cortado por su eje longitudinal en forma diagonal.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.
- Agregar 3 ml de agua destilada estéril.
- Inocular en el centro de la parte plana la levadura por estudiar.
- Incubar a temperatura ambiente durante 5 a 8 días. Se toma una muestra del cultivo y se tiñe con la técnica para ascosporas.

MEDIO DE PRUEBA PARA DERMATOFITOS (DTM, DERMATOPHYTE TEST MEDIUM)

Se utiliza como medio selectivo para el aislamiento de dermatofitos a partir de muestras muy contaminadas con bacterias u otros hongos. El indicador de pH permite identificar fácilmente a los dermatofitos, pues por el desarrollo de éstos cambia el color amarillo del medio a rojo, debido a la degradación de la fitona y a la liberación de compuestos alcalinos.

Composición

ADS con antibióticos	36 g
Agua destilada	1000 ml
Solución de rojo de fenol al 0.5 %	40 ml
HCl 0.8 N	6 ml
NaOH 0.1 N	15 ml
Agua destilada c.n.p.	100 ml

Preparación

- Preparar ADS con antibióticos.
- Añadir a la mezcla del ADS 40 ml de rojo de fenol.
- Homogeneizar y adicionar el HCl.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.
- Envasar.

AGAR TRICHOPHYTON (1-7)

Se utiliza para diferenciar los dermatofitos de acuerdo con sus necesidades vitamínicas (véase cuadro 3.1).

Composición

Agar 1	(medio base de caseína sin vitaminas)	
	Hidrolizado de caseína libre de vitaminas	2.5 g
	Glucosa	40 g
	Sulfato de magnesio (MgSO ₄)	0.1 g
	Fosfato de potasio (KH ₂ PO ₄)	1.8 g
	Agar	15 g
	Agua destilada	1000 ml
Agar 2	Agar 1 con	50 mg de inositol
Agar 3	Agar 1 con	50 mg de inositol 200 µg de tiamina
Agar 4	Agar 1 con	200 µg de tiamina
Agar 5	Agar 1 con	2 mg de ácido nicotínico
Agar 6	(medio base de nitrato de amonio sin vitaminas)	
	Nitrato de amonio (NH ₄ NO ₃)	1.5 g
	Glucosa	40 g
	Sulfato de magnesio (MgSO ₄)	0.1 g
	Fosfato de potasio (KH ₂ PO ₄)	1.8 g
	Agar	15 g
	Agua destilada	1000 ml
Agar 7	Agar 6 con	30 mg de HCl-histidina

Preparación

- Disolver por calentamiento los ingredientes del medio seleccionado.
- Poner en ebullición durante 1 minuto.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

Estos medios se encuentran disponibles en el mercado.

DETECCIÓN DE PERFORACIÓN DEL PELO

Se usa para diferenciar algunos dermatofitos que tienen la capacidad de producir órganos perforantes.

Composición

Solución de extracto de levadura al 10 %	3 ml
Agua destilada	20 ml
Cabellos de niño prepúber cortados en fragmentos esterilizados	1 cm

Procedimiento

- Mezclar la solución de extracto de levadura con el agua.
- Verter 2 ml de solución en cada tubo.
- Agregar de 5 a 10 cabellos por tubo.
- Inocular los cabellos con el hongo por estu-
diar.
- Incubar durante cuatro semanas a tempera-
tura ambiente.
- Observar los pelos aclarados con KOH o con
azul de algodón.

AGAR BIGGY

Se emplea para identificar colonias de *Candida* spp y otras levaduras, las cuales toman una coloración que varía del marrón al negro brillante. Inhibe el desarrollo de muchas bacterias y hongos contaminantes.

Composición

Glucosa	10 g
Extracto de levadura	1 g
Glicina	10 g
Citrato de bismuto amónico	5 g
Sulfito de sodio	3 g
Cloranfenicol	0.5 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación

- Disolver en el agua todos los ingredientes.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

AGAR HARINA DE MAÍZ

Se utiliza para la producción de pseudohifas e hifas de algunas especies de *Candida* y para la producción de clamidoconidios de *C. albicans* y de *C. dubliniensis*.

Composición

Harina de maíz	2 g
Agar	15 g
Tween 80	15 ml
Agua destilada	1000 ml

Preparación

- Disolver la harina de maíz en el agua desti-
lada.
- Dejar reposar a temperatura ambiente duran-
te 15 minutos.
- Filtrar con papel filtro.
- Añadir el agar.
- Añadir el Tween 80.
- Aforar a 1000 ml.
- Esterilizar a 120 °C durante 20 minutos.

AGAR HARINA DE ARROZ-TWEEN 80

Favorece la producción de clamidoconidios de *C. albicans* y de *C. dubliniensis*.

Composición

Harina de arroz	10 g
Tween 80	10 ml
Agar	10 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación

- Hervir durante 30 segundos la harina de
arroz.
- Filtrar a través de gasa y reconstruir el vo-
lumen.
- Agregar el agar y disolver.
- Agregar el Tween 80.
- Esterilizar a 120 °C durante 20 minutos.
- Dejar reposar toda la noche en baño María a
60 °C.
- Decantar la porción clara y filtrar a través de
una gasa.
- Esterilizar a 120 °C durante 20 minutos.
- Envasar.

Cuadro 9.1. Inoculación en animales.

Micosis	Agente etiológico	Modelo experimental	Vía de inoculación	Concentración de inóculo	Tiempo de incubación y/o muerte	Órgano blanco
Dermatofitosis	<i>Trichophyton</i> spp <i>Microsporum</i> spp	Cobayo Conejo	Cutánea ¹	500 mg del dermatofito en 2-3 ml y con tela adhesiva	15-20 días	Piel
Pitiriasis versicolor y/o dermatitis seborreica	<i>Malassezia</i> spp	Cobayo	Cutánea ¹	500 mg de agente etiológico en 1 g de vaselina	3-5 días	Piel
Tiña negra	<i>Exophiala werneckii</i>	Cobayo	Cutánea ¹			Piel
Esporotricosis	<i>Sporothrix schenckii</i>	Cobayo Ratón	Intratesticular	1×10^5	10 días	Testículo
Cromoblastomycosis	<i>Fonsecaea pedrosoi</i> <i>F. compacta</i>	Rata Hámster	Subcutánea intraperitoneal			Todos los órganos del abdomen
		Ratón	Intracutánea Intravenosa		20-30 días	Piel Órganos diversos incluido el sistema nervioso central
						Cerebro
	<i>Wangiella dermatitidis</i> <i>Cladophialophora bantiana</i>					
Actinomicetoma	<i>Phialophora verrucosa</i> , <i>Cladophialophora carrioni</i>					Órganos diversos
	<i>Nocardia brasiliensis</i> , <i>N. asteroides</i> , <i>Actinomadurea madurae</i>	Hámster Cobayo Ratón	Subcutánea		15-30 días	Piel y tejido subcutáneo
Eumicetoma	<i>Madurella mycetomatis</i> <i>Acremonium kiliense</i> <i>Scedosporium apiospermum</i>	Ratón			15-30 días	Piel y tejido subcutáneo
Histoplasmosis	<i>Histoplasma capsulatum</i>	Ratón	Intraperitoneal	0.5 ml de suspensión micelial a la turbidez del tubo núm. 1 McFarland	7-28 días	Bazo Hígado

Coccidioidomicosis	<i>Coccidioides immitis</i>	Ratón Cobayo Hámster	Intravenosa Intratesticular	1.0 ml de suspensión micelial a la turbidez del tubo núm. 1 McFarland	7-28 días	Pulmones, ganglios linfáticos
Blastomicosis	<i>Blastomyces dermatitidis</i>	Cobayo Hámster	Intramuscular	0.5 ml de suspensión micelial a la turbidez del tubo núm. 1 McFarland	7-28 días	Pulmón
Paracoccidioidomicosis	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Ratón	Intratesticular	2 gotas de suspensión micelial a la turbidez del tubo núm. 1 McFarland	15-30 días	Testículo
		Hámster	Intratesticular	0.5 ml de suspensión micelial a la turbidez del tubo núm. 1 McFarland		Testículo
Candidosis	<i>Candida albicans</i> ²	Conejo	Intravenosa	w/w	3-7 días	Pulmones, riñones, meninges, corazón
			Intragástrica			Tubo digestivo
	<i>Candida tropicalis</i> ³	Ratón y rata	Intravenosa	Dosis muy alta		
		Conejo	Intravenosa	w/w	3-7 días	Riñón, meninges, corazón
Criptococosis	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Ratón	Intravenosa	1×10^4 5×10^5 en 0.3 ml	A partir del décimo día	Cerebro, pulmón, líquido peritoneal, hígado
			Intraperitoneal			
			Intracraneal		8-30 días	
Aspergilosis	<i>Aspergillus fumigatus</i> ⁴	Aves jóvenes o recién nacidas	Expuestas a inhalación	Muchos conidios en lugares cerrados	3-5 días	Sacos aéreos
		Paloma	Intravenosa	Pocos conidios	3-7 días	Varios órganos, incluido músculo cardíaco
		Conejo	Intravenosa	No determinado	3-5 días	Varios órganos principalmente riñón
		Ratón	Intravenosa		Muerte súbita	Riñón

¹Previo rasurado y escarificación de la piel.

²Todas las cepas de *C. albicans* son patógenas.

³Sólo 50 % de las cepas de *C. tropicalis* son patógenas.

Otras especies de *Candida* no son patógenas en las mismas condiciones de experimentación.

⁴Otras especies de *Aspergillus* tienen virulencia débil o nula.

⁵La reducción de dosis infectantes para estudios terapéuticos ha fallado, pues los animales control mueren y los sobrevivientes se recuperan y aparentemente desarrollan inmunidad.

AGAR PAPA-ZANAHORIA-BILIS

Es un medio particularmente favorable para la obtención de clamidoconidios de *C. albicans*.

Composición	
Pulpa de zanahoria	20 g
Pulpa de papa	20 g
Agar	20 g
Bilis fresca de buey	150 ml
Agua destilada	1000 ml

Preparación

- Macerar las pulpas durante una hora.
- Poner la mezcla en ebullición durante cinco minutos.
- Filtrar a través de papel filtro y reponer el volumen.
- Añadir el agar y fundirlo.
- Añadir la bilis de buey.
- Esterilizar a 120 °C durante 15 minutos.

MEDIOS CROMÓGENOS

Diversos medios cromógenos han salido al mercado, cuyo objetivo es diferenciar de forma rápida y confiable algunas de las especies más comunes de *Candida* asociadas a patología. Son medios que pueden ser utilizados desde el primoaislamiento y favorecen la detección de mezcla de especies. El color diferente de las colonias indica o sugiere la especie o especies en estudio. Ejemplo de esto es el medio CHROMagar-*Candida*TM que diferencia a *C. albicans* de *C. dubliniensis*; la primera forma colonias lisas verde claro y la segunda colonias rugosas verde oscuro. Otros medios similares son CAND2 y Candiselect4. Estos medios se encuentran disponibles en el mercado.

FILAMENTACIÓN EN SUERO

Se usa para diferenciar a *C. albicans* y *C. dubliniensis* de otras especies, ya que éstas forman tubos germinativos en dos a tres horas en las condiciones indicadas. Después de este tiempo, potencialmente cualquier especie puede formar tubos germinativos aunque más rudimentarios y en menor número.

Composición

Suero humano o de conejo	1 ml
--------------------------	------

Procedimiento

- En un tubo estéril colocar el suero y una asada de levaduras.
- Incubar a 37 °C durante tres horas.
- Tomar una gota de suero y observar al microscopio.

AGAR CASEÍNA

Se utiliza para diferenciar a *Nocardia brasiliensis* de otras especies de *Nocardia*, con base en la capacidad de hidrolizar la caseína. El resultado de las pruebas bioquímicas para determinar la especie de actinomiceto en estudio debe ser comparado con las tablas disponibles (véase Micetomas en cap. 4).

Composición

Leche descremada en polvo	10 g
Agar	2 g
Agua destilada estéril	200 ml

Preparación

- Disolver la leche en 100 ml de agua, agregándola poco a poco para evitar la formación de grumos.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.
- Disolver el agar en 100 ml de agua.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.
- Enfriar ambas soluciones a 48 °C, mezclar y homogeneizar.
- Envasar.

PRUEBA DE CRECIMIENTO EN GELATINA

Se utiliza para diferenciar a *N. brasiliensis* (que crece en este vehículo) de otras especies de *Nocardia*.

Composición

Gelatina	4 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación

- Disolver la gelatina por ebullición durante 5 segundos.
- Ajustar el pH a 7.0.
- Esterilizar a 121 °C durante 10 minutos.
- Envasar.

PRUEBA DE HIDRÓLISIS DE GELATINA

Se utiliza para demostrar la actividad proteolítica de algunas especies de hongos y de Actinomycetes causantes de micetoma y cromoblastomycosis.

Composición

Gelatina	10 g
Caldo de infusión-corazón	2.5 g
Agua destilada	100 ml

Preparación

- Disolver los ingredientes por calentamiento en el agua.
- Dejar la ebullición durante dos minutos.
- Ajustar el pH a 7.2.
- Esterilizar a 15 libras de presión durante 10 minutos.

DETECCIÓN DE UREASA

Se usa para poner de manifiesto la producción de ureasa por los géneros Trichophyton, Cryptococcus y Nocardia. La reacción se hace evidente por el cambio de color del medio hacia el magenta.

Composición

Base de agar urea	24 g
Agua destilada	1000 ml
Urea	40 g

Preparación

- Disolver la base de agar urea en 950 ml de agua destilada y esterilizar por filtración. Dejar reposar 2 minutos.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.
- Dejar enfriar a 50 °C y agregar 50 ml de urea al 40 % en ambiente estéril.

AGAR TIROSINA

Es útil para diferenciar las especies de Actinomycetes.

Composición

Agar nutritivo	23 g
Tirosina	5 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación

- Disolver el agar por calentamiento en 900 ml de agua.
- Dejar enfriar a 55 °C.
- Disolver la tirosina en 100 ml de agua a temperatura ambiente.
- Mezclar la suspensión de agar con la solución de tirosina, teniendo especial cuidado de que los cristales de tirosina estén distribuidos de manera homogénea.
- Esterilizar la mezcla a 121 °C durante 15 minutos.
- El pH final debe ser de 6.9 a 7.1.
- Envasar.

AGAR XANTINA

Se usa para diferenciar las especies de Actinomycetes.

Composición

Agar nutritivo	23 g
Xantina	4 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación

- Disolver el agar por calentamiento en 900 ml de agua.
- Dejar enfriar a 55 °C.
- Disolver la xantina en 100 ml de agua a temperatura ambiente.
- Mezclar la suspensión de agar con la solución de xantina, asegurándose de que los cristales de xantina estén distribuidos de manera homogénea.
- Esterilizar la mezcla a 121 °C durante 15 minutos.
- Ajustar el pH entre 6.9 a 7.1.
- Envasar.

MEDIO DE LECHE TORNASOLADA

Se utiliza para diferenciar los géneros y especies de *Actinomyces* anaerobios.

Composición	
Leche en polvo	100 g
Tornasol	5 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación

- Disolver los ingredientes en el agua.
- Esterilizar la mezcla a 121 °C durante 15 minutos.
- Envasar.

El color rosa del tornasol indica una reacción ácida causada por la fermentación de la lactosa. Un color púrpura o azul (alcalinidad) indica no fermentación. Un color blanco indica reducción y aparece cuando el tornasol sirve como receptor de electrones.

La formación de grumos (coagulación) es causada por la precipitación de la caseína originada por el ácido que, a su vez, es producido a partir de la lactosa. La coagulación también puede ser causada por la conversión de la caseína en paracaseína por la enzima renina.

La disolución de los grumos indica digestión enzimática de las proteínas de la leche.

AGAR INFUSIÓN-CEREBRO-CORAZÓN

Este es un medio enriquecido y útil para el crecimiento de organismos exigentes. En este medio también se favorece la conversión de las fases miceliales de algunos hongos dimórficos (como *Sporothrix* e *Histoplasma*) en fases parasitarias si se incuban a 37 °C; frecuentemente se requieren resiembras repetidas para acercarse a 100 % de transformación.

Composición	
Agar infusión-cerebro-corazón	52 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación

- Mezclar el medio deshidratado con el agua destilada.

- Calentar con agitación frecuente y poner en ebullición por un minuto.
- Vaciar 8 ml del medio en tubos de tapón de rosca.
- Esterilizar la mezcla a 121 °C durante 15 minutos.

MEDIO DE CONVERSE

Se emplea para obtener las formas parasitarias (esférulas con endosporas) de *Coccidioides* spp.

Composición	
Glucosa 1 M	22 ml
Acetato de amonio 1 M	16 ml
Fosfato monopotásico 1 M	3.75 ml
Fosfato dipotásico 1 M	3 ml
Sulfato de magnesio 1 M	1.6 ml
Sulfato de cinc 0.01 M	1.24 ml
Cloruro de sodio 0.01 M	24 ml
Bicarbonato de sodio 0.01 M	14 ml
Cloruro de calcio 0.01 M	2 ml
Agua destilada q.b.p.	1000 ml

Preparación

- Mezclar todos los ingredientes y aforar con agua a 1000 ml.
- Llenar los tubos con 10 ml del medio.
- Esterilizar la mezcla a 121 °C durante 15 minutos.
- Ajustar el pH a 6.5.

MEDIO PARA OBTENER CÉLULAS FUMAGOIDES

Se utiliza para obtener in vitro las células fumagoides a partir de hongos causales de cromoblastomicosis.

Composición	
Dextrosa	2 g
Peptona	1 mg
Agua destilada estéril	100 ml

Preparación

- Mezclar y homogeneizar los ingredientes anteriores (caldo dextrosa Sabouraud).
- Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.
- Ajustar el pH a 2.5.
- Los cultivos deben ser incubados a 37 °C.

MEDIO PARA OBTENCIÓN DE LEVADURAS DE *SPOROTHRIX* SPP

Composición

KH ₂ PO ₄	0.91 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2.38 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.60 g
KCl	1 g
Arginina	1 g
Tiamina	1 × 10 ⁻⁶ g
Biotina	1 × 10 ⁻⁹ g
Glucosa	20 g
Agua destilada	1000 ml
Solución de Berthelot	20 gotas

Preparación de la solución de Berthelot

Composición

Fe(SO ₄) ₃ ·9H ₂ O	50 g
MnSO ₄ ·7H ₂ O	2 g
CaSO ₄ ·2H ₂ O	0.50 g
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0.05 g
CaCl ₂ ·6H ₂ O	0.05 g
TiSO ₄ ·4H ₂ O	0.20 g
ZnSO ₄ ·4H ₂ O	0.10 g
CuSC ₄ ·5H ₂ O	0.05 g
GI(SO ₄) ₄ ·4H ₂ O	0.10 g
H ₃ BO ₃	0.05 g
H ₂ SO ₄	1 ml
H ₂ O	1000 ml

Se deben mezclar y homogeneizar todos los componentes y filtrar en equipo millipore.

Preparación

- Disolver los ingredientes de uno en uno.
- Ajustar el pH a 6.8.
- Esterilizar el medio a 121 °C durante 15 minutos.
- Inocular el medio e incubar a 37 °C.

PREPARACIÓN DE LEVADURAS PARA PRUEBAS BIOQUÍMICAS

PURIFICACIÓN DE LEVADURAS DE CONTAMINANTES BACTERIANOS

Habitualmente las bacterias son lábiles a pH ácido, a diferencia de las levaduras, que son resistentes; esta característica es útil para separar estos grupos de organismos.

Procedimiento

- Inocular cuatro tubos que contengan medio de Sabouraud líquido con una porción del cultivo por purificar.
- Agregar 1, 2, 3 y 4 gotas de HCl 1N a cada tubo, respectivamente.
- Incubar a 37 °C durante 24 horas.

Generalmente los tubos que contienen dos y tres gotas de ácido se encuentran libres de bacterias.

SEPARACIÓN DE MEZCLAS DE LEVADURAS

Procedimiento 1

- Inocular tubos que contengan medio de Sabouraud líquido con el cultivo por purificar.
- Incubar a 37 °C durante 24 horas.
- Agitar el tubo y sembrar una gota de la suspensión en estría abierta en una caja que contenga agar gelosa sangre.
- Incubar a 37 °C durante 24 horas.
- Resembrar en agar dextrosa Sabouraud cada una de las colonias que se desarrollen.

Procedimiento 2

- Depositar una porción del cultivo de las levaduras por separar en 5 ml de agua destilada estéril (tubo 0).
- Preparar cinco tubos con 4.9 ml de agua destilada estéril y numerarlos del 1 al 5.
- Pasar 0.1 ml de la suspensión del tubo 0 al tubo 1 y agitar.
- Pasar 0.1 ml de la suspensión del tubo 1 al tubo 2 y agitar.
- Repetir el procedimiento hasta el tubo 5 para obtener una dilución final de 1: 250 000.
- Sembrar una gota de la suspensión de cada tubo en una caja que contenga agar dextrosa Sabouraud en estría abierta.
- Incubar a 37 °C durante 24 horas.
- Resembrar cada una de las colonias aisladas que se desarrollen.

PREPARACIÓN DE LEVADURAS PARA AUXANOGRAMA

- Resembrar el cultivo en estudio, en tubos con gelosa simple (medio libre de azúcares) durante tres generaciones.

- Incubar cada generación a 37 °C durante 24 horas.
- Agregar 4.5 ml de solución salina estéril a cada uno de los tubos de la tercera generación. Esta suspensión constituye el inóculo para el auxanograma.

