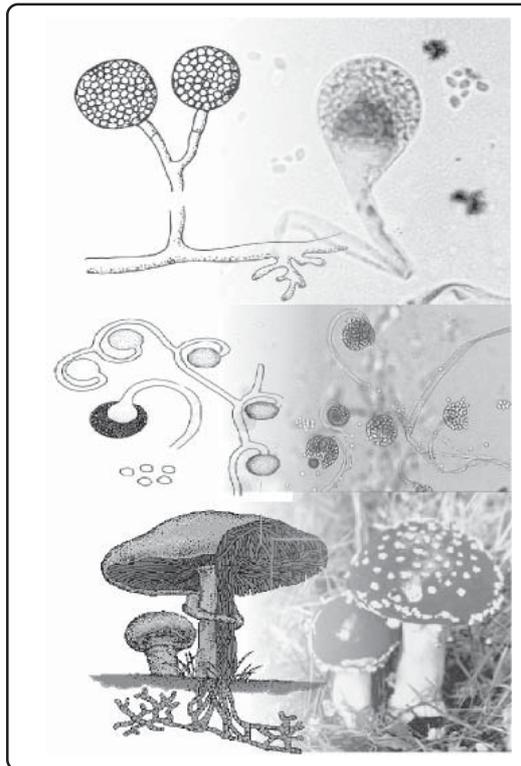


UNIVERSIDAD NACIONAL DE MISIONES
Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales

Cátedra de Micología



GUÍA DE TRABAJOS PRÁCTICOS

Medvedeff, Martha Gladys
Mereles, Beda Elizabeth
Vedoya, María Celina
Chade, Miriam Estela

Año 2005



EDITORIAL UNIVERSITARIA DE MISIONES

San Luis 1870

Posadas - Misiones Tel-Fax: (03752) 428601

Correos electrónicos:

edunam-admini@arnet.com.ar

edunam-direccion@arnet.com.ar

edunam-produccion@arnet.com.ar

edunam-ventas@arnet.com.ar

Colección: Cuadernos de Cátedra

Coordinación de la edición: Nicolás Capaccio

Armado de interiores: Javier B. Giménez

Corrección: Hedda Giraudo

Guía de trabajos prácticos : cátedra de micología / Martha Medvedeff.

[et.al.]. ; coordinado por Nicolás Capaccio - 1a ed. - Posadas :

EdUNaM - Editorial Universitaria de la Univ. Nacional de Misiones,
2005.

105 p. ; 30x21 cm.

ISBN 950-579-037-6

1. Micología 2. Micología Clínica 3. Diagnóstico Fúngico I. Capaccio, Nicolás, coord. II. Título
CDD 616.969.

Fecha de catalogación: 29/08/2005

ISBN 950-579-037-6

Impreso en Argentina

©Editorial Universitaria

Universidad Nacional de Misiones

Posadas, 2005

Las Autoras

MEDVEDEFF, Martha Gladys

TÍTULOS:

Bioquímica.

Especialista en “Microbiología Clínica” FCEQyN UNaM

Doctorado. Tesis en desarrollo. “Obtención y validación de un agente fungicida de origen natural”. UNaM-Univ. Central “Marta Abreu” de Las Villas. Cuba.

ACTIVIDADES ACADÉMICAS:

Profesor Adjunto Cátedra de Micología. Carrera de Bioquímica. FCEQyN. UNaM.

Docente Carrera de posgrado “Especialización en Microbiología Clínica”.

Disertaciones varias en cursos y conferencias.

ACTIVIDADES DE INVESTIGACIÓN

Directora proyecto de Investigación “Contribución al diagnóstico de las infecciones fúngicas. Realidad y perspectiva”.

Directora “I Programa de Formación, Capacitación y Perfeccionamiento en Micología Clínica”.

Directora proyecto de Extensión y Vinculación Tecnológica “Aislamientos fúngicos de Interés médico”.

Representante Director Titular en el Consejo Directivo del CIDET. UNaM.