MEDIOS PARA AUXANOGRAMA

AUXANOGRAMA DEL CARBONO EN PLACA

Medio base. Se utiliza como sostén de los discos de azúcares y para observar el crecimiento de las levaduras para su posterior identificación.

<i>Composición</i>	
Extracto de levadura	0.67 g
Agar noble	20 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación

- Disolver los ingredientes en el agua.
- Poner en ebullición suave durante un minuto.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.
- Guardar en refrigeración a 4 °C.

DISCOS DE AZÚCARES PARA EL AUXANOGRAMA DE CARBONO

Materiales

- Discos de papel filtro estériles de 5 mm de diámetro.
- Azúcares (glucosa, lactosa, maltosa, sacarosa, rafinosa y galactosa), 20 g de cada uno.
- Agua destilada, 100 ml por azúcar.

Procedimiento

- Disolver cada tipo de azúcar en 100 ml de agua.
- Esterilizar por filtración.
- Sumergir los discos en las distintas soluciones de azúcares durante 24 horas.
- Colocar los discos de papel en una caja de Petri y ponerlos en la estufa a 37 °C durante 24 horas.
- Guardar los discos en un frasco estéril de boca ancha.

Existen en el mercado diversos métodos manuales y automatizados que evalúan cada vez un número mayor de carbohidratos útiles para la identificación de levaduras.

COLECCIÓN Y CONSERVACIÓN DE CULTIVOS

La colección de cultivos en un laboratorio de micología es una herramienta valiosa y permanente para el micólogo. En ella se conservan los aislamientos clínicos, ambientales, de referencia, atípicos, de importancia epidemiológica y todos aquellos que representen la historia micológica de la infección de un paciente. Todos ellos son útiles también en la investigación y en la enseñanza. El valor de la colección depende de la calidad y la exactitud en la clasificación de los aislamientos que en ella se conservan.

REGISTRO DE CULTIVOS

Para mantener un sistema uniforme de registro, toda la recopilación de información debe hacerse de forma idéntica, de preferencia en una libreta o computadora destinada exclusivamente para ello. Todo número debe asignarse solamente una vez. La información mínima que debe contener el registro de cada cepa se sugiere a continuación:

- Número de ingreso, nombre del hongo y fecha de ingreso a la colección.
- Cuándo, dónde y por quién fue aislado el hongo. Para los aislamientos clínicos es útil un resumen clínico.
- Fecha y autor que envía el aislamiento.
- Clasificación taxonómica actualizada del hongo. La clasificación puede o no ser correcta.
- Asignar un número y clave de colección.

La información anterior puede ampliarse o modificarse de acuerdo con las necesidades de cada laboratorio. De igual manera, el sistema de archivo puede variar desde simples tarjetas o carpetas hasta los modernos y útiles archivos computarizados; puede ser también un sistema combinado, sobre todo en los casos de aislamiento clínico en que se incluyan radiografías, tomografías, fotografías de lesiones, esquemas, además del resumen clínico y datos de laboratorio.

RECEPCIÓN DE NUEVOS AISLAMIENTOS

Al recibirse un nuevo aislamiento para integrarse a la colección, deben seguirse los pasos que se presentan a continuación:

1. Vaciar inmediatamente los datos del aislamiento en la libreta de ingresos. Escribir el nombre del hongo con lápiz hasta que se confirme su identidad. Si falta algún dato importante del aislamiento, solicitarlo a quien lo envía.

2. Realizar un examen directo y las pruebas bioquímicas necesarias para asegurarse de que el cultivo está clasificado adecuadamente.

3. Depositar el cultivo original en una placa de agar papa-dextrosa (APD) para asegurarse de que el cultivo está puro.

4. Una vez que se ha confirmado la pureza e identidad, asignar al cultivo un número de ingreso y marcar todos los tubos y placas con el mismo número.

5. De la placa con APD inoculada, preparar un examen directo permanente, marcado con el número de ingreso para depositarlo en la colección de cultivos.

6. De la placa con APD inoculada, preparar cinco subcultivos en APD.

7. Revisar los cultivos a intervalos de siete días hasta que se observe una buena conidiación y/o esporulación.

Los cinco subcultivos se conservan y se distribuyen de la forma siguiente:

- Con un subcultivo preparar una suspensión con agua y almacenarla.
- Colocar dos subcultivos en nitrógeno líquido.
- Cubrir dos subcultivos con aceite mineral estéril y almacenarlos.

RECUPERACIÓN DE LOS CULTIVOS LIOFILIZADOS

En ocasiones, los laboratorios reciben cultivos liofilizados. Estos cultivos pueden estar en frascos simples o dobles (uno dentro del otro), dependiendo de quién hace el envío. Los cultivos se preparan en leche descremada, suero humano o algún otro medio y después se liofilizan. Para la recuperación del cultivo, hay que apegarse a los pasos siguientes:

1. Tener listo un caldo nutritivo, como caldo dextrosa Sabouraud o agua destilada estéril para reconstituir el material liofilizado y medio de cultivo como agar dextrosa Sabouraud y pipetas Pasteur.

2. Con un filo metálico triangular, hacer una muesca en el tubo que contiene el material liofilizado. Asegurarse de dejar suficiente espacio en los extremos del tubo para que se pueda manejar con seguridad.

3. Limpiar el exterior del tubo con una gasa humedecida con alcohol al 70 %.

4. Sosteniendo el tubo con la gasa humedecida con alcohol, romper el tubo en dos partes a nivel de la muesca.

5. En condiciones asépticas, colocar con la pipeta Pasteur unas gotas de caldo o agua destilada en el tubo que contiene el material liofilizado.

6. Permita que se suspendan todas las partículas en el caldo o agua. Esto puede requerir de 15 a 20 minutos.

7. Con la pipeta Pasteur, se extrae todo el material reconstituido y se deposita en una placa de agar nutritivo. El material también se puede depositar en caldo en vez de agar. Las dos técnicas son buenas.

Cuando los aislamientos se obtienen de un material liofilizado, el hongo tarda aproximadamente el doble de tiempo normal para su desarrollo.

TÉCNICAS DE CONSERVACIÓN

Los métodos de conservación de cultivos más comunes incluyen la técnica de capa de aceite mineral estéril, la liofilización, el cultivo en agua y la congelación, conservación en refrigeración y conservación permanente en tubos sellados.

TÉCNICA DE CONSERVACIÓN EN AGUA

Probablemente esta sea la técnica más simple para mantener los aislamientos fúngicos; la mayoría de los aislamientos se mantienen viables durante cinco años.

Procedimiento

- En condiciones asépticas, agregar 2 ml de agua destilada estéril a un tubo con cultivo altamente esporulado crecido en APD.

TÉCNICA DE CUBIERTA DE ACEITE MINERAL ESTÉRIL

Procedimiento

- En condiciones asépticas, se vierte aceite mineral estéril en un cultivo con abundante conidiación, previamente crecido en APD.
- El aceite debe cubrir todo el cultivo, de tal manera que el nivel quede a 1 cm por debajo del borde del tapón de rosca; de lo contrario, será difícil el manejo del hongo en una fecha posterior.
- Cerrar el tubo y conservarlo a temperatura ambiente.

Procedimiento para la preparación de subcultivos

- Limpiar el cuello y el tapón del tubo con alcohol al 70 %.
- Abrir el tubo, flamear la boca del mismo y extraer un fragmento de la colonia con una asa micológica.
- Evite extraer filamentos que se encuentren flotando en el aceite, pues éstos generalmente dan como resultado subcultivos negativos.
- Retirar todo el aceite mineral posible del inóculo, tapar el tubo nuevamente y volver a almacenarlo.
- Transferir el inóculo a un tubo con caldo dextrosa Sabouraud.
- Incubar a 30 °C hasta que aparezca crecimiento.
- Subcultivar en tubos con APD.
- Hacer una preparación en fresco para comprobar la identidad del hongo.

TÉCNICA DE CONSERVACIÓN PERMANENTE DE CULTIVOS

Esta técnica es útil sobre todo para la enseñanza de la morfología macroscópica de los hongos, ya que permite la conservación permanente de las colonias crecidas en agar.

Procedimiento

- Cultivar el hongo que se va a conservar en tubos con APD, hasta la madurez del cultivo.
- El tubo debe tener tapón de algodón.

- Impregnar totalmente el tapón de algodón con formalina al 10 % (sin destapar el tubo) y mantenerlo así durante tres días.
- Introducir el tapón del algodón hacia el interior del tubo de tal manera que quede un espacio de aproximadamente 1 cm entre el tapón y el borde del tubo.
- Colocar una capa de vaselina-parafina al 50 % (VAS-PAR) de aproximadamente 0.5 cm de espesor sobre el tapón de algodón y permitir que se solidifique.
- Agregar una capa de resina sintética sobre la capa de VAS-PAR hasta el borde del tubo. Mantener el tubo en posición vertical hasta que seque completamente la resina.
- Conservar el tubo a temperatura ambiente.

RECUPERACIÓN DE CULTIVOS APARENTEMENTE NO VIABLES

Los cultivos que parecen no ser ya viables pueden reactivarse ocasionalmente. Se pueden intentar varias técnicas antes de considerar que los cultivos están muertos.

Procedimiento para intentar reactivar cultivos con caldo

- En condiciones asépticas, agregar de 2 a 3 ml de caldo dextrosa Sabouraud a un tubo del cultivo con un aislamiento aparentemente no viable.
- Incubar el cultivo a 30 °C y revisarlo periódicamente para observar cualquier crecimiento nuevo.
- Con un asa micológica transferir el nuevo crecimiento a un tubo que contenga APD con extracto de levadura al 1 %.
- Si no hay crecimiento después de tres o cuatro semanas, desechar el cultivo y anotar el resultado en la libreta de colección de cultivos.

Procedimiento para intentar reactivar cultivos con capas de agar

- En condiciones asépticas, con una pipeta se depositan de 2 a 3 ml de agar dextrosa Sabouraud fundido (50 °C) en el tubo del aislamiento aparentemente no viable. Cubrir exactamente la cima de la colonia con el agar fundido.

- Incubar el cultivo a 30 °C y revisarlo periódicamente para observar cualquier crecimiento nuevo que emerja a través de la fina capa de agar.
- Transferir el nuevo crecimiento a un tubo que contenga APD con extracto de levadura al 1 %.
- Si no se presenta crecimiento nuevo en tres o cuatro semanas, desechar el tubo y anotarlo en la libreta.

Procedimiento para intentar reactivar cultivos por homogenización

- En un tubo que contenga 1 ml de agua destilada, depositar tanta cantidad como sea posible de un aislamiento aparentemente no viable.
- Con el asa micológica fragmentar el hongo.
- Transferir todo el contenido del tubo a una placa de APD con extracto de levadura al 1 %. Cubrir el borde de la caja con parafilm para retardar la deshidratación.
- Incubar la caja de Petri a 30 °C y revisarla periódicamente para observar cualquier crecimiento nuevo.
- Si no se observa crecimiento en tres o cuatro semanas, desechar el cultivo y anotarlo en la libreta.

Procedimiento para reactivar hongos en medios enriquecidos

- Agregar a los tubos con cultivos, aparentemente no viables, 5 ml de caldo de infusión cerebro-corazón (BHI) o de Sabouraud líquido con extracto de levadura al 2 %.
- Agitar y desprender los fragmentos de la colonia de tal forma que queden suspendidos en la fase líquida.
- Incubar a 30 °C y revisar periódicamente para observar cualquier crecimiento nuevo.
- Si no se observa crecimiento en tres o cuatro semanas, desechar el cultivo y anotarlo en la libreta.

FIJACIÓN Y SELLADO DE CULTIVOS PARA DEMOSTRACIÓN Y ENSEÑANZA

Los hongos peligrosos como *B. dermatitidis*, *C. immitis*, *H. capsulatum* y *P. brasiliensis* deben

fijarse antes de ser utilizados como materiales de enseñanza. Un método satisfactorio consiste en utilizar formalina al 10 %. Se introduce un algodón totalmente impregnado con formalina en el tubo que contiene el cultivo o se puede utilizar el tapón de algodón del mismo tubo.

Este algodón se mantiene en el interior del tubo durante tres días. Después de este tiempo y bajo medidas de precaución extremas, se recomienda intentar un subcultivo de la colonia para corroborar su no viabilidad. En caso de ser necesario, se recomienda aumentar el número de días con la impregnación con formalina.

PROCEDIMIENTOS PARA LA EXTRACCIÓN, VISUALIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

EXTRACCIÓN DE ADN

El material biológico y los reactivos se deben manejar con guantes y con protectores oculares. Muchos de los reactivos utilizados en biología molecular son cancerígenos y/o producen quemaduras graves.

Cultivar en medio líquido el hongo filamentosos por tratar (en condiciones de tiempo, temperatura y nutrientes específicas para cada especie de hongo de interés) y cosechar por filtración en condiciones estériles. Las levaduras pueden ser cultivadas en medio sólido y cosechadas con una espátula.

1. Secar perfectamente la masa fúngica colocándola entre dos o más hojas de papel filtro estéril.
2. En un tubo de 2.0 ml colocar 600 µl de buffer de lisis.
3. Adicionar Proteinasa K a una concentración final de 200 µg/ml (stock: 20 mg/ml) (10 µl).
4. En un mortero estéril colocar un poco de nitrógeno líquido y adicionar la masa fúngica.
5. Macerar perfectamente hasta obtener un polvo blanquecino. Adicionar periódicamente N₂, evitando que se humedezca el polvo fúngico.
6. Colocar el polvo en el tubo que contiene el buffer de lisis con Proteinasa K y agitar firmemente (manualmente) hasta obtener una mezcla homogénea.
7. Incubar la mezcla en baño de agua a 65 °C durante 1 hora.
8. Añadir 800 µl (un volumen) de fenol-clorofórmico-isoamílico (en proporciones 25-24-1 respec-

tivamente) y agitar firmemente hasta obtener una muestra con aspecto lechoso.

9. Centrifugar la muestra a 14 000 rpm por 15 minutos. Se forman tres capas: la capa superior (fase acuosa), que contiene el ADN; la intermedia contiene desechos celulares y la inferior (fase orgánica) contiene fenol, cloroformo, alcohol isoamílico y proteínas del hongo.

10. Transferir cuidadosamente la fase acuosa a otro tubo de 1.5 ml (cuidar de no tocar con la pipeta la capa intermedia).

11. Añadir 0.1 volumen de acetato de sodio 3M y dos volúmenes de etanol al 100 % (de preferencia frío); agitar el tubo por inversión suave hasta visualizar las hebras de ADN. Si no ocurre precipitación, dejar la muestra incubando a -20°C hasta el día siguiente.

12. Centrifugar la muestra a 14 000 rpm por 5 minutos para formar un precipitado en el fondo del tubo.

13. Decantar el etanol y adicionar 1 ml de etanol al 70 %. Agitar por inversión suave. Centrifugar 5 min a 10 000 rpm.

14. Decantar el etanol y secar el ADN a temperatura ambiente (aproximadamente 10 minutos) o en vacío.

15. Resuspender el ADN en agua destilada estéril (cantidad variable dependiendo de la cantidad de ADN).

16. Adicionar 1 μl de ARNsa de una solución de 100 mg/ml.

17. Incubar a 37°C por 1 hora.

18. En un tubo de 0.5 ml mezclar 3 μl de la solución de ADN más 1.6 μl de buffer de carga y 5.4 μl de agua destilada estéril.

19. Depositar esta muestra en el pozo de un gel de agarosa al 0.8 %, teñido con bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

20. Aplicar una corriente de 70 volts por aproximadamente 1.5 h.

21. Observar el gel en un transiluminador para verificar la calidad de su ADN.

EXTRACCIÓN DE ARN

1. En un tubo de 2.0 ml, colocar 0.75 ml de buffer de lisis (NaCl 0.6 M, EDTA 10 mM, Tris HCl 100 mM pH 8.0, SDS 4 %) y 0.75 ml de fenol (saturado con Tris HCl 0.1 M, pH 8.0).

2. Pulverizar la masa fúngica en un mortero que contenga nitrógeno líquido.

3. Transferir el polvo al tubo que contiene el buffer de lisis. Puede llenar el tubo con el polvo fúngico. Tapar el tubo perfectamente y agitar manualmente por 15 a 20 minutos.

4. Centrifugar por 10 minutos a 10 000 rpm.

5. Transferir la fase superior a un tubo nuevo y adicionarle un volumen de fenol (saturado con Tris HCl 0.1 M pH 8.0) y agitar en vórtex hasta tener una mezcla homogénea.

6. Centrifugar por 10 minutos a 10 000 rpm.

7. Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo y adicionar 0.75 volúmenes de LiCl 8 M.

8. Almacenar toda la noche a 4°C .

9. Agitar en el vórtex brevemente y centrifugar 10 min a 10 000 rpm. Eliminar el sobrenadante por decantación.

10. Resuspender el pellet en 300 μl de agua destilada estéril y mezclar con 30 μl de acetato de sodio 3 M (pH 5.2) y 750 μl de etanol absoluto.

11. Almacenar a -20°C por 2 horas (o a -70°C por 30 minutos).

12. Centrifugar 10 min a 10 000 rpm.

13. Desechar el sobrenadante y lavar el precipitado con etanol al 70 %.

14. Secar el pellet de ARN a temperatura ambiente y resuspenderlo en agua tratada con DEPC (dietilpirocarbonato).

15. Almacenar el ARN de preferencia a -70°C .

16. Visualizar el producto en un gel desnaturante de agarosa al 1 %. (Véase preparación de muestras para ARN.)

SOLUCIONES DE TRABAJO PARA AISLAMIENTO DE ADN

Buffer de lisis. Cada una de las soluciones debe ser previamente preparada y esterilizada. Después mezclar en un tubo de 15 ml estéril:

- 2 ml de Tris HCl 50 mM (pH 7.2).
- 2 ml de EDTA (50 mM).
- 6 ml de SDS 3 %.
- 200 μl de beta-mercaptoetanol 1 %.
- 2.8 ml de agua destilada estéril.

Compuestos que deben estar disponibles por separado

- Nitrógeno líquido.
- Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (debe hacer una mezcla en proporciones 25-24-1 respectivamente).

- Acetato de sodio 3 M.
- Etanol absoluto (100 %).
- Etanol al 70 %.
- Proteinasa K (20 mg/ml).
- Agua destilada estéril.

Buffer de carga

- Azul de bromofenol al 0.25 %.
- Azul de xilencianol al 0.25 %.
- Glicerol en agua al 30 %.
- Conservar a 4 °C.

Buffer para corrimiento del gel: TAE 50X

- 242 g de Tris base.
- 57.1 ml de ácido acético glacial.
- 100 ml de EDTA 0.5 M (pH 8.0).

Diluir el buffer a una concentración 1X para preparar el gel de agarosa y para correr los geles.

GEL DESNATURALIZANTE PARA ARN

Preparar un gel de agarosa al 1 % que contenga 6 % de formaldehído y MOPS 1X.

Ejemplo: para un gel de 50 ml

- Agarosa, 0.5 g.
- MOPS 1X, 41.9 ml.

Formaldehído, 8.1 ml (agregarlo hasta que disminuya la temperatura de la agarosa a aproximadamente 60 °C). Dejar solidificar mientras se preparan las muestras.

PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE ARN

Para cada muestra, en un tubo de 0.5 ml colocar:

- H₂O-DEPC, 1 µl.
- ARN, 3 µl.
- MOPS 10X, 1.5 µl (1X).
- Formaldehído, 2.4 µl (6 %).
- Formamida, 7.5 µl (50 %).

Calentar a 75 °C por 5 min y después colocar en hielo 5 min. Agregar 2.5 µl de buffer de carga para ARN y 1 µl de bromuro de etidio (2.5 mg/ml).

Mezclar perfectamente, dar un pulso de centrifuga y depositar las muestras en el gel de agarosa. Correr el gel a 70 volts (si es un gel de 50 ml) durante 1.5 h aproximadamente y verificar la calidad del ARN en un transiluminador.

CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS POR ESPECTROFOTOMETRÍA

ADN

Blanco: agua destilada estéril. De las muestras por determinar su concentración, hacer por duplicado una dilución 1:250 o 1:500 de la muestra de ADN y leer absorbancia (luz UV) a 260 y 280 nm.

Hecha la lectura, determinar la concentración aplicando la siguiente fórmula:*

(Lectura a 260 nm) (dilución) (50)/1000 = concentración de ADN en µg/µl. La relación 260/280 debe ser cercana a 2.0 para considerar que los ácidos nucleicos están libres de impurezas.

ARN

Blanco: H₂O-DEPC. Hacer una dilución 1:250 o 1:500 de la muestra de ARN y leer absorbancia (luz UV) a 260 y 280 nm.

Hecha la lectura, determinar la concentración aplicando la siguiente fórmula:*

(Lectura a 260 nm) (dilución) (40)/1000 = concentración de ARN en µg/µl.

Si los ácidos nucleicos se encuentran íntegros, son adecuados para realizar estudios de RT, RT-PCR, Northern blot (ARN), PCR, Southern blot, RAPD (ADN), etc. Los ácidos nucleicos podrían requerir un tratamiento especial como el tratamiento con RNasa o DNasa (siguiendo las instrucciones del fabricante) dependiendo del uso que se le quiera dar.

*Los espectrofotómetros cuentan con sistemas que calculan automáticamente la concentración de ácidos nucleicos. También existen otros métodos para cuantificar ácidos nucleicos y la elección dependerá de la disponibilidad de material y equipo en cada laboratorio.

INOCULACIÓN EN ANIMALES

Cuando el cultivo del material clínico es negativo o no se demuestran los organismos infectantes a través de las diversas tinciones, se cuenta con la alternativa de la inoculación en animales de experimentación para establecer el agente etiológico de una micosis.

Los animales se han usado para el estudio de hongos patógenos presentes en muestras contaminadas. Sin embargo, para considerar la inoculación como un método diagnóstico, es fundamental la reproducción de la enfermedad experimental. Actualmente la inoculación experimental se utiliza con poca frecuencia como técnica diagnóstica. Algunas de las causas son:

1. En los especímenes patológicos el número de organismos puede no estar presente en cantidad suficiente para producir una infección progresiva en el animal.

2. Frecuentemente el animal que se usa como modelo experimental y la vía de inoculación no son los adecuados para reproducir la enfermedad.

3. El cuidado y mantenimiento de los animales en la misma área del laboratorio en donde se hacen estudios de rutina no es recomendable, por lo que deben mantenerse en un bioterio que no siempre están disponibles en las áreas en que se practica la micología médica.

4. Con el desarrollo de nuevos medios de cultivo y nuevas técnicas diagnósticas inmunológicas e histológicas, la sospecha diagnóstica se confirma o se descarta en un tiempo más corto de lo que tarda el proceso de infección experimental.

5. Las diferentes instituciones hospitalarias, universitarias y centros de investigación han creado comités de ética que están encargados de regular el uso de animales de experimentación. En consecuencia, los procedimientos que involucran animales deben estar perfectamente justificados.

En el campo de la investigación, la inoculación en animales se utiliza con fines más prácticos que los de simple diagnóstico; por ejemplo:

- Para evaluar sustancias antifúngicas.
- Para establecer la patogenicidad y/o virulen-

cia de cepas fúngicas aisladas de fuentes naturales.

- Para obtener formas parasitarias de los hongos dimórficos.
- Para estudiar la fisiopatogenia de las enfermedades.

Los animales más usados son: el ratón, la rata, el cobayo, el conejo y el hámster dorado. Este último es el más recomendado para el estudio de la mayoría de las micosis.

La vía de inoculación depende del tipo de agente etiológico por inocular y puede ser intraperitoneal, intravenosa, intracerebral, subcutánea, intramuscular, intranasal o simplemente aplicar el agente etiológico sobre la piel depilada y escarificada.

Una vez elegidos el modelo de experimentación y la vía de inoculación, se procede a efectuar la inoculación. Los pasos elementales son:

- Con una jeringa, añadir solución salina isotónica estéril al cultivo del hongo por inocular y agitar el cultivo suavemente para obtener una suspensión de conidios a partir de la cual podrán contarse, y ajustar la suspensión a la concentración adecuada.
- El volumen de suspensión inoculado dependerá de la vía de inoculación del hongo por estudiar y del animal de experimentación.
- Inocular como mínimo tres animales.
- Finalmente, para la fase de observación, los animales deberán ponerse en jaulas, separados de otros animales, para evitar algún tipo de contagio.

Después de un tiempo variable (dependiendo de la micosis), el animal muere; si no es así, entonces se procede a sacrificarlo (cuadro 9.1). En la autopsia, una parte de los tejidos se debe sembrar para obtener un retrocultivo del hongo o microorganismo inoculado.

La otra parte de los tejidos debe ser fijada para proceder a los exámenes histológicos.

Diagnóstico molecular de las micosis

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA COMO HERRAMIENTA DIAGNÓSTICA

La observación directa del agente etiológico de una enfermedad es prueba irrefutable de su papel como causante de aquélla. Sin embargo, esto no siempre es posible, como ocurre en el caso de la neumocistosis o de la lobomycosis.

En otros casos, el tiempo de multiplicación celular en un cultivo es excesivo respecto de las necesidades prácticas para dar inicio a un tratamiento. En este último caso se encuentran algunos agentes de eumicetoma como *Madurella* spp o *Pyrenochaeta romeroi*, o bien, el agente causal de la histoplasmosis o el de la paracoccidioidomicosis.

Frente a la imposibilidad de observar u obtener un microorganismo completo, la tecnología moderna ha recurrido a detectar algún componente propio y exclusivo del patógeno. El componente que permite la identificación no debe estar presente en el hospedero humano, ni tampoco debe ser compartido con otros microorganismos no patógenos.

Los polipéptidos y los ácidos nucleicos han sido utilizados como macromoléculas blanco para desarrollar diversos procedimientos de detección. Sin embargo, el ADN ofrece inmejorables ventajas como blanco para el diagnóstico: es la molécula presente en todos los seres vivos, excepto los virus de ARN; es químicamente estable, lo que permite su manipulación y almacenamiento; es la base

molecular de la identidad, lo que favorece una identificación o diagnóstico certeros; y es el origen de la diversidad, por lo que se puede emplear para estudiar la diversidad genética de patógenos de una especie asociada a las diferentes formas clínicas de una enfermedad.

El desarrollo de la biología molecular (BM, disciplina científica que estudia los procesos que se desarrollan en los seres vivos desde un punto de vista molecular) ha contribuido de forma impresionante a la mejor comprensión de las enfermedades infecciosas y ha proporcionado herramientas moleculares valiosas para el diagnóstico.

A través de la BM es posible detectar genomas de patógenos en tejido o fluidos de pacientes; contribuye a caracterizar mejor al agente causal de una enfermedad y a comprender mejor los mecanismos patológicos a nivel molecular. Con la caracterización molecular del ADN se logra fortalecer los datos específicos de los estudios epidemiológicos en los países donde una enfermedad es endémica.

Para extraer los ácidos nucleicos, y en particular el ADN, de cualquier organismo o material biológico, se han utilizado diversos procedimientos que los liberan de las células, aplicando métodos enzimáticos o mecánicos. Muchos de estos procedimientos son manuales, aunque actualmente han sido simplificados con la disponibilidad de kits comerciales. En el capítulo de procedimientos de laboratorio está descrita la técnica para realizar la extracción de ADN y de ARN.

Históricamente la detección de secuencias se inició mediante técnicas de hibridación como el Southernblot y el Northernblot. Posteriormente, esta estrategia fue remplazada por procedimientos que amplifican la secuencia blanco. Hoy día la técnica más conocida y más utilizada es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas Polymerase Chain Reaction); en consecuencia, este procedimiento será descrito con mayor extensión.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

En 1983, el bioquímico estadounidense Kary Banks Mullis tuvo la idea de desarrollar la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa, que consiste en amplificar (hacer múltiples copias) una secuencia específica de ADN usando nucleótidos trifosforados y una polimerasa de ADN. Por esta invención, hoy de gran utilidad en biotecnología y en investigación científica y forense, recibió el Premio Nobel de Química en 1993, compartido con el canadiense Michael Smith. Su estrategia fue simple pero original.

Dos secuencias cortas, conocidas como oligonucleótidos, cebadores o *primers*, se anclan cada uno en cada hebra complementaria de la doble hélice del ADN elegida como blanco. Este anclaje se basa en la complementariedad de bases de acuerdo con los pares adenina-timina (A-T) y guanina-citocina (G-C). Los extremos hidroxilos de los cebadores se enfrentan uno con otro aunque en cadenas distintas.

Estos extremos quedan disponibles a la acción de la ADN polimerasa, la que irá añadiendo nucleótido tras nucleótido según la complementariedad dictada por la cadena molde: donde haya una A como molde se incorporará una T y donde haya una G se incorporará una C.

La ADN polimerasa más conocida es la Taq polimerasa (obtenida de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*), que repetirá este acto cientos e incluso miles de veces. Esta enzima sintetiza la incorporación de nucleótidos a elevadas temperaturas, teniendo un óptimo de 72 °C y resistiendo la desnaturalización hasta 95 °C. Posteriormente, un calentamiento de la solución abrirá las hebras del ADN, las que al ser enfriadas nuevamente permitirán el anclaje de los cebadores que se encuentran en exceso.

El anclaje también ocurrirá sobre las hebras recién sintetizadas y la Taq polimerasa volverá a copiar tanto las hebras originales como las copias. Debido a que el proceso de replicación requiere un molde, las cadenas sintetizadas tendrán un tamaño definido, correspondiente al tamaño del fragmento flanqueado por los cebadores.

Los reactivos necesarios para realizar la PCR son los siguientes:

- Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), sustrato para sintetizar nuevo ADN.
- Dos iniciadores (o *primers* o cebadores), oligonucleótidos que son, cada uno, complementarios a una de las dos hebras del ADN. Son secuencias generalmente de 18 a 22 nucleótidos, que son reconocidas por la polimerasa para iniciar la reacción. Delimitan la zona de ADN que se va amplificar.
- Iones divalentes. Suele usarse magnesio (Mg^{2+}), comúnmente en forma de cloruro ($MgCl_2$) o algún otro catión divalente. Actúa como cofactor de la polimerasa.
- Iones monovalentes, como el potasio.
- Una solución *tampón* (buffer) que mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la ADN polimerasa.
- ADN polimerasa o mezcla de distintas polimerasas con temperatura óptima alrededor de 70 °C (la más común es la Taq polimerasa).
- ADN molde, que contiene la región de ADN que se va a amplificar.
- Termociclador, el aparato que va a mantener la temperatura necesaria en cada una de las etapas que conforman un ciclo.

CICLO DE AMPLIFICACIÓN

El proceso de PCR por lo general consiste en una serie de 20 a 35 cambios repetidos de temperatura llamados ciclos; cada ciclo suele consistir en 2 a 3 pasos a diferentes temperaturas. La PCR común se realiza con ciclos que tienen tres pasos de temperatura.

Los ciclos a menudo están precedidos por un choque térmico (llamado *hold*) a alta temperatura (> 90 °C) y seguido por otro choque térmico al final del proceso para la extensión de producto final o el breve almacenaje. Las temperaturas usadas y el tiempo aplicado en cada ciclo dependen de diversos factores: la enzima usada para la síntesis

de ADN, la concentración de iones divalentes y dNTPs en la reacción, la temperatura de unión de los iniciadores, y la longitud del ADN que se desea amplificar.

INICIALIZACIÓN

Consiste en llevar la reacción hasta una temperatura de 94-96 °C (o 98 °C si se está usando una polimerasa termoestable extrema), que se mantiene durante 1-9 minutos. Esto sólo es necesario para ADN polimerasas que requieran activación por calor.

DESNATURALIZACIÓN

Consiste en la separación de las dos hebras de ADN por medio de calentamiento (94-95 °C). La temperatura de desnaturalización depende de la proporción de G + C que tenga la hebra, o bien, del largo de ésta. También existe la posibilidad de desnaturalizar el ADN con sales o agentes químicos.

ALINEAMIENTO/UNIÓN DEL INICIADOR

Después se propicia la hibridación del cebador, es decir, éste se une a su secuencia complementaria del ADN molde. Para esto es necesario bajar la temperatura a 50-65 °C durante 20 a 40 segundos, permitiendo así el alineamiento. Los puentes de hidrógeno estables entre las cadenas de ADN (unión ADN-ADN) sólo se forman cuando la secuencia del cebador es muy similar a la secuencia del ADN molde. La polimerasa une el híbrido de la cadena molde y el cebador y empieza a sintetizar ADN. Los cebadores actuarán como límites de la región que va a ser amplificada.

EXTENSIÓN/ELONGACIÓN DE LA CADENA

La ADN polimerasa actúa tomando el ADN molde para sintetizar la cadena complementaria y partiendo del cebador como soporte inicial necesario para la síntesis de nuevo ADN.

La polimerasa sintetiza una nueva hebra de ADN complementaria a la hebra molde añadiendo los dNTP's complementarios en dirección 5'→3', uniendo el grupo 5'-fosfato de los dNTPs con el grupo 3'-hidroxilo del final de la hebra de ADN creciente (la cual se extiende).

La temperatura para este paso depende de la ADN polimerasa que usemos. Para la Taq polimerasa, la temperatura de máxima actividad está en 75 a 80 °C (comúnmente 72 °C). El tiempo de extensión depende tanto de la ADN polimerasa usada como de la longitud del fragmento de ADN que se va a amplificar. Hay una regla comúnmente usada: en su temperatura óptima, la polimerasa de ADN polimerizará 1000 bases en un minuto.

ELONGACIÓN FINAL

Etapa única que se lleva a cabo a una temperatura de 70 a 74 °C durante 5 a 15 minutos tras el último ciclo de PCR. Con ella se asegura que cualquier ADN de cadena simple restante sea totalmente ampliado.

CONSERVACIÓN

Este paso se lleva a cabo a 4-15 °C durante un tiempo indefinido para conservar la reacción a corto plazo. La PCR se realiza en un volumen de reacción de 15 a 100 µl, en tubos de 0.2 ml que se colocan en el termociclador.

La duplicación de la secuencia blanco ocurre de una manera exponencial a partir de la hebra molde: primero 2 copias, luego 4, en la siguiente 8, 16, 32... etc. Al cabo de 30 repeticiones, conocidas como ciclos, se habrán amplificado alrededor de un millón de copias. Este número es ya visible por técnicas que usan colorantes afines a la doble hélice del ADN o por hibridación con sondas.

Para verificar que la PCR ha generado el fragmento de ADN esperado, se emplean técnicas de electroforesis, que separan los fragmentos de ADN generados de acuerdo con su carga y su tamaño: generalmente se emplean la electroforesis en gel de agarosa, para fragmentos grandes; la electroforesis en gel de acrilamida, para los más pequeños; y, de forma más rápida y aplicable a la PCR asociada a marcaje fluorescente, la electroforesis capilar.

El tamaño de los productos de la PCR se determina en relación con un marcador de peso mo-

lecular de ADN, el cual contiene fragmentos de ADN de tamaño conocido y que se corre en el gel junto con los productos de PCR.

El principal problema de la PCR es la contaminación con ADN exógeno. Ello se debe a que esta tecnología es capaz de detectar muy pocas moléculas (cinco o más copias). Este problema conduce a resultados falsos positivos y puede ser evitado mediante la selección de personal altamente capacitado, el uso de ambientes específicos y restringidos, y la adición de algunos productos químicos que convierten a los productos de amplificación en productos lábiles.

El ejemplo para la aplicación de la PCR es el siguiente:

Modelo fúngico. Hongos filamentosos aislados del suelo, con características morfológicas compatibles con *Sporothrix schenckii*.

Extracción de ADN. Se realizó ruptura mecánica de las células fúngicas en presencia de nitrógeno líquido; el resultado de la maceración fue suspendido en buffer de lisis; la recuperación del material nucleico fue realizada con fenol cloroformo-alcohol isoamílico y la precipitación del ADN fue inducida con acetato de sodio y etanol absolu-

to. Terminada la extracción, se visualizó el ADN en un gel de agarosa, mostrado en la (fig. 10.1).

Gen blanco: una región del Dominio D1-D2 de aproximadamente 600 pb (fig. 10.2).

Oligonucleótidos utilizados. Sentido: FEPJL 5'CATATCAATAAGCGGAGGAAAAG3' Anti-sentido: REPJL 5'GCTCCGTGTTTCAAGACG 3'.

Tamaño esperado del fragmento amplificado: 600 pares de bases.

Mezcla de reactivos. Reactivo y concentración final: ADN 10 ng; buffer 1X; oligos 10 pM; dNTPs 10 mM; BSA (Albúmina sérica bovina) 0.01 %; Taq polimerasa 5 UI/μl; MgCl₂ 50 mM; agua hasta completar 25 μl.

Condiciones de amplificación. Un ciclo de desnaturalización de 94 °C por 5 minutos; 35 ciclos con las siguientes condiciones: desnaturalización, 94 °C por 1 min; hibridación, 63.3 por 1 min; polimerización, 72.0 por 1 min. Un ciclo final de polimerización a 72 °C durante 5 min. Visualización del fragmento (fig. 10.3).

Purificación del fragmento amplificado utilizando el "PCR Purification Kit" (QIAGEN). Este procedimiento elimina las impurezas del producto de PCR y optimiza los resultados de la secuenciación (fig. 10.4).

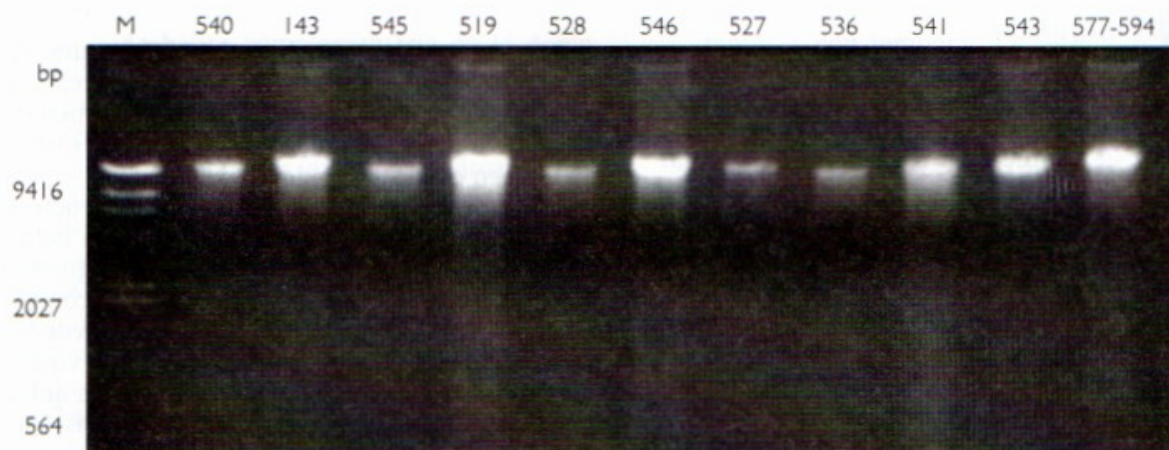


Fig. 10.1. Gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio. M: marcador de peso molecular (λ HindIII-DNA fragments); los números corresponden al ADN de cada uno de los aislados de suelo, con un tamaño aproximado de 9416 pb.



Fig. 10.2. Representación del operón del ADN ribosomal de hongos, en donde se localiza la región blanco por amplificar; ITS, espaciadores internos transcritos; IGS, espacios intergénicos; D1/D2, dominios 1 y 2.



Fig. 10.3. Gel de agarosa fragmento de 600 pb del dominio D1/ D2 del gen 26S rADN. M = Marcador de 100 pb; los números corresponden al número que fue asignado al aislado. La flecha indica el tamaño del fragmento esperado de 600 pb.

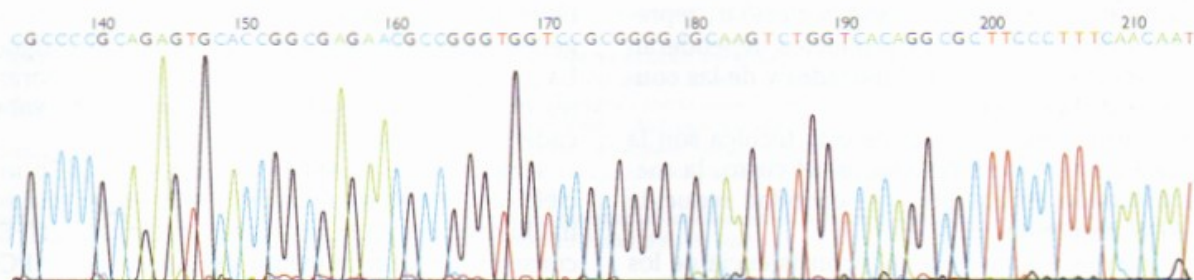


Fig. 10.4. Parte del cromatograma y secuencia del fragmento obtenido del aislado 540. El primero es de utilidad para definir la confiabilidad de la secuenciación. En la secuencia se observa la presencia de Ns al principio y al final; éstas indican que el secuenciador no pudo distinguir la base correspondiente y en consecuencia no podemos considerarla para el análisis de datos.

CGACGCTGTTNATTGCNCCACAANGGC-
NAGTNNTCGGCCACAGCTCAATTTGAAAT-
CTGGCCCCCGGCCGAGTTGTAATTTGGA-
GAGGATGCTTCTGGCGCGGGCCGTCCGAGTT-
CCTTGGAACAGGACGCCACAGAGGGTGAGA-
GCCCCGTACGACGGACGCCTAGCCTCTACGA-
AGCTCCTTCGACGAGTCGAGTAGTTTGGGA-
ATGCGCTCAAAATGGGAGGTAAATTTCTTCTA-
AAGCTAAATACCGGCCAGAGACCGATAGCG-
CACAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGC
ACTTTGAAAAGAGGGTTAAAAAGTACGTGA-
AATTGTTGAAAGGGAAGCGCCTGTGACCA-
GACTTGCGCCCCGCGGACCACCCGGCGTTCT-
CGCCGGTGCACTCTGCGGTGCGCAGGCCAGCA-
TCGGTTCTCCAGGGGGACAAAGGCCGCGGGA-
ACGTAGCTCCTTCGGGAGTGTTATAGCC-
CGCGGCGGCATGCCCTGGGGGGACCGAGGAC-
CGCGCTTCGGCAAGGATGCTGGCGTAATGGT-
CACCAGCGACCCGTCTTGAAAACACNGAGCA-
AA

Resultado de la secuenciación y comparación de la secuencia con el banco de datos genéticos *genbank database* utilizando el BLAST:

- Aislado 143: *Sporothrix schenckii*
- Aislado 519: *Sporothrix schenckii*
- Aislado 528: *Sporothrix schenckii*
- Aislado 540: *Sporothrix schenckii*
- Aislado 543: *Sporothrix schenckii*
- Aislado 545: *Endomyces scopularum*
- Aislado 546: *Acremonium* sp

En el ejercicio anterior la PCR, seguida de secuenciación, fue un procedimiento útil para confirmar o descartar una especie fúngica particular *Sporothrix schenckii*, en este caso con fines de confirmar la identificación, ya que los aislados fueron obtenidos del suelo, y en este hábitat comúnmente existen otros hongos con morfología muy similar y a veces son indistinguibles.