PUBLICACIONES: (en co-edición con otros autores)

Libro “Micosis superficiales y cutáneas”. Editorial Universitaria de la UNaM. Año 2003.

“Micosis subcutánea postraumática por *Fusarium solani*”. Revista Iberoamericana de Micología.

“Comparación in vitro de la acción fungicida de solución saturada de azúcar y nitrato de econazol”. Revista Ars Pharmaceutica.

“Acción fungicida in vitro de cinco formulaciones de sacarosa”. SAEPE/JICC. Pato Branco. Brasil.

“Micología Clínica. Su articulación entre la Universidad y el Medio”. SAEPE/JICC. Pato Branco. Brasil.

“Micosis sistémicas oportunistas en nuestro medio”. Revista CIDET. FCEQyN. UNaM

“Una alternativa terapéutica para micosis superficiales”. Revista mexicana de Ciencias Farmacéuticas.

VEDOYA, María Celina

TÍTULOS

Bioquímica.

Maestría en Tecnología de Alimentos. Tesis en ejecución.

ACTIVIDADES ACADÉMICAS

Jefe de Trabajos Prácticos Cátedra Micología y Cátedra Química Biológica IIc. Carrera de Bioquímica. FCEQyN. UNaM.

ACTIVIDADES DE INVESTIGACIÓN

Directora Area temática Proyecto “Diagnóstico y tratamiento de Micosis superficiales con solución saturada de azúcar”

Directora Area temática Proyecto “Aislamientos fúngicos de interés médico”.

Integrante del Consejo Directivo del CIDET. FCEQyN.
Investigador Categoría III en el Programa Nacional de Incentivos.

PUBLICACIONES

Libro "Micosis superficiales y cutáneas" (en co-edición con otras autoras). Editorial Universitaria. UNaM. Año 2003.

Publicaciones varias en Revistas científicas.

MERELES RODRIGUEZ, Beda Elizabeth

TÍTULOS

Bioquímica.

Especialista en Microbiología Clínica.

ACTIVIDADES ACADÉMICAS

Jefe de Trabajos Prácticos Dedicación Exclusiva Cátedra de Micología, Carrera de Bioquímica. FCEQyN. UNaM.

Colaboración en Docencia en Carrera de Posgrado sobre temas de Micología.

Elaboración de material didáctico de Grado y Posgrado

ACTIVIDADES DE INVESTIGACIÓN

Integrante de Proyectos de Investigación en su especialidad.

Participación en Proyectos coordinados o codirigidos en área Micosis.

PUBLICACIONES

Libro "Micosis superficiales y cutáneas" (en co-edición con otras autoras). Editorial Universitaria. UNaM. Año 2003.

Publicaciones varias en Revistas científicas.

Presentaciones de temas varios de su especialidad en Congresos y Jornadas científicas.

Disertaciones varias en Cursos y Proyectos.

CHADE, Miriam Estela

TÍTULOS

Bioquímica.

ACTIVIDADES ACADÉMICAS

Auxiliar de Primera Dedicación Semiexclusiva. Cátedra de Microbiología. Carrera de Bioquímica. FCEQyN. UNaM.

Colaboración en docencia de Posgrado.

Varios Cursos dictados afines a la Docencia.

Participación en varios Congresos, Jornadas, Simposios, Seminarios.

Asistencia a Cursos y Talleres varios sobre su especialidad.

ACTIVIDADES DE INVESTIGACIÓN

Docente Investigador Categoría IV

Director del área "Hongos levaduriformes y oportunistas" en el proyecto "Contribución al diagnóstico de las infecciones fúngicas. Realidad y perspectiva".

PUBLICACIONES

Libro "Micosis superficiales y cutáneas" (en co-edición con otras autoras). Editorial Universitaria. UNaM. Año 2003.

Publicaciones varias en Revistas científicas.