El éxito de la PCR propició el desarrollo de otras técnicas que son modalidades de la primera, para lograr objetivos particulares. Algunas de estas modalidades son descritas brevemente a continuación:

Transcripción inversa seguida de PCR (RT-PCR, Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction). El procedimiento es una PCR en la que el molde inicial es el ARN y se requiere una transcriptasa inversa, para convertir el ARN en un tipo de ADN llamado ADN complementario (ADNc) que después es utilizado para la PCR convencional.

Fragmentos polimórficos de ADN amplificado al azar (RAPD, Random Amplified Polymorphism DNA). Esta técnica utiliza iniciadores aleatorios de 10 nucleótidos (10 mers) para amplificar el ADN. Los productos de la amplificación son separados mediante electroforesis y las bandas visualizadas, de diferente peso molecular, representan diferentes *loci*. Los productos dependerán del genoma en estudio, del iniciador y de las condiciones de la reacción.

Las principales ventajas de esta técnica son la rapidez para obtener resultados, el costo, la menor inversión en equipos y la cantidad reducida de ADN requerido.

Como desventaja tiene la inconsistencia de los datos: diferentes condiciones de laboratorios con pequeñas alteraciones en los parámetros de amplificación pueden dar origen a resultados diversos.

Esta desventaja puede ser superada con una estandarización rigurosa de las condiciones de reacción y de amplificación, usando un control interno para asegurar la reproducibilidad de los productos de la amplificación, además del registro de las bandas nítidas y consistentes. Esta técnica ha tenido mayor aplicación en estudios epidemiológicos.

Polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism). Se refiere a secuencias específicas de nucleótidos en el ADN que son reconocidas y cortadas por las enzimas de restricción (también llamadas endonucleasas) y que varían entre individuos, por lo que se usa como marcador molecular. Las secuencias de restricción presentan usualmente patrones de distancia, longitud y disposición diferentes en el ADN de distintos individuos de una población, por lo que se dice que la población es polimórfica para estos fragmentos de restricción.

PCR anidada. Esta es una PCR muy específica y más sensible que la PCR tradicional, en la que el

producto amplificado es utilizado como template para realizar una segunda amplificación con primers que se ubican en la primera secuencia amplificada.

PCR multiplex. PCR en la que se utilizan dos o más pares de primers en un mismo tubo de reacción y, en consecuencia, se amplifican simultáneamente múltiples segmentos de ADN con más de una secuencia. Con este procedimiento se obtiene la información de varios loci en una sola reacción y se utiliza menor cantidad de molde para el análisis y menor cantidad de reactivos. También propicia una rápida construcción de base de datos.

PCR tiempo real (PCR cuantitativa). Es un método de gran exactitud y fiabilidad que se usa para amplificar y al mismo tiempo cuantificar moléculas de ADN o ADNc específicas, con lo cual se tiene acceso a datos precisos sobre la expresión genética de las células u organismos en estudio. La detección se basa en la utilización de colorantes que se unen a todas las secuencias de doble cadena de ADN en una reacción de PCR.

Una vez que el colorante se une al ácido nucleico formado en la reacción, éste emite una señal fluorescente que se procesa en tiempo real. En consecuencia, un aumento del producto de PCR conduce a un aumento de la fluorescencia detectada en cada ciclo; esto permite que el ADN pueda ser cuantificado.

El análisis de la curva de fusión del producto posibilita además la caracterización del fragmento amplificado por su temperatura de fusión (T_m). Una de sus grandes ventajas es que el proceso completo se realiza en el termociclador, lo cual ayuda a disminuir el riesgo de contaminación y aumenta el rendimiento de la prueba.

Todas las técnicas mencionadas previamente y diversas modalidades han sido aplicadas a la mayoría de modelos fúngicos, todos con resultados valiosos y de los cuales sólo se proporcionan algunas referencias, que pueden ser ampliadas de acuerdo con el interés del lector.

Entre las herramientas de diagnóstico en los laboratorios más modernos, la PCR es el procedimiento predominante. Sin embargo, sus elevados costos y la necesidad de personal muy bien entrenado restringen su uso, particularmente en los laboratorios con menos recursos.

La sensibilidad y especificidad compensan los costos relativamente elevados, sobre todo en aquellas enfermedades en las que el cultivo o la serolo-

gía son poco prácticos o imprecisos. Es alentador saber que las técnicas moleculares son introducidas cada vez con mayor frecuencia como auxiliares en el diagnóstico clínico, sobre todo en los hospitales de gran demanda. Se desea que en un

futuro próximo los métodos de detección basados en las propiedades químicas del ADN sean aplicados en mayor proporción, desde luego sin desdeñar la utilidad de algunos métodos tradicionales en micología, como el cultivo.

BIBLIOGRAFÍA

- Bialek, R., Feucht, A., Aepinus, C. y cols., "Evaluation of two nested PCR assays for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human tissue", *J. Clin. Microbiol.*, **40**:1644, 2002.
- Colom, M. F., Jover, A. y Ferrer, C., "Biología molecular en el diagnóstico de la candidiasis profunda en el paciente crítico neutropénico", *Rev. Iberoam. Micol.*, **23**:26, 2006.
- Duarte, E. R. y Hamdan, J. S., "RAPD differentiation of *Malassezia* spp from cattle, dogs and humans", *Mycoses*, **53**:48, 2010.
- Hua, Z., Rouse, J. L., Eckhardt, A. E. y cols., "Multiplexed real-time polymerase chain reaction on a digital microfluidic platform", *Anal. Chem.*, **82**:2310, 2010.
- Machouart-Dubach, M., Lacroix, C., Feuillade-de Chauvin, M. y cols., "Rapid discrimination among dermatophytes, *Scytalidium* spp, and other fungi with a PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Ribotyping method", *J. Clin. Microbiol.*, **39**:685, 2001.
- Mitchel, T. G., Freedman, E. Z., White, T. J. y Taylor, J. W., "Unique oligonucleotide primers in PCR for identification of *Cryptococcus neoformans*", *J. Clin. Microbiol.*, **32**: 253, 1994.
- Ramírez, M., Castro, C., Palomares, J. C. y cols., "Molecular detection and identification of *Aspergillus* spp from clinical samples using real-time PCR", *Mycoses*, **52**:129, 2009.
- Respaldiza, N., Montes-Cano, M. A., Dapena, F. J. y cols., "Prevalence of colonization and genotypic characterization of *Pneumocystis jirovecii* among cystic fibrosis patients in Spain", *Clin. Microbiol. Infect.*, **11**:1012, 2005.
- Santos, M. S., Souza, E. S., Junior, R. M. y cols., "Identification of fungemia agents using the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis", *Braz. J. Mol. Biol. Res.*, **43**:712, 2010.
- Suárez, F., Lortholary, O., Buland, S. y cols., "Detection of circulating *Aspergillus fumigatus* DNA by real-time PCR assay of large serum volumes improves early diagnosis of invasive aspergillosis in high-risk adult patients under hematologic surveillance", *J. Clin. Microbiol.*, **46**: 3772, 2008.
- Trama, J. P., Mordechai, T. E. y Adelson, M. E., "Detection and identification of *Candida* species associated with *Candida* vaginitis by real-time PCR and pyrosequencing", *Mol. Cell Probes*, **19**:145, 2005.

Pruebas de sensibilidad antifúngica

Los resultados variables observados con el uso de los diferentes antifúngicos, la introducción de nuevos compuestos y la aparición de la resistencia, con falla terapéutica y por ende alta mortalidad causada por especies intrínsecamente resistentes (*Candida krusei* y *Scedosporium prolificans*), hacen necesario contar con un método de sensibilidad antifúngica in vitro, adecuado, estandarizado, reproducible, económico, fácil de realizar, rápido y con puntos de corte definidos para detectar resistencia a los antifúngicos.

Actualmente el método estandarizado ideal para detectar la actividad antifúngica de diversas drogas es el de microdilución en caldo, descrito en 1985 por diversos comités de Estados Unidos de América para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y así tener un panorama general del uso de pruebas de sensibilidad antifúngica y desarrollar las normas que las regirían.

Debido a la variabilidad en la metodología utilizada y los resultados obtenidos de los diferentes laboratorios, el Instituto de Estándares de Laboratorios Clínicos (Clinical Laboratory Standards Institute [CLSI] antes denominado National Committee for Clinic Laboratory Standards [NCCLS]) estableció las condiciones de trabajo, incluyendo el medio de cultivo, tampón, inóculo, temperatura, pH y el tiempo de incubación. El CLSI publica periódicamente diversos documentos; hasta hoy el documento vigente es el M27-A3 (2008) para hongos levaduriformes y el M38-A (2008) para hongos filamentosos.

A pesar de que han pasado 25 años, las pruebas de sensibilidad a antifúngicos aún no están desarrolladas como las utilizadas para bacterias, y no se cuenta con los puntos de corte y los criterios de sensibilidad y resistencia, ni para todas las especies de levaduras y hongos filamentosos, ni para todos los antifúngicos.

En la actualidad los diferentes métodos utilizados para valorar la sensibilidad a los antifúngicos son: dilución en tubo, microdilución en caldo y difusión en disco, en tira o en placa.

MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN CALDO PARA LEVADURAS (M27-A3)

Este método cuantifica la inhibición del crecimiento fúngico producida por los antifúngicos, comparado con los controles en medio de cultivo:

- RPMI 1640 10.40 gramos.
- Tampón (MOPS)¹ 34.53 gramos.
- Agua destilada 1000 mililitros.
- Ajustar a pH 7.0 ± 0.1.

NOTA: RPMI² 1640 (con glutamina y rojo de fenol, sin bicarbonato).

¹Ácido morfolino propano sulfónico.

²Roswell Park Memorial Institute.

Preparación

- Disolver los componentes en 900 ml de agua destilada.
- Mientras se agita, ajustar el pH 7.0 ± 0.1 , utilizando NaOH 1 M.
- Aforar a 1000 ml.
- Esterilizar por filtración.
- Conservar a 4 °C hasta su uso.

Preparación de soluciones madre de los antifúngicos

En el cuadro 11.1 se anotan los diferentes antifúngicos solubles e insolubles en agua.

Antifúngicos solubles

- Pesar la cantidad de cada uno de los antifúngicos necesaria para obtener 100 veces la

Cuadro 11.1. Antifúngicos solubles e insolubles en agua.

<i>Insoluble en agua</i>	<i>Soluble en agua</i>
Anfotericina B	Fluconazol
Ketoconazol	Caspofungina
Itraconazol	5-fluorocitocina
Voriconazol	
Posaconazol	
Anidulafungina	

concentración más alta del antifúngico por ensayar.

- Distribuir en alícuotas y congelar a -70 °C (vigencia de seis meses).

Antifúngicos insolubles

- Pesar la cantidad de antifúngico suficiente para obtener 100 veces la concentración más alta del antifúngico por ensayar y disolverlo en dimetil sulfóxido (DMSO).
- Distribuir en alícuotas y congelar a -70 °C (vigencia de seis meses).

DILUCIONES DE LOS ANTIFÚNGICOS SOLUBLES

- Preparar una serie de diluciones a partir de la solución madre de cada uno de los antifúngicos, a una concentración de 10 veces la concentración final deseada, en RPMI 1640 (cuadro 11.2)
- Hacer una dilución $\frac{1}{2}$ en RPMI 1640.
- El contenido de cada tubo se vierte en cajas de Petri estériles y con una pipeta multicanal depositar 100 μ l en cada uno de los pozos de las columnas de la microplaca (usar microplacas de 96 pozos de fondo cóncavo).
- Conservar a 20 °C.

Cuadro 11.2. Diluciones de los antifúngicos solubles en agua.

<i>Tubo</i>	<i>Concentración (μg/ml)</i>	<i>Fuente</i>	<i>Volumen (ml)</i>	<i>Medio de cultivo (ml)</i>	<i>Concentración intermedia (μg/ml)</i>	<i>Concentración final 1:10 (μg/ml)</i>
1	5120	Sol. Madre	1.0	7	640	64
2	640	Paso 1	1.0	1.0	320	32
3	640	Paso 1	1.0	3.0	160	16
4	160	Paso 3	1.0	1.0	80	8
5	160	Paso 3	0.5	1.5	40	4
6	160	Paso 3	0.5	3.5	20	2
7	20	Paso 6	1.0	1.0	10	1
8	20	Paso 6	0.5	1.5	5	0.5
9	20	Paso 6	0.5	3.5	2.5	0.25
10	2.5	Paso 9	1.0	1.0	1.25	0.125
11	2.5	Paso 9	0.5	1.5	0.625	0.06
12	2.5	Paso 9	0.5	3.5	0.3125	0.03125

DILUCIONES DE LOS ANTIFÚNGICOS INSOLUBLES EN AGUA

- Preparar una solución a una concentración de 1600 µg/ml en DMSO.
- Esterilizar por filtración (filtros membrana).
- Distribuir en alícuotas y congelar a -70°C (vigencia de seis meses).

En el cuadro 11.3 se muestra la preparación de las diversas diluciones para los antifúngicos insolubles.

Preparación del inóculo

Hacer una suspensión de levaduras, y depositar 100 µl para tener una concentración final de 0.5×10^3 a 2.5×10^3 unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml).

Las microplacas inoculadas con las colonias levaduriformes problema se incuban a 35°C y se realizan lecturas visuales mediante ayuda de un espejo invertido a las 24 y 48 horas.

La lectura de las placas se basa en determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), la cual se interpreta como la concentración más baja del antifúngico capaz de inhibir el crecimiento de la levadura respecto del control de crecimiento.

Interpretación numérica del crecimiento levaduriforme en los pozos de la microplaca tomando como referencia los pozos control (sin antifún-

gico): 0 (óptimamente claro); 1 (ligera turbidez); 2 (disminución prominente de la turbidez [50 %]); 3 (ligera disminución en la turbidez), y 4 (ninguna disminución en la turbidez) (fig. 11.1).

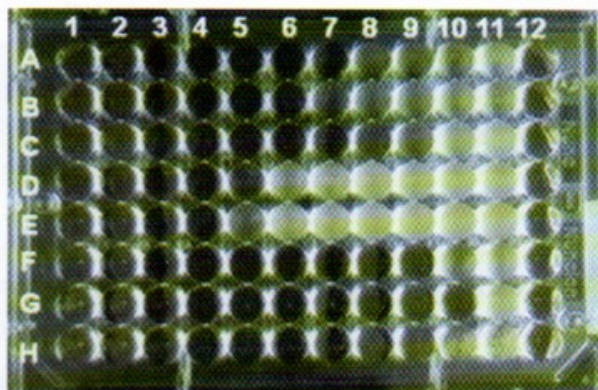


Fig. 11.1. Placa de microdilución en caldo. Tomando como referencia el pozo del ángulo superior izquierdo (1), éste contiene la concentración mayor de antifúngico y el 10 contiene la concentración menor. Los pozos de la columna 11 corresponden al control de crecimiento y los de la columna 12 al control de esterilidad. Cada una de las filas (lectura horizontal) corresponde a un aislado fúngico diferente. En esta placa, la CMI de las filas D y E es de 1 µg/ml, por lo que la interpretación para estos aislados es de resistencia a itraconazol en este ejemplo.

La interpretación de la CMI frente a la anfotericina B es de 0, es decir, óptimamente claro. En cambio, para los azoles, equinocandinas y flucitocina, la CMI se define como la concentración más

Cuadro 11.3. Diluciones de los antifúngicos insolubles en agua.

Tubo	Concentración (µg/ml)	Fuente	Volumen (ml)	Solvente DMSO (ml)	Concentración intermedia (µg/ml)	Concentración final 1:100 (µg/ml)
1	1600	Sol. Madre			1600	16
2	1600	Sol. Madre	0.5	0.5	800	8.0
3	1600	Sol. Madre	0.5	1.5	400	4.0
4	1600	Sol. Madre	0.5	3.5	200	2.0
5	200	Paso 3	0.5	0.5	100	1.0
6	200	Paso 3	0.5	1.5	50	0.5
7	200	Paso 3	0.5	3.5	25	0.25
8	25	Paso 6	0.5	0.5	12.5	0.125
9	25	Paso 6	0.5	1.5	6.25	0.0625
10	25	Paso 6	0.5	3.5	3.13	0.0313

baja a la cual se observa una prominente disminución en la turbidez (aproximadamente 50 %). Los criterios de interpretación de CMI se muestran en el cuadro 11.4.

Cuadro 11.4. Criterios de interpretación de la CMI por el CLSI.

Antifúngico	Sensible (µg/ml)	Sensible-dosis Dependiente (µg/ml)	Resistente (µg/ml)
Itraconazol	< 0.25	0.25 – 0.5	≥ 1
Fluconazol	≤ 8	16-32	≥ 64
Voriconazol	≤ 1	2	≥ 4
Posaconazol	≤ 1	–	–
Anfotericina	–	–	≥ 2
5-fluorocitocina	≤ 4	–	≥ 32
Caspofungina	≤ 2	–	–
Anidulafungina	≤ 2	–	–

MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EUCAST

Método propuesto como variante europea EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) del CLSI con el que se correlaciona en 85 %; el método se basa en el documento M27-A y es una alternativa semiautomatizada.

Las modificaciones son las siguientes: el medio RPMI es suplementado con 2 % de glucosa; las microplacas son de fondo plano; el tamaño del inóculo es de 1 a 5×10^3 UFC/ml y la lectura se realiza por espectrofotometría. Estos cambios se hicieron con la finalidad de acortar el periodo de incubación a 24 horas y prescindir de la lectura visual subjetiva para calcular el porcentaje de inhibición.

MÉTODOS COMERCIALIZADOS DE MICRODILUCIÓN

PANEL ANTIFÚNGICO COLORIMÉTRICO (SENSITITRE® YEASTONE)

Técnica de microdilución colorimétrica, basada en el documento M27-A, que incorpora en los pozos un indicador de crecimiento basado en un proceso de oxidorreducción (azul Alamar); en consecuencia, el medio contenido en los pozos cambia de color azul a rosa cuando se produce crecimiento.

Los seis antifúngicos más utilizados en infecciones sistémicas (anfotericina B, fluconazol, itraconazol, ketoconazol, 5-fluorocitocina y voriconazol) están incorporados en las microplacas (cuadro 11.5).

El inóculo se prepara a partir de un cultivo de 24 horas de crecimiento para *Candida* spp y 48 ho-

Cuadro 11.5. Concentraciones de los antifúngicos (µg/ml) distribuidos en la microplaca de Sensititre®.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C+											
B	0.008 AMB	0.016	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16
C	0.125 FLZ	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
D	0.008 ITZ	0.016	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16
E	0.008 KTZ	0.016	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16
F	0.03 5-FC	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64
G	0.008 VRZ	0.016	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16
H												

ras para *Cryptococcus neoformans* en agua destilada estéril y se ajusta a una concentración de $1 \text{ a } 5 \times 10^6$ UFC/ml. Se transfieren 20 μl de la suspensión a 11 ml de RPMI 1640 (concentración $1.5 \text{ a } 8 \times 10^3$ UFC/ml). Depositar 100 μl de la suspensión en cada pozo de la placa. Las placas se cubren con plástico y se incuban durante 24 a 48 horas a 35°C .

La lectura es visual, mediante un espejo invertido. Verificar que el pozo control de crecimiento vire a rosa. La CMI es la concentración más baja del antifúngico que no muestra cambio en el color. La CMI de anfotericina se lee a las 24 horas; el punto de corte es fácil de definir. El fenómeno de zona *trailing* descrito en los azoles se observa con baja frecuencia (fig. 11.2). La correlación con el método de referencia del CLSI es de 43 a 100 %.

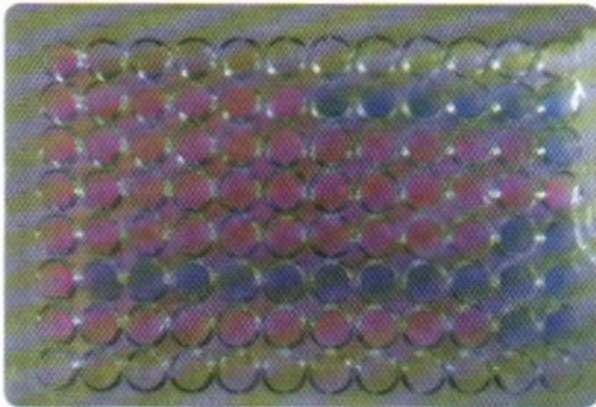


Fig. 11.2. Panel Sensititre Yeast One. El primer pozo de la fila A es el control de crecimiento (rosa). Las CMI(s) para AMB, FLZ, ITZ, KTZ, 5-FC y VRZ observadas en las filas B, C, D, E, F y G son de 0.5, 256, >16, 8, 0.06 y 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectivamente.

FUNGITEST®

Este método es semicuantitativo y se basa en la técnica de microdilución del CLSI, la galería con 16 pozos, la cual incluye seis antifúngicos (anfotericina B (AMB), 5-fluorocitocina (5FC), miconazol, ketoconazol (KTZ), itraconazol (ITZ) y fluconazol (FLZ)), en dos concentraciones diferentes (2-8, 2-32, 0.5-8, 0.5-4, 8-64 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectivamente) y dos pozos controles y un indicador de oxidorreducción, el cual cambia de color azul (ausencia de crecimiento) a rosa (crecimiento).

Preparación del inóculo

- Preparar una suspensión de levaduras de 24 de crecimiento en 3 ml de agua destilada y ajustar a la concentración del tubo 1 de McFarland. De esta suspensión hacer una dilución 1/20, para obtener una concentración final 1×10^3 UFC/ml.
- Inocular cada uno de los pozos con 100 μl de la suspensión. Incubar a 35°C durante 48 horas.

Los criterios de interpretación son: sensible, intermedio o resistente (fig. 11.3). La limitación de esta técnica es la incorporación de sólo dos concentraciones de antifúngicos.

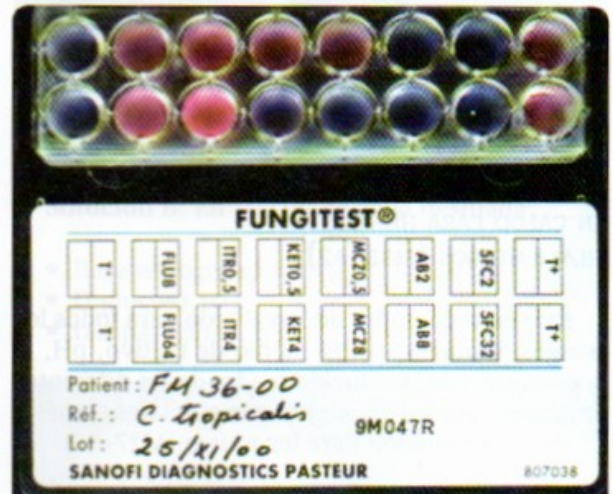


Fig. 11.3. Placa de Fungitest. Aislado de *C. tropicalis* sensible a AMB, 5FC (ambos en color azul) y resistente a ITZ y FLZ (ambos en color rosa).

ATB FUNGUS 2

Es un método que para realizarse cuenta con galerías de 16 pares de pozos; 15 pares contienen diferentes concentraciones de 4 antifúngicos (5-FC, 0.5-64 $\mu\text{g}/\text{ml}$; AMB, 0.5-16 $\mu\text{g}/\text{ml}$; FCA, 0.25-128 $\mu\text{g}/\text{ml}$; ITR, 0.125-4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y un par son utilizados como controles. El inóculo se prepara a partir de un cultivo levaduriforme de 24 horas de crecimiento; la suspensión se ajusta a una concentración correspondiente al tubo 2 de McFarland. Se debe transferir 100 μl a una ampulla de 7 ml de ATBF y depositar 135 μl en cada pozo de la galería.

Incubar a 35 °C durante 48 horas. La lectura se realiza visualmente o con el sistema ATB o mini API. La interpretación de la turbidez se clasifica en sensible, intermedio y resistente (fig. 11.4).

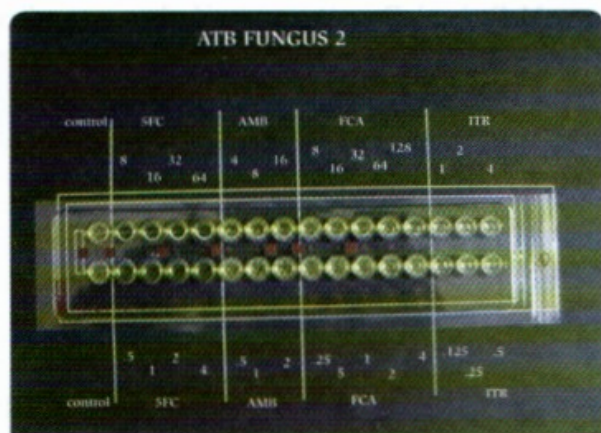


Fig. 11.4. Galería de ATB fungus 2.

MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN CALDO PARA HONGOS FILAMENTOSOS (M38-A2)

Este método no ha sido evaluado para todos los hongos filamentosos. El medio de cultivo, pH, la preparación de la solución madre de los diferentes antifúngicos y las diluciones son similares al método de microdilución para levaduras (M27-A3).

Preparación del inóculo

- Preparar una suspensión a partir del crecimiento fúngico de siete días, en tubo con el medio que favorezca mejor la conidiación (como agar papa dextrosa). La incubación generalmente es a 35 °C, pero para algunos hongos como *Fusarium* la incubación durante los dos primeros días es a 35 °C y los cinco días restantes a 28 °C.
- Cubrir el crecimiento fúngico con 1 ml de solución salina estéril al 0.85 % y desprender los conidios suavemente con ayuda de una pipeta Pasteur.
- Transferir la suspensión a un tubo estéril.
- Agitar con vórtex durante 15 segundos.
- Ajustar el número de conidios para obtener una concentración de 0.4×10^4 a 5×10^4 UFC/ml.

- Diluir la suspensión 1:50 en RPMI 1640.
- Inocular 100 μ l en cada pozo de la fila correspondiente, de una microplaca de 96 pozos.
- Incubar las placas a 35 °C, de 24 a 96 horas, dependiendo del hongo filamentosos en estudio.
- Realizar las lecturas visuales para determinar la CMI, que corresponde a 100 % de inhibición, para AMB, ITZ, VRZ y PZC. Para FLZ y KTZ, la CMI corresponde a 50 % de inhibición y para TRB 80 % de inhibición.
- Como control de inóculo, hacer una dilución 1:100 de la suspensión; sembrar 2 μ l de esta suspensión en una placa de agar dextrosa Sabouraud e incubar a 28 °C, hasta observar crecimiento.

Actualmente no existen puntos de corte bien definidos, pero con base en diversos reportes de estudios in vitro en gran número de aislados clínicos, se considera la CMI ≤ 1 μ g/ml, sensible; 2 μ g/ml, intermedia y ≥ 4 μ g/ml, resistente.

MÉTODOS DE DIFUSIÓN

E-Test®

Este método de difusión se basa en un gradiente definido de antifúngico, incorporado a tiras de plástico delgadas, inertes y no porosas, de 5 $\times$ 60 mm. La tira se divide en dos partes:

La parte superior muestra el código E, que corresponde a la prueba (E-Test) y las iniciales que identifican al antifúngico.

La parte inferior está calibrada con las concentraciones de la droga en μ g/ml (Biodisk, Solna Sweden) (fig. 11.5).

El método es fácil de realizar y se usa para determinar la CMI del antifúngico necesaria para inhibir el crecimiento de levaduras en un medio estandarizado (RPMI 1640). E-Test es una opción como alternativa para probar la sensibilidad antifúngica en levaduras patógenas.

La reproducibilidad de una prueba depende de una buena estandarización del inóculo, la temperatura y el tiempo de incubación. La principal desventaja se presenta cuando hay dificultad para definir el borde preciso de la zona de inhibición, particularmente cuando se trata de fluconazol y *Candida tropicalis*. Para limitar el error en la lec-

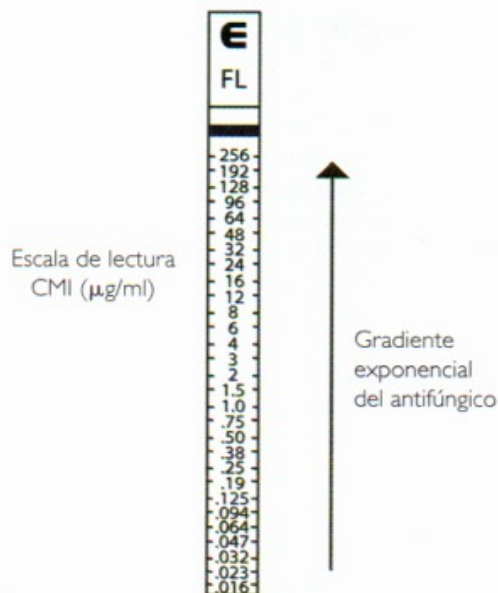


Fig. 11.5. Tira de E-test. La parte superior identifica al antifúngico (FL = fluconazol) y en la parte inferior se encuentra la escala de concentración.

tura de los puntos de intersección, se recomienda que la prueba sea leída por la misma persona.

El medio de cultivo contiene RPMI 1640 (10.4 g/l), MOPS (34.53 g/l), glucosa al 2 % y agar 1.5 %, pH 7.0 ± 0.1 .

El inóculo se prepara de un cultivo de 24 horas de crecimiento en agar dextrosa Sabouraud en 3 ml de solución salina estéril al 0.85 % y se ajusta a una concentración equivalente al tubo de 0.5 de McFarland. Se introduce un hisopo en la suspensión y se inoculan las placas de agar RPMI 1640 por estría cerrada en tres direcciones. Dejar secar durante 10 minutos y aplicar las tiras de E-Test. Incubar a 35 °C durante 24 a 48 horas para *Candida* spp y hasta 72 horas para *Cryptococcus neoformans*.

La lectura de la CMI del antifúngico es el punto de intersección de la elipse de inhibición de crecimiento con la tira (fig. 11.6). Los diferentes patrones de lectura son los siguientes:

- Punto de intersección bien definido.
- Crecimiento de microcolonias dentro de la zona de inhibición.
- Doble halo, ilustrado por el crecimiento de microcolonias, justo en el borde de inhibición.
- Crecimiento homogéneo alrededor de la tira, que es interpretado como resistente.

MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR CON TABLETAS Y DISCOS

TABLETAS (NEO-SENSITAB™)

En este método semicuantitativo, las tabletas Neo-sensitab son de 9 mm y contienen diferentes antifúngicos (Rosco Diagnóstica); permite la configuración de los antifungigramas, según el interés terapéutico concreto y su realización es similar a los antibiogramas convencionales para bacterias. La estabilidad de las tabletas a temperatura ambiente, con excepción de la anfotericina B, es una ventaja adicional.

Medio de cultivo de Shadomy para 1000 ml.

Solución A: Tampon 0.01M, pH 7, en 900 ml de agua destilada.

- NaH_2PO_4 1.56 g
- NaPO_4 1.78 g
- Agar-agar 15 g

Solución B: En 100 ml de agua destilada.

- Base nitrogenada 6.7 g
- D-glucosa 10 g
- L-asparagina 1.5 g

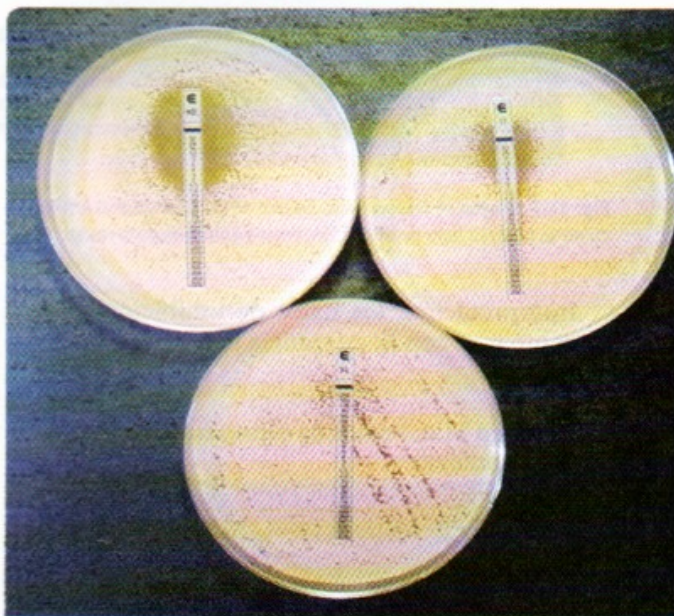


Fig. 11.6. Prueba de E-test. La CMI de la placa superior izquierda, 1.0 µg/ml; la placa superior derecha, 3.0 µg/ml; la placa inferior, >256 µg/ml.

En la solución A hay que disolver los ingredientes y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. La solución B se esteriliza por filtración. Después hay que verter B en A cuando esta última esté a una temperatura aproximada de 45 °C y, por último, hay que vaciar en cajas de Petri.

Preparación del inóculo

A partir de una colonia levaduriforme de crecimiento de 24 horas, realizar una suspensión en solución salina al 0.85 % y ajustar a una concentración equivalente al tubo de 0.5 de McFarland.

Inoculación de las placas: colocar 2 µl de la suspensión de levaduras y distribuirla sobre la placa con ayuda de un asa bacteriológica, por estría cerrada. Dejar secar durante 15 minutos y aplicar las tabletas (fig. 11.7).

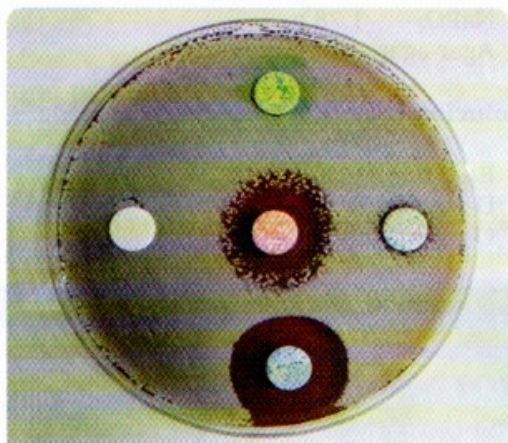


Fig. 11.7. Prueba de Neosensitab. En tres de las tabletas con antifúngico no se observa halo de inhibición, cuyo significado es la resistencia.

Interpretación: los halos de inhibición en mm se comparan con la referencia del proveedor (cuadro 11.6).

Cuadro 11.6. Puntos de corte para las tabletas con antifúngico.

Criterio	Tamaño del halo (mm)
S (sensible)	> 25
I (intermedio)	20-25
R (resistente)	< 20

DISCOS (DOCUMENTO M44-A2)

Es una técnica sencilla y fácil de realizar, en la que se estudia la sensibilidad de las levaduras frente a diferentes antifúngicos, de acuerdo con el halo de inhibición que se forma por la difusión del antifúngico en el agar Mueller Hinton (AMH).

Para la preparación del medio de cultivo, se emplea AMH adicionado con 2 % de glucosa y 0.5 % µg/ml de azul de metileno.

Solución A: Solución madre de glucosa: 40 gramos en 100 ml de agua destilada.

Solución B: Solución de azul de metileno: 0.1 gramo en 20 ml de agua destilada.

- Colocar 100 µl de la solución B en la solución A.
- Esterilizar por filtración y añadir 1 ml a las placas de 9 cm que contienen AMH, o 2.9 ml a las de 15 cm. Dejar que se absorba durante toda la noche.
- El inóculo se ajusta a una concentración de 1.5×10^6 UFC/ml.
- Las placas se inoculan utilizando un hisopo impregnado con la suspensión de la levadura problema y se distribuye en tres direcciones por estría cerrada.
- Dejar secar durante 15 minutos y colocar los discos en la superficie del AMH.
- Incubar a 35 °C durante 24 horas para levaduras del género *Candida* y 48 horas para *C. neoformans*.
- Los halos de inhibición se miden y se expresan en mm. Actualmente sólo existen puntos de corte estandarizados para fluconazol (cuadro 11.7 y fig. 11.8).

Cuadro 11.7. Puntos de corte para los discos de 25 µg de FLZ.

Criterio	Tamaño del halo (mm)	CMI µg/ml
S (sensible)	≥19	8
S-DD (sensible dosis-dependiente)	15-18	16-32
R (resistente)	≤14	64

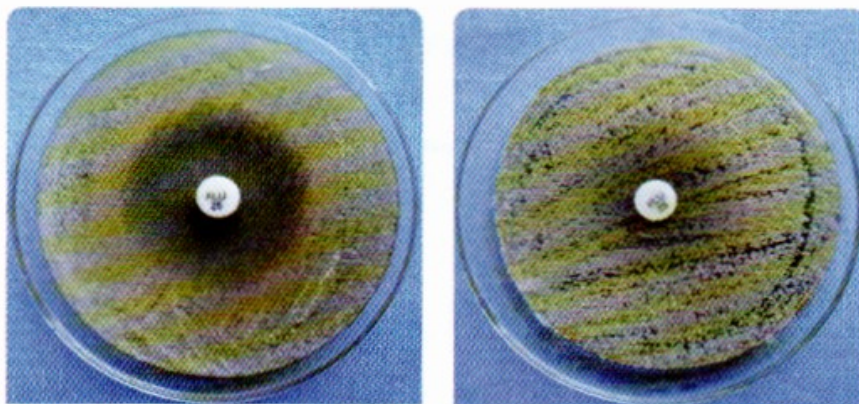


Fig. 11.8. Método de difusión en agar con discos (FLZ): izquierda, 8 µg/ml (sensible); derecha, 64 µg/ml (resistente).

BIBLIOGRAFÍA

- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), "Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard", 3a. ed., CLSI document M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
- , "Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard", 2a. ed., CLSI document M38-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
- , "Reference method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts. Approved guideline", 2a. ed., CLSI document M44-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009.
- Cuenca-Estrella, M. y Rodríguez-Tudela, J. L., "¿Pueden basarse las indicaciones de los antifúngicos en los estudios de sensibilidad?", *Rev. Iberoam. Micol.*, **19**:133, 2002.
- Espinel-Ingroff, A., Barchiesi, F., Cuenca-Estrella, M. y cols., "International and multicenter comparison of EUCAST and CLSI M27-A2 broth microdilution methods for testing susceptibilities of *Candida* spp to fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole", *J. Clin. Microbiol.*, **43**:3884, 2005.
- Ostrosky-Zeichner, L., Rex, J. H., Pfaller, M. A. y cols., "Rationale for reading fluconazole MICs at 24 hours rather than 48 hours when testing *Candida* spp by the CLSI M27-A2 standard method", *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **52**:4175, 2008.
- Pfaller, M. A. y Barr, A. L., "Evaluation of a novel colorimetric broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of yeast isolates", *J. Clin. Microbiol.*, **32**:1992, 1994.
- Rex, J., Pfaller, M. A., Galgiani, J. N. y cols., "Development of interpretative breakpoint for antifungal susceptibility tests: conceptual framework and analysis of in vitro-in vivo correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infections. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the National Committee for Clinical Laboratory Standards", *Clin. Infect. Dis.*, **24**:235, 1997.

Medidas de seguridad

Los laboratorios de micología médica no están exentos de los accidentes de trabajo a los que se hallan expuestos otros laboratorios; sin embargo, éstos pueden reducirse al mínimo si se aplican las más elementales normas de seguridad y prevención de los mismos, las cuales deberá conocer el personal a través de programas de adiestramiento.

En los siguientes apartados se hace hincapié en algunas medidas de seguridad y procedimientos adecuados para aplicar en caso de accidentes, así como en algunas normas para elevar la calidad en el trabajo de laboratorio.

RIESGOS BIOLÓGICOS

La manipulación de hongos generalmente representa un riesgo de grado variable para el personal del laboratorio de micología. Como en los laboratorios de bacteriología, parasitología y virología, existen organismos de alta patogenicidad que deben ser manipulados con cuidados extremos para eliminar toda posibilidad de infecciones.

A pesar de que la mayoría de los hongos causantes de alguna micosis representa un riesgo para el hombre, solamente *C. immitis*, *P. brasiliensis*, *H. capsulatum*, *B. dermatitidis* y *Cladophialophora bantiana* se consideran altamente patógenos, por lo que deben manipularse extremando los cuidados y utilizando campanas de seguridad bioló-

gicas con aire filtrado y autoclave o incinerador (cuadro 12.1).

Los hongos se clasifican en tres grupos de acuerdo con la capacidad que tienen de causar enfermedad.

Grupo 1. Hongos de los que no se han reportado, hasta el momento, casos de enfermedad alérgica, tóxica o invasiva.

Grupo 2. Agente biológico que puede causar una enfermedad en el hombre y suponer un peligro para los trabajadores, siendo poco probable que se propague a la colectividad y existiendo generalmente profilaxia y tratamiento eficaz.

Grupo 3. Agente biológico que puede causar una enfermedad en el hombre y suponer un peligro para los trabajadores, con riesgo de que se propague a la colectividad y existiendo generalmente profilaxia y tratamiento eficaz. **A:** posibles efectos alérgicos. Datos obtenidos y mínimamente modificados de la Normativa Española descrita en el Real Decreto 664/1997.

El resto de los hongos puede ser manipulado con campanas de seguridad biológica de flujo laminar. Si no se dispone de este equipo, se debe desinfectar la mesa de trabajo, evitar las corrientes brusas de aire y utilizar dos mecheros. Los tubos de cultivo con desarrollo de colonias se incuban a 26 °C, y se anota la fecha de la siembra sin manipularlos en exceso hasta la fecha de lectura.

Cuadro 12.1. Clasificación de los hongos de acuerdo con el grupo de riesgo.

	Clasificación	Observaciones
<i>Aspergillus fumigatus</i>	2	A
<i>Blastomyces dermatitidis</i> (<i>Ajellomyces dermatitidis</i>)	3	
<i>Candida albicans</i>	2	A
<i>Candida tropicalis</i>	2	
<i>Cladophialophora bantiana</i> (antes <i>Xylohypha bantiana</i> , <i>Cladosporium bantianum</i> o <i>trichoides</i>)	3	
<i>Coccidioides immitis</i>	3	A
<i>Cryptococcus neoformans</i> (<i>Filobasidiella neoformans</i>)	2	A
<i>Cryptococcus gattii</i> (<i>Filobasidiella bacillispora</i>)	2	A
<i>Emmonsia parva</i> var. <i>parva</i>	2	
<i>Emmonsia parva</i> var. <i>crecens</i>	2	
<i>Epidermophyton floccosum</i>	2	A
<i>Fonsecae compacta</i>	2	
<i>Fonsecae pedrosoi</i>	2	
<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i> (<i>Ajellomyces capsulatus</i>)	3	
<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>duboisii</i>	3	
<i>Madurella grisea</i>	2	
<i>Madurella mycetomatis</i>	2	
<i>Microsporum</i> spp	2	A
<i>Neotestudina rosatii</i>	2	
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	3	
<i>Penicillium marneffei</i>	2	A
<i>Scedosporium apiospermum</i> (<i>Pseudallescheria boydii</i>)	2	
<i>Scedosporium prolificans</i> (<i>inflatum</i>)	2	
<i>Sporothrix Schenckii</i>	2	
<i>Trichophyton rubrum</i>	2	
<i>Trichophyton</i> spp	2	

Los hongos de alta patogenicidad se incuban en un lugar diferente al del resto de los cultivos, de preferencia en áreas específicas para este fin, de tal manera que los cultivos puedan ser observados sin tener que manipular los tubos.

Al terminar de sembrar las muestras biológicas o resembrar estos hongos, se desinfecta el área de trabajo con alcohol al 96 %, cloro diluido o con fenol al 5 %; actualmente existen sus-

tancias químicas en el mercado para desinfectar superficies.

El personal debe lavar sus manos con agua y jabón y evitar llevarlas a los ojos o a las mucosas. No debe trabajar con hongos, especialmente con los agentes de micosis subcutáneas, si se tienen heridas o escoriaciones en las manos.

Una vez que se desechan los cultivos, se esterilizan en autoclave a 121 °C durante 60 minutos o en el incinerador antes de lavar el material.

En caso de ruptura de tubos con hongos altamente patógenos, se recomienda avisar al resto del personal de laboratorio para que lo abandonen de inmediato. Posteriormente hay que humedecer una toalla con suficiente agua para depositarla sobre el material roto y los fragmentos de cultivo; se recoge el material, se repite el mismo procedimiento con una nueva toalla humedecida hasta dejar completamente limpia la superficie y luego se desinfecta con fenol al 5 %.

Todo el material contaminado debe esterilizarse.

Las personas que han sido expuestas a estos accidentes deben ser vigiladas clínicamente durante varias semanas para detectar cualquier sintomatología atribuible a alguna micosis. Se les practicarán reacciones serológicas y pruebas intradérmicas para vigilar seroconversiones o cutirreacciones positivas.

Uno de los problemas más frecuentes en los laboratorios de micología médica es la contaminación de cultivos y materiales por los llamados hongos contaminantes, por lo que la limpieza constante y adecuada de todas las áreas del laboratorio debe ser prioritaria.

Al mismo tiempo, son importantes las siguientes medidas que se deben cumplir estrictamente en el interior del laboratorio:

- No comer ni beber.
- No fumar.
- No tener plantas naturales.
- Llevar ropa de trabajo limpia.
- Evitar corrientes de aire.
- No permitir la entrada a visitas o personas extrañas al laboratorio.

RIESGOS DE EQUIPO Y MATERIAL

Para evitar los accidentes, incendios, quemaduras o inhalación de productos tóxicos, deben ser observadas las medidas de seguridad que a continuación se mencionan:

1. No usar ropa de vestir ni de trabajo hecha con materiales 100 % sintéticos.

2. Hacer revisión y mantenimiento periódico del equipo electromecánico, como motores, centrifugas, agitadores, etcétera.

3. Tener fuera del laboratorio un área de almacén de reactivos, medios de cultivo y materiales diversos, almacenando los frascos de alcohol, ácidos y álcalis sobre tarimas de madera en el suelo.

4. Manipular los productos químicos, como cáusticos, corrosivos, inflamables o venenos, con guantes resistentes, de preferencia de asbesto.

5. Depositar las basuras en recipientes cerrados, separando los materiales no contaminados de los contaminados y depositar estos últimos en recipientes de preferencia metálicos para esterilizarlos antes de lavarse o desecharse. Este rubro es particularmente importante para los desechos de biología molecular.

6. Disponer de una regadera de presión cercana para los casos de quemaduras por ácidos o álcalis.

7. Usar pipetas automáticas.

8. Tener disponibles guantes, cubrebocas y protectores de cara para manejar inhalantes tóxicos o corrosivos.

9. Tener dentro del laboratorio un extinguidor para fuego producido por madera o papel y otro para fuego eléctrico o de fluidos, como alcohol o benceno.

10. Disponer de una manta automática para cubrir totalmente a la persona en caso de quemaduras.

11. Tener un botiquín de primeros auxilios, que además contenga soluciones neutralizantes de ácidos y álcalis, como bicarbonato de sodio al 5 % y ácido bórico al 3 %, respectivamente. Éstos deben ser aplicados sobre las mucosas o la piel afectada, previo lavado con abundante agua.

12. Extremar las precauciones de almacenamiento y manejo de tanques de gas, poniéndolos en lugares bien ventilados y no accionando sin necesidad las válvulas; y probar éstas con jabonadura periódicamente.

13. Los lugares de circulación del personal en el laboratorio deben ser del tipo de los corredores sin fin, para no quedar atrapados en caso de accidentes. Se debe disponer de salidas de emergencia.

14. Los animales de experimentación no deben permanecer en los laboratorios; para ello es conveniente disponer de bioterios y salas de manejo de animales, que guarden todas las normas sanitarias y garanticen la buena marcha de los experimentos.

15. Tener en un lugar visible los teléfonos de emergencia, como el de bomberos, talleres de mantenimiento y cuerpo de gobierno de la institución.

MANEJO DE LAS MUESTRAS DE ALTO RIESGO

Se consideran muestras de alto riesgo aquellas que proceden de pacientes con diagnóstico comprobado de hepatitis viral tipo B o de otras enfermedades infectocontagiosas, como la tuberculosis.

Sin embargo, actualmente las muestras que más cuidados necesitan para su manipulación son las de pacientes con sida. A continuación se mencionan las principales medidas recomendadas por la OMS y por el Center for Diseases Control (CDC) para la prevención de infecciones accidentales en el personal de laboratorio:

1. Lavarse las manos antes y después del contacto con los pacientes.

2. No reutilizar las jeringas y agujas después de sangrar o punccionar a los pacientes.

3. Desechar jeringas, agujas, recipientes, frascos, gasas y todos los utensilios empleados en la toma y manejo de las muestras, envolviéndolos en papel resistente y cerrando perfectamente el paquete con cinta adhesiva antes de esterilizarlo o incinerarlo.

4. Usar guantes desechables, cubrebocas y bata cerrada.

5. Utilizar gafas o mascarillas si hay riesgo de salpicaduras o contacto con algún aerosol de los pacientes.

6. Hacer un pipeteo mecánico de los fluidos patológicos.

7. Desinfectar el lugar de trabajo donde se procesan las muestras con hipoclorito de sodio al 0.5 %, formol al 20 % o con fenol al 5 %, antes y después de usarlo.

8. Manejar las muestras y el material empleado con movimientos lentos y seguros para evitar tirarlos y ocasionar punciones accidentales o cortaduras. En caso de producirse heridas, éstas deberán lavarse enérgicamente con agua y jabón antiséptico y vigilar al accidentado con reacciones serológicas periódicas. Téngase en cuenta que el riesgo de infección en las personas que sufren una inoculación accidental es muy bajo, inferior al 1 %.

9. Muchos autores no recomiendan etiquetar en forma especial las muestras de pacientes con

sida, en vista de que todas las muestras patológicas deben ser manejadas con extremo cuidado; sin embargo, la falta de esta etiqueta podría causar una falsa confianza en el manejo de las muestras.

CONTROL DE CALIDAD

Los programas de control de calidad no deben dejarse al margen si se pretende desempeñar un trabajo de laboratorio de alta calidad. Estas medidas se fijan de acuerdo con el nivel de cada laboratorio, sus funciones y sus programas, pero ninguno de éstos debe dejar de contemplar la vigencia de calidad en el renglón de materiales, cultivos, reactivos, colorantes, equipo y técnicas empleadas.

El encargado de llevar el seguimiento del control de calidad debe registrarlo en la computadora, o bien, en un libro de anotaciones ex profeso, con todos los datos concernientes a los programas de control de calidad.

MATERIALES

Los materiales como papel, algodón, vidriería, jeringas, etc., deberán adquirirse de una calidad aceptable. Conviene observar las instrucciones de uso y conservación y no reutilizar el material desechable.

Hay que almacenar el material en lugares limpios y secos y desechar el material de vidriería cuando haya roturas, para evitar accidentes. Una vez envuelto y esterilizado el material, deberá almacenarse en lugares limpios y cerrados y no usarlo después de dos meses de almacenamiento.

CULTIVOS

Los medios de cultivo y los medios para las pruebas fisiológicas se deben almacenar en lugares frescos y secos y no usarlos después del límite de vigencia anotado en las etiquetas. Es necesario anotar los medios en una lista y marcar la fecha de su adquisición, lote y cantidad existente, así como seguir las instrucciones de preparación, esterilización y uso de los medios.

De un lote de medios preparados se separa una parte para hacer pruebas de esterilidad, dejando algunos durante tres días a temperatura ambiente y otros a 37 °C.

Es conveniente probar cada lote de medios para constatar su efectividad, inoculándolos con hongos para verificar un adecuado desarrollo, o bien, sometiendo los medios a pruebas fisiológicas con organismos conocidos para que den la reacción deseada.

REACTIVOS Y COLORANTES

Se recomienda no usarlos después de seis meses de su preparación y desecharlos si aparecen cambios de coloración, contaminación o precipitación. Sólo deben prepararse las cantidades de reactivos y colorantes que se estimen necesarias para ser utilizadas a corto tiempo. Hay que comprobar la calidad de los reactivos y colorantes en forma periódica haciendo frotis y diversos tipos de preparaciones microscópicas; una vez que se observe disminución de la calidad de estos materiales, deben desecharse de inmediato.

EQUIPO

Todo el equipo de laboratorio debe estar inventariado, anotando marca, modelo, número de serie, fecha de adquisición, proveedor y costo, así como el número de inventario de la institución. Asimismo, se deben tener disponibles el manual de operaciones de cada aparato, sus cuidados y fechas de mantenimiento.

Es necesario constatar periódicamente la temperatura de las incubadoras, refrigeradores y congeladoras. Las variaciones de un grado por encima o por debajo de la temperatura seleccionada son aceptables. Los baños de agua se deben preparar con agua destilada o desionizada y la temperatura no debe variar en más de 1 grado Celsius, por lo que deben ser revisados diariamente.

Las autoclave se deben probar cada vez que se usen, marcando los materiales por esterilizar con cinta testigo como prueba de esterilidad. Se requiere limpiar el interior de la autoclave cada semana, vigilando que el nivel de agua sea el indicado y que los empaques cierren perfectamente para que la presión y la temperatura alcancen los topes deseados.

Los hornos de calor seco deben contener un termómetro que indique la temperatura durante el proceso de esterilización; no conviene usar estos hornos para calentar otros materiales diferentes de los que van a esterilizarse.

En relación con las centrífugas, hay que vigilar que en éstas siempre funcione adecuadamente el tacómetro, que siempre estén niveladas y que las camisas se hallen en buen estado y limpias; debe asegurarse que el peso de los tubos con el material para centrifugar esté bien nivelado.

Los potenciómetros deben ser calibrados con soluciones buffer conocidas antes de usarlos. Los electrodos deben ser revisados y estar siempre sumergidos en soluciones buffer o agua destilada.

Es conveniente que los microscopios estén siempre limpios, tanto el sistema óptico como las partes fijas; asimismo, deberán quitarse las preparaciones inmediatamente después de observarlas, cuidando de no humedecer la platina con líquidos de montaje.

Una vez terminada la observación, se colocan cubiertas para protegerlo del polvo. El sistema óptico debe ser ajustado periódicamente y darle cada año mantenimiento de limpieza y engrasado.

A los espectrofotómetros, balanzas de presión y campanas de seguridad biológica se les darán los cuidados indicados en los instructivos y su funcionamiento debe ser revisado por un técnico experto, en el tiempo indicado en dichos instructivos.

TÉCNICAS DE LABORATORIO

Además de los manuales, libros de consulta y otras fuentes de información existentes en los laboratorios de micología médica, se debe disponer de un manual de técnicas y procedimientos de laboratorio para utilizarlo en forma rutinaria o eventual, conforme a la programación y actividades que desarrolla dicho laboratorio.

De acuerdo con la experiencia y recursos materiales, cada laboratorio debe elegir las técnicas que utilizará en forma rutinaria; no obstante, siempre se estará en condiciones de utilizar otras técnicas alternativas o de hacer modificaciones de éstas.

Se debe disponer de protocolos para las técnicas de aislamiento e identificación de los hongos que pertenecen a grupos muy similares, como las levaduras, los dermatofitos o los hongos de las micosis profundas. De esta manera, utilizando los mismos recursos, se pueden obtener todas las posibilidades de aislamiento de los hongos contenidos en estos grupos.

La actualización de las técnicas de laboratorio será un indicio de la eficacia y calidad del laboratorio de micología.

PRECAUCIONES QUE DEBE TENER EL PERSONAL DE LABORATORIO

1. Mientras se trabaja con material potencialmente infeccioso, se deberá usar bata o uniformes de laboratorio.

2. Se deberán usar guantes para evitar el contacto directo de la piel con sangre, especímenes que contengan sangre, objetos manchados de sangre, líquidos corporales, excreciones, secreciones, así como superficies, materiales y objetos expuestos a esos productos.

3. Lavarse las manos con los guantes puestos con hipoclorito de sodio al 5 % diluido en agua 1:10, cada media hora.

4. No se deberá comer o fumar en las áreas de trabajo.

5. Lavarse las manos después de quitarse la ropa protectora y antes de salir del laboratorio. Se dejará la bata en el sitio de trabajo y sólo se sacará para lavarla.

6. Después de cualquier derrame de material potencialmente infeccioso es preciso limpiar la superficie de trabajo de los laboratorios con hipoclorito de sodio al 0.05 %.

7. No abrir la centrífuga hasta que haya parado totalmente.

8. Limpiar la centrífuga con hipoclorito cada vez que se use.

9. No emplear la boca para succionar líquidos con cualquier clase de pipeta. Úsense pipetas automáticas y jeringas con tubo de hule para las pipetas de vidrio.

10. Tener un recipiente con hipoclorito para desecho, en el que se verterá el material utilizado. En el cuadro 12.1 se incluyen los hongos considerados patógenos, para los cuales deben tenerse los cuidados necesarios.

MEDIDAS PREVENTIVAS QUE DEBE VIGILAR EL JEFE DE SECCIÓN

- Informar al personal bajo sus órdenes de las medidas de protección que se deben emplear.
- Colocar la información con las medidas en un lugar visible.
- Firmar de enterado todo el personal a su cargo.
- Proporcionar todo el material necesario para cumplir con las medidas preventivas.

En relación con las centrífugas, hay que vigilar que en éstas siempre funcione adecuadamente el tacómetro, que siempre estén niveladas y que las camisas se hallen en buen estado y limpias; debe asegurarse que el peso de los tubos con el material para centrifugar esté bien nivelado.

Los potenciómetros deben ser calibrados con soluciones buffer conocidas antes de usarlos. Los electrodos deben ser revisados y estar siempre sumergidos en soluciones buffer o agua destilada.

Es conveniente que los microscopios estén siempre limpios, tanto el sistema óptico como las partes fijas; asimismo, deberán quitarse las preparaciones inmediatamente después de observarlas, cuidando de no humedecer la platina con líquidos de montaje.

Una vez terminada la observación, se colocan cubiertas para protegerlo del polvo. El sistema óptico debe ser ajustado periódicamente y darle cada año mantenimiento de limpieza y engrasado.

A los espectrofotómetros, balanzas de presión y campanas de seguridad biológica se les darán los cuidados indicados en los instructivos y su funcionamiento debe ser revisado por un técnico experto, en el tiempo indicado en dichos instructivos.

TÉCNICAS DE LABORATORIO

Además de los manuales, libros de consulta y otras fuentes de información existentes en los laboratorios de micología médica, se debe disponer de un manual de técnicas y procedimientos de laboratorio para utilizarlo en forma rutinaria o eventual, conforme a la programación y actividades que desarrolla dicho laboratorio.

De acuerdo con la experiencia y recursos materiales, cada laboratorio debe elegir las técnicas que utilizará en forma rutinaria; no obstante, siempre se estará en condiciones de utilizar otras técnicas alternativas o de hacer modificaciones de éstas.

Se debe disponer de protocolos para las técnicas de aislamiento e identificación de los hongos que pertenecen a grupos muy similares, como las levaduras, los dermatofitos o los hongos de las micosis profundas. De esta manera, utilizando los mismos recursos, se pueden obtener todas las posibilidades de aislamiento de los hongos contenidos en estos grupos.

La actualización de las técnicas de laboratorio será un indicio de la eficacia y calidad del laboratorio de micología.

PRECAUCIONES QUE DEBE TENER EL PERSONAL DE LABORATORIO

1. Mientras se trabaja con material potencialmente infeccioso, se deberá usar bata o uniformes de laboratorio.

2. Se deberán usar guantes para evitar el contacto directo de la piel con sangre, especímenes que contengan sangre, objetos manchados de sangre, líquidos corporales, excreciones, secreciones, así como superficies, materiales y objetos expuestos a esos productos.

3. Lavarse las manos con los guantes puestos con hipoclorito de sodio al 5 % diluido en agua 1:10, cada media hora.

4. No se deberá comer o fumar en las áreas de trabajo.

5. Lavarse las manos después de quitarse la ropa protectora y antes de salir del laboratorio. Se dejará la bata en el sitio de trabajo y sólo se sacará para lavarla.

6. Después de cualquier derrame de material potencialmente infeccioso es preciso limpiar la superficie de trabajo de los laboratorios con hipoclorito de sodio al 0.05 %.

7. No abrir la centrífuga hasta que haya parado totalmente.

8. Limpiar la centrífuga con hipoclorito cada vez que se use.

9. No emplear la boca para succionar líquidos con cualquier clase de pipeta. Úsense pipetas automáticas y jeringas con tubo de hule para las pipetas de vidrio.

10. Tener un recipiente con hipoclorito para desecho, en el que se verterá el material utilizado. En el cuadro 12.1 se incluyen los hongos considerados patógenos, para los cuales deben tenerse los cuidados necesarios.

MEDIDAS PREVENTIVAS QUE DEBE VIGILAR EL JEFE DE SECCIÓN

- Informar al personal bajo sus órdenes de las medidas de protección que se deben emplear.
- Colocar la información con las medidas en un lugar visible.
- Firmar de enterado todo el personal a su cargo.
- Proporcionar todo el material necesario para cumplir con las medidas preventivas.

MEDIDAS PREVENTIVAS QUE OBSERVARÁ LA COORDINACIÓN DE TOMA DE PRODUCTOS

1. Proporcionar el número de guantes y cubrebocas que necesita el personal cada semana y llevar el control de consumo de este material diariamente.

2. Todas las agujas, jeringas y demás material desechable que puedan estar contaminados y que se empleen en pruebas de laboratorio deberán esterilizarse preferiblemente en autoclaves antes de eliminarlas.

3. Cuando se tomen muestras a pacientes aislados, se deberán usar bata y cubreboca.

BIBLIOGRAFÍA

- Barriga, A. G., Ortiz, R. F., Saldaña, J. D. y cols., "Exposición ocupacional al virus de la inmunodeficiencia humana", *Rev. Méd. IMSS, México*, 27:379, 1989.
- Center for Disease Control, "Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS): Precautions for Health Care Workers Allied Professionals", *MMWR*, 32:450, 1983.
- , "Laboratory safety at the Center for Disease Control", *DHEW*, publicación número CDC 77-8118, CDC Atlanta, Georgia, EUA, 1977.
- Conasida, Secretaría de Salud, México, *El laboratorista frente al sida*, Pangea Editores, México, 1989, 56 págs.
- Guzmán Urrego, M., Ibagón, H. y Bernal Rivera M., *Sida. Un desafío sin precedente (II). Precauciones y recomendaciones para personal con riesgo accidental*, Instituto Nacional de Salud, Ministerio de Salud, Colombia, 1988, 16 págs.
- Haley, L. D. y Callaway, C. S., *Laboratory Methods in Medical Mycology*, Center for Disease Control, HEW Publication, 78:8361, Atlanta, Georgia, EUA, 1978.
- McGinnis, M. R., *Laboratory Handbook of Medical Mycology*, Academic Press, Londres, 1980, pág. 57.

Glosario

Acérvulo. Grupo de hifas estrechamente unidas que producen conidióforos cortos perfectamente empaquetados.

Ácido-resistencia. Propiedad tintorial de una pared celular que retiene los colorantes básicos aun con tratamiento ácido.

Acrópeta. Producido hacia el ápex; con referencia a la cadena de conidios, el conidio más joven está en la punta y el más viejo en la base.

Actinomiceto. Bacteria filamentosa del orden causante de la seudomicosis.

ADN. Ácido desoxirribonucleico.

Aeróbico. Que crece en presencia de oxígeno molecular.

Aleuroconidio. Conidio que se desarrolla a medida que se expande un extremo de una célula conidiógena o rama. Es liberado por lisis o fractura de la célula de sostén.

Anaeróbico. Que crece en ausencia de oxígeno molecular.

Anamórfico. Estado asexual del ciclo de vida de los hongos.

Anélide. Célula conidiógena que produce conidios blásticos, dejando una cicatriz semejante a un anillo en la pared de la boca de la fiálida.

Aneloconidio. Conidio que al desprenderse de la anélide deja una cicatriz en forma de anillo.

Anteridio. Gameto masculino.

Anticuerpo. Inmunoglobulina que interactúa solamente con el antígeno que indujo su formación.

Antígeno. Cualquier sustancia capaz de inducir una respuesta inmunológica celular o humoral.

Antropofílico. Hongo cuyo hábitat natural es el hombre.

Apófisis. Hinchamiento. El término se aplica básicamente a la parte abultada de un esporangióforo inmediatamente por debajo de la columela.

Apotecio. Ascocarpo, abierto, plano o en forma de copa. Las ascas están en un himenio.

ARN. Ácido ribonucleico.

Artroconidio. Conidio tállico producido por fragmentación de la hifa y que se libera por un proceso de lisis.

Asca. Estructura en forma de saco que contiene ascoporas que se forman como resultado de cariogamia y meiosis.

Ascocarpo. Cuerpo fructífero complejo que contiene ascas.

Ascogonio. Gameto femenino producido por un Ascomycete.

Ascomycetes. Grupo de hongos que se reproduce por medio de ascoporas.

Ascomycota. Categoría taxonómica (phylum) de los hongos en la cual la reproducción es de tipo sexual formándose ascas con ascoporas.

Ascospora. Espora haploide producida generalmente dentro de una asca.

Aseptado. Referente al filamento fúngico, que carece de septos. //Sinónimo de cenocítico.

Aspergiloma. Masa fúngica formada por filamentos de *Aspergillus* spp, que se desarrolla en cavidades preexistentes.

Autótrofo. Organismo capaz de sintetizar los hidratos de carbono a partir de anhídrido carbónico, de manera que no necesita tomarlos ya constituidos.

Auxanograma. Método para determinar la capacidad de los microorganismos de utilizar diversas fuentes de carbono o nitrógeno para su crecimiento.

Auxótrofo. Hongo que para su desarrollo en un medio requiere sustancias específicas.

Balistoconidio. Conidio que se descarga a presión.

Basáuxica. Célula conidiógena que sufre un aumento de longitud después de cada conidiación.

Basidio. Estructura a partir de la cual se forman las basidiosporas como resultado de la cariogamia y meiosis; los basidios son característicos de los Basidiomycetes.

Basidiocarpo (carpóforo). Cuerpo fructífero de los Basidiomycetes que contiene a los basidios y basidiospora.

Basidiomycota. Categoría taxonómica (phylum) de los hongos en la cual la reproducción es de tipo sexual, formándose basidios con basidiosporas.

Basidiospora. Espora haploide producida sobre el basidio después de la plasmogamia y cariogamia.

Basípeta. Producida en la base; se refiere a una cadena de conidios en donde el conidio más joven se localiza en la base.

Biseriada. Término que se aplica a una cabeza aspergilar y en la cual las filídes se originan de profilídes (métulas).

Biverticilado. Con referencia al género *Penicillium*, con dos o, raramente, tres niveles de ramificaciones directamente debajo de la filíde.

Blastoconidio. Conidio holoblástico que se produce en forma solitaria, sincronógena o en cadenas.

Botriosa. Forma de reproducción en la que se generan sincrónicamente varios conidios en la superficie de una célula conidiógena.

Cabeza aspergilar. Estructura formada por vesícula, filídes, filioconidios y métulas característicos del género *Aspergillus*.

Candelero fávico. Hifas ramificadas e hinchadas en los extremos, que se observan principalmente en *Trichophyton schoenleinii*.

Candidina. Antígeno utilizado para demostrar hipersensibilidad celular cutánea a *Candida*.

Cápsula. Envoltura hialina y gelatinosa que rodea a una célula, formada generalmente por mucopolisacáridos.

Catenulada. Forma de conidiación en la cual se constituyen cadenas de conidios.

Cebador (Inclador, "primer"). Secuencias cortas que son complementarias a cada una de las dos hebras del ADN.

Célula basal. En el género *Aspergillus*, célula de donde emerge el conidióforo, dando la impresión de un pie. La base del filioconidio en *Fusarium* también se considera célula basal.

Célula conidiógena. Célula que produce conidios.

Células fumagoides. Células dematiáceas, redondas, de pared gruesa, en ocasiones septadas. Estas células son diagnósticas de la cromblastomicosis. // Sinónimo de célula esclerótica, célula muriforme y esclerote de Medlar.

Circinada. En forma de círculo o de anillo.

Clamidoconidio (clamidospora). Estructura de origen asexual que se forma bajo condiciones de estrés, redonda y de pared gruesa.

Cleistotecio. Ascocarpo cerrado, generalmente con las ascas dispuestas en forma irregular en el interior.

Coccidioidina. Antígeno usado para detectar hipersensibilidad celular cutánea a *Coccidioides* spp.

Collarete. Collar formado por restos de paredes celulares en el extremo distal de las filídes durante la conidiogénesis.

Columela. Estructura en forma de domo, estéril, localizada en el extremo distal del esporangio.

Conidio. Propágulo originado por un proceso de reproducción asexual.

Conidióforo. Hifa especializada sobre la cual se originan directa o indirectamente los conidios.

Coremio. Conjunto de conidióforos dispuestos en forma paralela.

Cuerpo asteroide. Estructura formada por una levadura, rodeada de una reacción eosinofílica que le confiere un aspecto estrellado en los estudios histopatológicos y que se presenta en la esporotricosis.

Cuerpo en cigarro. Célula levaduriforme alargada, intratisular, que corresponde a la fase parasitaria de *Sporothrix* spp.

Dematiáceo. Hongo provisto de pigmento marrón oscuro o negro, de la familia Dematiaceae.

Dermatófito. Hongo queratinofílico que pertenece a uno de los géneros siguientes: *Trichophyton*, *Microsporum* o *Epidermophyton*.

Determinado. Célula conidiógena que no sufre modificación en su tamaño durante la conidiogénesis.

Deuteromycota. Denominación que se daba al grupo taxonómico de hongos, de los cuales no se conoce reproducción sexual. Actualmente se les denomina hongos mitospóricos.

Dictioconidio. Conidio con septos transversales y longitudinales.

Dimorfismo. Propiedad que tienen algunos hongos patógenos de presentar una morfología en vida libre y otra diferente, en la fase parasitaria.

Diploide. Que tiene un número doble de cromosomas (2n).

Ecotono. Sitio de unión de dos ecosistemas. Por ejemplo, México y Centroamérica son el ecotono que une los ecosistemas de América del Norte y América del Sur.

Ectotrix. Tipo de parasitación dermatofítica en la que las esporas forman una cubierta en la parte externa del pelo.

Endoectotrix. Infección del pelo en la cual las esporas y filamentos de dermatofitos se encuentran tanto dentro como fuera del pelo.

Endospora. Espora producida en el interior de una esférula o de un esporangio.

Endotrix. Tipo de parasitación dermatofítica en la cual las esporas se encuentran en el interior del pelo.

Enteroártrico. Conidio que se produce por fragmentación de la hifa en la cual sólo participa la pared interna y su separación se lleva a cabo por un proceso de rexólisis. Ej. *Coccidioides* spp.

Enteroblástico. Conidio producido por un proceso blástico en el que sólo participa la pared interna del hongo.

Equinulado. Que posee equínulas o pequeñas espinas.

Esclerocio. Masa densa de hifas o pseudoparénquima que forma una unidad reproductora.

Esclerote de Medlar. Ver Células fumagoides.

Esférula. Estructura de pared gruesa semejante a un es-

porangio que contiene endosporas que se producen por fragmentación citoplásmica. // Forma parasitaria de *Coccidioides* spp.

Esferulina. Antígeno preparado a partir de esférulas de *Coccidioides* spp. Se utiliza para detectar hipersensibilidad celular cutánea.

Espora. Estructura de reproducción en los hongos.

Esporangio. Estructura generalmente vesiculosa que contiene a las esporangiosporas.

Esporangióforo. Hifa especializada portadora de un esporangio.

Esporangiospora. Espora asexual que se produce dentro de un esporangio.

Esporodocio. Estructura en forma de cojinete que da origen a conidióforos y conidios.

Esporotricina. Antígeno utilizado para detectar hipersensibilidad celular cutánea a *Sporothrix* spp.

Esquizolisis. Proceso enzimático por el cual un conidio se separa de otro o de una célula conidiógena por una disolución del septo que los une.

Estado imperfecto. Condición de los hongos que presentan reproducción asexual (anamorfismo).

Estado perfecto. Condición de los hongos que presentan reproducción sexual (teleomorfismo).

Etenoxeno. Hongo de distribución geográfica limitada. Por ejemplo, la distribución de *Coccidioides immitis*.

Esterigma. Punto de estrechamiento que origina una basidiospora sobre un basidio.

Estolón. Hifa horizontal al sustrato, presente en los mucorales, que comunica a dos esporangióforos y de la cual pueden originarse los rizoides.

Eurixeno. Hongo con distribución amplia en la naturaleza. Por ejemplo, el género *Aspergillus* se encuentra en todo el mundo.

Fermentación. Capacidad de algunos hongos de utilizar diversos azúcares como fuente de energía con producción de ácido y gas.

Fiálide. Estructura conidiógena generalmente en forma de botella en la cual se producen los conidios en forma basípeta; el primer conidio es holoblástico y los siguientes son enteroblásticos.

Fialoconidio. Conidio producido en una fiálide.

Fisión. Reproducción asexual en la cual un cuerpo se divide en dos o más segmentos por formación de tabiques.

Fungi imperfecti. Véase *Deuteromycota*.

Gemación. Forma de multiplicación de las levaduras en la que la célula hija se desarrolla a partir de un brote (gema o yema) de la célula madre.

Geofílico. Hongo cuyo hábitat natural es el suelo.

Gimnotecio. Ascocarpo en el cual las hifas peridiales presentan gran desorganización y las ascas están distribuidas de manera irregular; generalmente es redondo, no ostiolado.

Godetes fávicos. Depresiones observadas en la piel cabelluda producidas por la infección con *T. schoenleinii*.

Grano. Estructura compacta formada por la agregación de bacterias del orden Actinomycetales (actinomicótico) o de filamentos fúngicos (eumicótico).

Hábitat. Lugar natural donde vive y crece un organismo.

Heterotálico. Organismos con órganos sexuales masculinos y femeninos segregados en talos distintos, de modo que se requieren dos talos para que ocurra la reproducción sexual.

Hifa. Elemento tubular que representa la unidad estructural de la mayoría de los hongos.

Histoplasmina. Antígeno utilizado para detectar hipersensibilidad celular cutánea a *H. capsulatum* var. *capsulatum*.

Holoártrica. Reproducción asexual por artroconidios que involucra a todas las capas de la pared celular y donde la fragmentación se lleva a cabo por un proceso de esquizolisis.

Holoblástica. Reproducción asexual por blastoconidios que involucra las dos capas de la pared fúngica a través de un proceso blástico.

Holotálica. Tipo de conidiación en la que los conidios se originan a partir de las dos capas de la célula conidiógena a través de un proceso tálico.

Homotálico. Talo fúngico que no necesita otro talo compatible para llevar a cabo la reproducción sexual.

Hongo. Organismo eucariote, perteneciente al reino Fungi.

Ide. Manifestación cutánea a distancia de hipersensibilidad a los productos fúngicos liberados durante una infección.

Imbricata. Con referencia a un tipo de tiña, que presenta un patrón regular de descamación concéntrica.

Intertriginosa. Lesión que se presenta en los pliegues de la piel.

Levadura. Hongo unicelular redondeado u ovoide que se reproduce por gemación.

Levaduriforme. Célula fúngica que tiene forma de levadura.

Locus. Posición fija sobre un cromosoma como la posición de un gen.

Luz de Wood. Luz ultravioleta con una longitud de onda de 365 nm, filtrada a través de cobalto o níquel y que hace fluorescer a ciertos hongos y bacterias que afectan piel y pelos.

Macroconidio. Conidio que comparativamente es mayor que otro. Se estima que presenta un tamaño mayor de 8 µm.

Megaspórica. Término empleado por Sabouraud para describir la tiña de la cabeza de tipo ectotrix en donde se observan grandes esporas en la superficie del pelo.

Merosporangio. Esporangio cilíndrico que contiene esporangiosporas alineadas.

Mesomycetozooario. Organismo que comparte características filogenéticas de hongos y de animales.

Métula. Rama del conidióforo que origina fiálides u otras células conidiógenas.

Micelio. Conjunto de hifas que constituye el cuerpo vegetativo (talo) de un hongo.

Micelio aéreo. Micelio que se desarrolla sobre el sustrato y en el cual se encuentran las estructuras reproductoras.

Micelio cenocítico. Micelio cuyas hifas no presentan septos (micelio continuo) y en el que los núcleos y demás organelos circulan libremente.

Micelio estéril. Micelio que no forma estructuras especializadas de reproducción.

Micelio septado. Micelio en el cual las hifas presentan tabicaciones dispuestas en forma más o menos regular; cada tabicación presenta uno o varios poros que permiten la comunicación citoplasmática intercelular.

Micelio vegetativo. Conjunto de hifas en contacto estrecho con el sustrato cuya función principal es nutricia.

Micetismo. Intoxicación causada por la ingestión de algunos macromicetos.

Micotoxina. Sustancia metabólica tóxica producida por algunas especies de hongos, que se deposita en el sustrato y es capaz de causar intoxicación por ingestión de dicho sustrato.

Microconidio. Conidio que comparativamente es menor que otro. Se estima que presenta un tamaño menor de 5 μm . // Conidio de un tamaño menor de 3 micras, generalmente unicelular.

Microide. Término usado por Sabouraud para referirse a las esporas pequeñas en la invasión ectotrix del pelo.

Microspórica. Tipo de parasitación en el pelo en que se observan pequeños y abundantes conidios.

Mohos. Hongos filamentosos de aspecto algodonoso que en general se desarrollan como saprobios.

Mosalco fúngico. Artefacto refringente formado por la precipitación del hidróxido de potasio y que simula filamentos fúngicos.

Muriforme. Estructura redondeada u ovalada formada por múltiples células divididas por tabiques longitudinales o transversales. Dícese de las estructuras parasitarias de los agentes de la cromoblastomicosis.

Oportunista. Microorganismo que habitualmente no causa enfermedad, pero que al producirse algún fenómeno de inmunodepresión o factores físico-locales en el hospedero puede causar infección.

Órgano perforante. Estructura cónica producida in vitro dentro del pelo por algunos dermatofitos u otros hongos queratinofílicos.

PCR. Reacción en cadena de la polimerasa.

Penicilado. En forma de pincel, como los conidióforos del género *Penicillium*.

Peritecio. Ascomarpo provisto de un ostiolo, generalmente en forma de botella y que contiene ascas con ascosporas.

Picnidio. Estructura asexual redonda o piriforme en cuyo interior generalmente se forman esporas asexuales.

Pleomórfico. Que tiene más de un estado esporógeno.

Poro septal. Orificio presente en los septos de los hongos filamentosos y que constituye un medio de comunicación intercelular.

Poroconidio. Conidio holoblástico que se produce a través de un pequeño poro o canal en la pared celular de un conidióforo o célula conidiógena.

Queratinofílico. Hongo que degrada la queratina.

Querión. Forma inflamatoria de la tiña en la piel cabelluda que involucra el folículo piloso.

Rexólisis. Proceso por el cual un conidio se separa de otro conidio o de la célula conidiógena por la desintegración de la célula adyacente.

Rizoide. Hifa fina adelgazada en su extremo distal, a menudo ramificada y parecida a la raíz de un vegetal que sirve para fijar el talo al sustrato y absorber los nutrientes.

Saprobio. Organismo heterótrofo que se nutre de materia orgánica muerta.

Septo. Elemento formado en la pared de la hifa, limitando una articulación, pero permitiendo la circulación citoplasmática entre las células por uno o varios poros.

Seudohifa. Estructura filamentosa resultante del desarrollo de blastoconidios que permanecen unidos por sus extremos, aunque la separación entre cada célula es completa y no existe comunicación citoplasmática.

Seudomicelio. Conjunto de pseudohifas.

Simpoduloconidio. Conidio producido por una célula conidiógena, la cual continúa en crecimiento simpodial después de que se origina cada conidio.

Sinema. Ver *Coremio*.

Splendore-Hoepli. Reacción eosinofílica en torno de las paredes de ciertos hongos o estructuras a cuerpo extraño como producto de una reacción antigénica anticuerpo en el tejido.

Tálco. Tipo de conidiación en el cual el conidio se integra por transformación de la célula conidiógena, previa formación de un septo.

Templado. Secuencia de ADN que sirve como molde para la síntesis de un fragmento complementario de ADN.

Tubo germinal. Primordio hifal a partir de un conidio o una levadura.

Uniseriada. Cabeza aspergilar en la cual se observa que las filídes se originan directamente en la vesícula.

Verticilado. Ramificaciones hifales dispuestas alrededor de un eje y en un mismo nivel.

Zigospóra. Espora que resulta de la fusión de dos gametangios compatibles. // Característica de los Zygomycetes.

Zoofílico. Hongos cuyo hábitat natural son los animales.

Zygomycota. Categoría taxonómica (phylum) de los hongos en la cual la reproducción es de tipo sexual, formándose las zigosporas.

Índice analítico

- Ácido(s)
 nucleicos
 cuantificación de, por espectrofotometría, 172
 extracción de, 175
 homologías de, 14
 procedimientos para extracción,
 visualización y
 cuantificación de, 170-172
 extracción de ADN y de ARN,
 170-171
 gel desnaturante para ARN,
 172
 preparación de muestras de
 ARN, 172
 soluciones de trabajo para
 aislamiento de ADN, 171
 buffer de lisis, 171-172
 peróxido de Schiff, 148
- Actinomicetales, pruebas de laboratorio
 para clasificación
 taxonómica de, 59c
- Actinomicetoma, características de los
 agentes de, 61c
- Actinomicosis, pseudomicosis
 subcutánea por, 129-131
 abdominal y pélvica, 130
 características fisiológicas y
 bioquímicas de los agentes
 causales de, 131c
- cervicofacial, 130
- diagnóstico de laboratorio, 130-131
 cultivo, 130
 examen directo, 130
 frotis, 130
 histopatología, 131
 pruebas especiales, 131
- especímenes biológicos, 130
- pulmonar, 130
- Actinomycetales, 22
- Aglutinación en látex, prueba de, 79, 97
- Ajello, L., 121
- Amortiguador de fosfatos, 152
- Anamorfismo, 13
- Animalia, 13
- Antifúngicos solubles, 184-186
- Archeabacteria, 13
- Ascomycota, 14, 16
- Ascosporas, 16
- Aspergilosis, 105-110
 aspergilomas, 106
 diagnóstico de laboratorio, 107-110
 cultivo, 107-108
 examen directo, 107
 histopatología, 108
 pruebas inmunológicas, 108
 especímenes biológicos, 106
 manifestaciones sistémicas, 106
 onicomicosis, 105
 otomicosis, 105
 pulmonar
 invasiva, 106
 necrosante crónica, 106
 sinusitis, 106
- Auxanograma, 100
 medios para, 166
 del carbono en placa, 166
 discos de azúcares, 166
 preparación de levaduras para,
 165-166
- Azul
 de Alcian para *Cryptococcus*, 148
 de algodón
 examen directo con, 145-146
 preparación del, 144
- Basidiobolomicosis (zigomicosis o
 ficomicosis subcutánea),
 23, 73-74
 diagnóstico de laboratorio, 74
- cultivo, 74
- especímenes biológicos, 74
- examen directo, 74
- histopatología, 74
- Basidiomycota, 14, 16
- Basidiosporas, 16
- Bert, D., 59c
- Biología molecular, 175
- Biopsias diversas, 30
- Blastoconidios, 16
- Blastomicosis, 87-89
 cutánea, 87
 diagnóstico de laboratorio, 88-89
 cultivo, 88
 examen directo, 88
 frotis, 88
 histopatología, 89
 pruebas inmunológicas, 88
 doble inmunodifusión, 88
 intradermorreacción, 88
 reacción de fijación de
 complemento, 88
 técnica de ELISA, 88
 especímenes biológicos, 88
 generalizada, 87-88
 pulmonar, 87
- Candidosis, 24, 91-98
 cutánea, 92
 de membranas mucosas, 93
 diagnóstico de laboratorio, 93-98
 examen directo, 93
 frotis, 93-94
 histopatología, 97
 inoculación en animales, 97-98
 pruebas
 inmunológicas, 96-97
 contrainmunolectroforesis,
 97
 doble inmunodifusión, 97

ELISA, 97
 inmunofluorescencia
 indirecta, 97
 intradermoreacción, 97
 reacción de aglutinación en látex, 97
 para identificación de especies, 94
 auxanograma, 96
 filamentación en suero humano, 94-95
 producción de clamidoconidios, 94
 zimograma, 96
 especímenes biológicos, 93
 gastroesofágica, 93
 intertriginosa, 24
 intestinal, 93
 oncomicosis, 92-93
 pulmonar, 93
 sistémica, 93
 ungueal, 24
 urinaria, 93
 Células conidiógenas, 17
 Chromista, 13
 Chytridiomycota, 14
 Cigsporas, 16
 Coccidioidomycosis, 23, 80-84
 diagnóstico de laboratorio, 81-84
 búsqueda de exoantígenos, 84
 cultivo, 81-82
 examen directo, 81
 histopatología, 83
 inoculación en animales, 83-84
 pruebas inmunológicas, 82
 intradermoreacción, 82-83
 reacción de inmunodifusión, 82
 especímenes biológicos, 81
 Colodión, preparación del, 150
 Complicación morfológica, 24
 Comportamiento fisiológico, 21
 Conidiobolomycosis, 71-73
 diagnóstico de laboratorio, 72-73
 cultivo, 72
 examen directo, 72
 histopatología, 72-73
 especímenes biológicos, 72
 Conidio(s), 17-21
 blásticos, 18
 nomenclatura y categorías de los, 17c
 tálcos, 18f
 Corynebacterium, 22
 Crespo, E. V., 48c
 Criptococosis, 98-101
 diagnóstico de laboratorio, 98-101
 cultivo, 99-100
 examen directo, 98-99
 frotis, 99
 histopatología, 101
 inoculación en animales, 101
 pruebas
 especiales, 100
 auxanograma, 100

producción de ureasa, 100
 inmunológicas, 100-101
 inmunofluorescencia
 indirecta, 101
 ELISA, 101
 especímenes biológicos, 98
 Cromoblastomycosis, 23-24, 66-70
Cladophialophora carrionii, 68
 diagnóstico de laboratorio, 66-68
 cultivo, 67
 tipos filáide, rinocladia y cladosporio, 67
 examen directo, 66-67
 especímenes biológicos, 66
Fonsecaea compacta, 68, 70
pedrosoi, 68
Phialophora verrucosa, 68
 Cultivo(s), 38
 colección y conservación de, 166-170
 fijación y sellado de cultivos para demostración y enseñanza, 170
 recepción de nuevos aislamientos, 167
 recuperación de aparentemente no viables, 169-170
 liofilizados, 167
 registro de, 166
 técnicas
 de congelación, 168
 de conservación, 167
 en agua, 167-168
 permanente, 169
 de cubierta de aceite mineral estéril, 169
 de transferencia periódica y conservación en refrigeración, 168

Delgado, F. V., 48c
 Dermatitis seborreica
 cultivo, 49
 diagnóstico de laboratorio, 49
 especímenes biológicos, 49
 pruebas
 especiales, 50
 luz de Wood, 50
 inmunológicas, 50
 Dermatofitos, 22, 33, 35
 características generales de los, 39c
 cultivo de, 38
 medio de prueba para, 47
 Dermatofitosis, 33-34
 de la cabeza, 33-34
 de las uñas, 34
 de los pies, 34
 del cuerpo, 34
 granuloma dermatofítico, 34
 inguinal, 34
 tiña imbricata, 34
 Deuteromycota, 14

Dimorfismo, 24-25

Ecotoma, 23
 Envío de especímenes, 31
 Equipo para toma de muestras, 31
 Eriksson, O. E., 14
 Eritrasma, 127-128
 diagnóstico de laboratorio, 127-128
 cultivo, 128
 examen directo, 127-128
 frotis, 128
 pruebas especiales, 128
 especímenes biológicos, 127
 formas generalizadas, 127
 lesiones de áreas interdigitales y de grandes pliegues, 127
 Escamas, 37-38
 toma de muestras en, 29
 Especímenes
 conservación de, 27
 toma de, 27-31
 transporte de, 27
 Espectrofotometría, cuantificación de ácidos nucleicos por, 172
 Esporangios, 16
 Esporangiosporas, 16
 Esporas, 16
 Esporotricosis, 24, 63-66
 artritis, 63
 diagnóstico de laboratorio, 63-66
 cultivo, 63-64
 examen directo, 63
 frotis, 63
 histopatología, 65
 inoculación en animales, 65
 pruebas
 especiales, 64
 inmunológicas, 64-65
 especímenes biológicos, 63
 fija, 63
 hematogena, 63
 linfagítica, 63
 ósea, 63
 pulmonar primaria, 63
 Espudo, toma de, 30
 Estrógenos, 24
 Eubacteria, 13
 Eumicetoma, características de los agentes de, 62c
 Eumycota, reproducción en, 15
 Exudado de mucosas (cavidad bucal, vaginal, faríngea y nasal) y ótico, 30
 Feohifomycosis, 121-123
 características de los agentes más frecuentes de, 70c
 diagnóstico de laboratorio, 122-123
 cultivo, 122
Alternaria alternata, 123
Cladophialophora bantiana, 122-123
Exophiala dermatitidis, 123

Phialophora richardsiae, 123
examen directo, 122
histopatología, 123
diseminada, 122
especímenes biológicos, 122
formas clínicas, 122c
géneros y especies reportados como
causantes de, 122c
subcutánea, 122
superficial, 121-122
Fite, 147
Fungi, 13-14

Gheho, E., 48c
Giemsa, 147
González-Mendoza, 59c
Gram, 146
Granuloma dermatofítico, 34
Guillot, J., 48c

Hialohifomicosis, 113-121
Acremonium sp., 114
Blastoschizomyces capitatus, 114-115
Chrysomilia ssp (*Monilia*), 115
Chrysosporium spp., 115
Emmonsia (adasiptomycosis), 115-116
Fusarium, 116-117
Geotrichum, 117-118
Paecilomyces sp., 118
Penicillium, 118-119
Scedosporium apiospermum, 119-120
Scopulariopsis, 120
Trichoderma sp., 120-121
Verticillium sp., 121
Hidróxido de potasio, 143-144
y tinta azul (Parker), 146
Hifa(s), 15, 21
Histopatología, 47, 58, 60, 65, 71-74, 79-80, 83, 86-87, 89, 97, 101, 108, 123, 129, 131-132, 134
Histoplasmosis, 24, 77-80
búsqueda de exoantígenos, 80
diagnóstico de laboratorio, 78-79
cultivo, 78-79
examen directo, 78
impronta de tejidos y frotis, 78
especímenes biológicos, 77
inoculación en animales, 80
pruebas inmunológicas, 79-80
histopatología, 79-80
inmunodifusión, 79
intradermorreacción, 79
prueba de aglutinación en látex, 79
reacción de fijación de complemento, 79
Hongos
características de los, 13-24
clasificación clínica de la micosis, 21-22
comportamiento fisiológico, 21
morfología, 15
reproducción, 15-21

taxonomía, 13-15
clasificación de, según su capacidad de causar enfermedad, 193, 194c
conceptos fundamentales de micología médica, 24-25
contaminantes comunes de laboratorio, 135-142
Acremonium, 135
Alternaria, 135-136
Aureobasidium, 136
Chrysomilia (*Monilia*), 136
Chrysosporium, 136
Cladosporium, 136
Cunninghamella bertholletiae, 136
Curvularia, 137
Drechslera, 137
Epicoccum, 137
Fusarium, 137
Geotrichum, 138
Gliocladium, 138
Helminthosporium, 138
Mycocladus (*Absidia*) *corymbifera*, 138
Nigrospora, 138-139
Paecilomyces, 139
Penicillium, 139
Rhizomucor pusillus, *Rhizopus oryzae*, 139
Rhodotorula, 139
Saccharomyces, 139
Scopulariopsis, 140
Sepedonium sp., 140
Stemphylium, 140
Syncephalastrum, 140-141
Trichoderma, 141
Ulocladium, 141
filamentosos, 13
formas de reproducción sexual, 14
inhalación de, 23
mecanismos de infección, 22-24
diagnóstico, 24
procedimientos de, 25c
edad, sexo y ocupación, 23-24
frecuencia y distribución geográfica, 23
patógenos, 14
saprófitos, 22
Hormonas sexuales, 23

Infección
ectotrix y endotrix, 37
mecanismos de, 22-24
Inoculación en animales, 160c-161c, 173
Intradermorreacción, 47, 79

Kendrick, B., 13-14

Laboratorio(s)
hongos contaminantes comunes de, 135-142
medidas de seguridad, 193-198
accidentes de trabajo, 93

control de calidad, 196
cultivos, 196
equipo, 196-197
materiales, 196
reactivos y colorantes, 196
técnicas de laboratorio, 197
manejo de muestras de alto riesgo, 195-196
medidas preventivas, 197-198
riesgos
biológicos, 193-194
de equipo y material, 194-195
procedimientos de, 143
colección y conservación de cultivos, 166-170
cuantificación de ácidos nucleicos por espectrofotometría, 172
examen directo, 143
hidróxido de potasio, 143-144
inoculación en animales, 173
medios
de cultivo, 151-165
para auxanograma, 166
montaje y conservación de preparaciones húmedas, 144-145
observación microscópica de productos patológicos, 144
para extracción, visualización y cuantificación de ácidos nucleicos, 170-172
preparación
de levaduras para pruebas bioquímicas, 165-166
del azul de algodón, 144
técnica(s)
de microcultivo, 149-151
de montaje, 145
de tinción, 145-149
tradicional, 150
del emparedado, 150
método de Rivalier y Seydel, 150
tinción para microcultivos, 151
Lacaziosis (lobo), 71
diagnóstico de laboratorio, 71
cultivo, 71
examen directo, 71
histopatología, 71
especimen biológico, 71
Lámpara de luz de Wood, 46, 50
Lesourd, M., 48c
Levaduras, 13, 22
géneros de, 91c
método de microdilución en caldo para, 183-186
preparación de, para pruebas bioquímicas, 165-166
para auxanograma, 165-166
purificación de contaminantes bacterianos, 165
separación de mezclas de

- levaduras, 165
tinción de ascas y ascosporas de, 147
Líquido cefalorraquídeo, toma de, 30
- Macotela-Ruiz, E.*, 131
Maenza, J. R., 48c
Mahgoub, E. S., 62c
Malassezia, 22, 48
Mariat, F., 59, 73f
Material para toma de muestras, 31
Mayorga, R., 132
Medios de cultivo, 151-165
agar
aceite de oliva, 152
alfacel, 157
ascospora, 157
avena-jitomate, 157
Biggy, 159
Borelli, 156
canavanina-glicina-azul de bromotimol, 155
caseína, 162
cereal, 157
Czapek-Dox, 153-154
de Garrod, 154
dextrosa
Sabourad, 151
con antibióticos, 152
-leche-púrpura de bromocresol, 155-156
Dixon modificado, 152
extracto
de levadura, 156
de malta, 156
de suelo (agar tierra), 153
harina
de amaranto, 154
de arroz, 159
de maíz, 159
infusión-cerebro-corazón, 164
Níger (Staib-Seelinger), 154
papa
dextrosa, 153
-zanahoria-bilis, 162
Staib, 155
tioglicolato, 153
tirosina, 163
Trichophyton, 158
xantina, 163
detección
de perforación del pelo, 159
de ureasa, 163
extracto de levadura-fosfato con amoníaco, 152
filamentación en suero, 162
medio(s)
de converse, 164
de gis, 158
de Gorodkova, 157
de leche tornasolada, 164
de prueba para dermatofitos (DTM), 158
para obtención de levaduras
Sporothrix spp., 165
para obtener células fumagoides, 164
cromógenos, 162
prueba
de crecimiento en gelatina, 162-163
de hidrólisis de gelatina, 163
Médula ósea, toma de, 30
Meiospóricos, 14-15
Merz, W. G., 48c
Mesófilos, 21
Metenamina de plata, 149
Método(s)
de difusión, 188-189
en agar con tabletas y discos, 189-190
de microdilución
en caldo para levaduras, 183-186
EUCAST, 186
comercializados, 186-187
de sensibilidad antifúngica in vitro, 183
Micetoma, 24, 55-62
bacterias y hongos causantes de, 60
diagnóstico de laboratorio, 55-60
examen directo, 55-57
frotis, 57
histopatología, 58, 60
pruebas especiales, 57-58
serología, 58
especímenes biológicos, 55
Micología médica, conceptos
fundamentales, 24-25
Micosis
clasificación
clínica de las, 21-22
taxonómica de productores de, 14c
datos clínicos orientadores de, 27
de tipo ocupacional, 24
diagnóstico, 24
integral, 143
molecular de las, 175-181
ciclo de amplificación, 176-181
reacción en cadena de la polimerasa, 175-176
procedimientos de, 25c
productos biológicos para el, 28c
mecanismos de infección de las, 23c
oportunistas, 22-23, 91-125
aspergilosis, 105-110
candidosis, 91-98
criptococosis, 98-101
feohifomicosis, 121-123
hialohifomicosis, 113-121
microsporidiosis, 112-113
mucormicosis, 101-105
neumocistosis, 110-111
peniciliosis por *Penicillium marneffei*, 111
rodotorulosis, 111-112
sacarmicosis, 112
sistémicas, 22-23, 77-90
blastomicosis, 87-89
coccidioidomicosis, 80-84
histoplasmosis, 77-80
paracoccidioidomicosis, 84-87
subcutáneas, 22-23, 55-75
basidiobolomicosis, 73-74
conidiobolomicosis, 71-73
cromoblastomicosis, 66-70
esporotricosis, 63-66
lacaziosis (lobo), 71
micetoma, 55-62
superficiales, 22, 33-53
agentes etiológicos, 34-47
Epidermophyton floccosum, 43
Microsporum
canis, 43-44
fulvum, 44-45
gypseum, 44
nanum, 45-46
persicolor, 45
pruebas especiales, 46-47
histopatología, 47
intradermoreacción, 47
lámpara de luz de Wood, 46
medio de prueba para dermatofitos (DTM), 47
perforación del pelo in vitro, 46
prueba de la ureasa, 47
Trichophyton
concentricum, 41
mentagrophytes, 38-39
rubrum, 40
schoenleini, 42
soudanense, 42
tonsurans, 40
verrucosum, 40-41
violaceum, 42-43
dermatitis seborreica, 47-50
dermatofitosis, 33-34
diagnóstico de laboratorio, 36-38
cultivo, 38
escamas de piel y uñas, 37-38
examen directo, 36
infección ectotrix y endotrix, 37
pelos, 36
otomicosis, 53
piedra
blanca, 52
negra, 51-52
pitiriasis versicolor, 47-50
tiña negra, 50-51
Microcultivo(s), técnicas de, 149-151
cultivo en portaobjetos, 149
tinción para, 151
Microdilución en caldo, 183-186
Microsporidiosis, 112-113
Mitospórico, 14-17
Monomorfismo, 24
Montaje
técnicas de, 145
albúmina de Meyer, 145
procedimiento, 145
tinción de pelos y escamas, 145

- y conservación de preparaciones húmedas, 144-145
- Morfología, 15
- Mosaico fúngico, 38
- Mucormicosis, 101-105
 - agentes etiológicos, 101
 - Cunninghamella bertholletiae*, 104-105
 - Mucor circinelloides*, 104
 - Mycocladius* (*Absidia*) *corymbifera*, 104
 - Rhizomucor pusillus*, 104
 - Rhizopus oryzae*, 103-104
 - Saksenaia vasiformis*, 104
 - diagnóstico de laboratorio, 102-103
 - cultivo, 102-103
 - examen directo, 102
 - especímenes biológicos, 102
- Muestras clínicas, selección apropiada de, 27
- Mullins, K. B., 176
- Neumocistosis, 110-111
- Nocardiosis, 133-134
 - diagnóstico de laboratorio, 133-134
 - cultivo, 133
 - frotis, 133
 - histopatología, 134
 - pruebas especiales, 134
 - especímenes biológicos, 133
- Observación microscópica de productos patológicos, 144
- Onicomycosis, 92-93, 105
- Oportunismo, 25
- Orina, toma de, 30
- Otomycosis, 53, 105
 - diagnóstico de laboratorio, 53
 - cultivo, 53
 - examen directo, 53
 - especímenes biológicos, 53
- Paracoccidioidomycosis, 23, 84-87
 - diagnóstico de laboratorio, 85-87
 - cultivo, 85-86
 - examen directo, 85
 - histopatología, 86-87
 - pruebas inmunológicas, 86
 - especímenes biológicos, 85
- Paracoccidioides brasiliensis*, 24
- Peniciliosis por *Penicillium marneffei*, 111
- Perforación de pelo in vitro, 46
- Phyla, 13-14
- Piedra
 - blanca, 52
 - diagnóstico de laboratorio, 52
 - cultivo, 52
 - examen directo, 52
 - especimen biológico, 52
 - negra, 51-52
 - diagnóstico de laboratorio, 51-52
 - cultivo, 51-52
- examen directo, 51
 - especimen biológico, 51
- Pies, dermatofitosis de los, 34
- Pitiriasis versicolor, 22
 - cultivo, 49
 - diagnóstico de laboratorio, 49
 - especímenes biológicos, 49
 - pruebas
 - especiales, 50
 - luz de Wood, 50
 - inmunológicas, 50
- Plantae, 13
- Pluralidad etiológica, 24
- Pneumocystis, 14
- Pollimorfismo lesional, 24
- Productos biológicos para el diagnóstico micológico, 28c
- Prototecosis, 129
 - diagnóstico de laboratorio, 129
 - cultivo, 129
 - examen directo, 129
 - histopatología, 129
 - especímenes biológicos, 129
- Protozoa, 13
- Pruebas de sensibilidad antifúngica, 183-191
- Psicrófilos, 21
- Pus, toma de, 30
- Ravisse, P., 73f
- Reacción
 - de fijación de complemento, 79
 - en cadena de la polimerasa como herramienta diagnóstica, 175-176
 - anidada, 180
 - ciclo de ampliación, 176-181
 - alineamiento y unión del iniciador, 177
 - conservación, 177-181
 - desnaturalización, 177
 - elongación final, 177
 - extensión y elongación de la cadena, 177
 - inicialización, 177
 - condiciones de amplificación, 178
 - en tiempo real, 180-181
 - extracción de ADN, 178
 - fragmentos polimórficos de ADN amplificados al azar, 180
 - gen blanco, 178
 - mezcla de reactivos, 178
 - modelo fúngico, 178
 - multiplex, 180
 - oligonucleótidos utilizados, 178
 - polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción, 180
 - purificación del fragmento amplificado, 178-179
 - tamaño esperado del fragmento amplificado, 178
 - transcripción inversa, 180
- Reducción morfológica parasitaria, 24
- Reinos, 13-14
- Reproducción, 15-21
 - estructuras de, 16
 - formas de, 14
- Rinosporidiosis, 132
 - diagnóstico de laboratorio, 132
 - cultivo, 132
 - examen directo, 132
 - histopatología, 132
 - especímenes biológicos, 132
- Rippon, J. W., 70
- Rodotorulosis, 111-112
- Sacromycosis, 112
- Sangre, toma de, 30
- Sensibilidad antifúngica
 - in vitro, método de, 183
 - pruebas de, 183-191
 - diluciones de los antifúngicos solubles, 184
 - diluciones de los antifúngicos insolubles en agua, 185-186
 - método(s)
 - comercializados de microdilución, 186-188
 - ATB Fungus 2, 187-188
 - Fungitest, 187
 - panel antifúngico colorimétrico, 186-187
 - para hongos filamentosos, 188
 - de difusión, 188-189
 - en agar con tabletas y discos, 189-190
 - E-Test, 188-189
 - de microdilución en caldo para levaduras, 183-186
 - EUCAST, 186
- Seres vivos, clasificación de los, 13-14
- Seudomicosis, 127-134
 - eritrasma, 127-128
 - prototecosis, 129
 - rinosporidiosis, 132
 - sistémicas, nocardiosis, 133-134
 - subcutáneas por actinomicosis, 129-131
 - superficiales, 127
 - tricomycosis axilar, 128-129
- Sinusitis, 106
- Suero, toma de, 30-31
- Taloconidios, 16
- Taxonomía, 13-15
- Técnicas de toma de muestras, 29-31
- Teleomorfismo, 13
- Termófilos, 21
- Tinción
 - para microcultivos, 151
 - técnicas de, 145-149
 - ácido peryódico de Schiff, 148
 - azul de Alcian para *Cryptococcus*, 148

- de ascas y ascosporas de levaduras, 147
- de Grocott (metenamina de plata), 149
- de Kinyoun, 147-148
- examen directo con azul de algodón, 145-146
- fite, 147
- giemsa, 147
- gram, 146
- hidróxido de potasio-tinta azul (Parker), 146
- negativa con tinta china, 146
- Tiña**
 - de la cabeza, 23, 33-34
 - imbricata, 34
 - inguinal, 23
 - negra, 24, 50-51
 - diagnóstico de laboratorio, 50
 - cultivo, 50
 - examen directo, 50
 - pruebas bioquímicas, 50
 - especimen biológico, 50
- Toma de especímenes, 27-31
 - principios científicos básicos, 27-31
 - cantidad de muestra, 27

- datos clínicos orientadores de micosis, 27
- envío, 31
- equipos y material, 31
- indicaciones para el paciente, 29
- rechazo de especímenes inadecuados, 27
- selección apropiada de muestras clínicas, 27
- tiempo, 27, 29
- transporte y almacenamiento, 29
- técnicas de, 29-31
- biopsias diversas, 30
- escamas, 29
- especímenes del tracto respiratorio, 30
 - esputo, 30
 - muestra bronquial y aspiración transtraqueal, 30
- exudado
 - de mucosas (cavidad bucal, vaginal, faríngea, conjuntival y nasal), 30
 - ótico, 30
- líquido cefalorraquídeo, 30

- médula ósea, 30
- orina, 30
- pelos, 29-30
- pus, 30
- sangre, 30
- suero, 30-31
- uñas, 30
- Topley*, 14c
- Tracto respiratorio, especímenes del, 30
- Tricomycosis axilar, 128-129
 - diagnóstico de laboratorio, 128-129
 - cultivo, 129
 - examen directo, 128
 - frotis, 129
- especimen biológico, 128
- Uñas**
 - dermatofitosis de las, 34
 - toma de muestras en, 30
- Ureasa, prueba de la, 47
- Wakefield*, 14
- Wilson*, 14c
- Zygomycota, 14, 16