Índice

Trabajo Práctico N° 1: Medidas de seguridad. Preparación de medios de cultivo y materiales necesarios en Micología.	7
Trabajo Práctico N° 2: Estructuras fúngicas somáticas y reproductivas	13
Trabajo Práctico N° 3: Subdivisión Deuteromycotina u hongos imperfectos	21
Trabajo Práctico N° 4: Subdivisión Zigomycotina	27
Trabajo Práctico N° 5: Subdivisión Basidiomycotina	33
Trabajo Práctico N° 6: Subdivisión Ascomycotina.....	43
Trabajo Práctico N° 7: Micosis superficiales y cutáneas	47
Trabajo Práctico N° 8: Levaduras	55
Trabajo Práctico N° 9: Micosis subcutáneas	71
Trabajo Práctico N° 10: Seudomicosis profundas	75
Trabajo Práctico N° 11: Micosis sistémicas.....	79
Trabajo Práctico N° 12: Inmunodiagnóstico de micosis sistémicas	87
Bibliografía	93

TRABAJO PRÁCTICO N° 1

MEDIDAS DE SEGURIDAD. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVOS Y MATERIALES NECESARIOS EN MICOLOGÍA

I- MEDIDAS DE SEGURIDAD

Como otros laboratorios clínicos, los de Micología médica no están exentos de accidentes de trabajo; sin embargo, estos pueden reducirse si se observan las más elementales normas de seguridad y prevención.

Riesgos biológicos

No debe existir la idea de que el trabajo con hongos patógenos representa un riesgo de contagio para el personal del laboratorio de Micología, aunque existen, como en los laboratorios de Bacteriología, Parasitología, y Virología 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 patógenos representan un riesgo para el hombre, solamente *Coccidioides immitis*, *Paraccoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum* y *Blastomyces dermatitidis* se consideran altamente patógenos, por lo que deben manipularse extremando los cuidados y utilizando campanas de seguridad biológicas con aire filtrado e incinerador. El resto de los hongos pueden ser manipulados 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 bruscas de aire y utilizar dos mecheros. Debe anotarse la fecha de siembra en los tubos de cultivo y se incuban sin manipularlos en exceso hasta la fecha de lectura. Los hongos de alta patogenicidad se incuban en un lugar diferente al del resto de los cultivos, de preferencia en cajones para este fin, de tal manera que al abrirse el cajón se pueda observar el desarrollo fúngico sin tener que manipular los medios.

Al terminar de sembrar las muestras o resembrar estos hongos, se desinfecta el área de trabajo con fenol 5% o con alcohol 96%. Se deben lavar las manos con agua y jabón y evitar llevarlas a los ojos o a las mucosas externas. No debe trabajarse con hongos sin utilizar guantes, especialmente con los de micosis subcutáneas, si se tienen heridas o escoriaciones en las manos.

Una vez que se desechan los cultivos y todo material contaminado, se esterilizan en autoclave a 20 libras de presión durante 60 minutos antes de lavarlos o depositarlos en el incinerador.

En caso de ruptura de tubos de 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, y se repite el mismo procedimiento con una nueva toalla humedecida hasta dejar completamente limpia la superficie; luego se desinfecta con fenol al 5%. Todo el material contaminado debe esterilizarse. Las personas que han sido

expuestas a estos accidentes serán vigiladas clínicamente durante varias semanas para detectar, en caso de contagio, cualquier sintomatología atribuible a algunas 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 comunes, por lo que la limpieza constante y adecuada de todas las áreas de laboratorio debe extremarse y realizarse, por lo menos, cada semana. Al mismo tiempo, son importantes las siguientes medidas que deben ser cumplidas estrictamente en el laboratorio:

- *No comer ni beber*
- *No fumar*
- *No tener plantas naturales*
- *Llevar ropa de trabajo limpia*
- *Evitar corriente de aire*
- *No permitir la entrada a visitas o personas extrañas al laboratorio*

Manejo de 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 tuberculosis. Sin embargo, actualmente las muestras que más cuidados necesitan son las muestras de pacientes con SIDA, de las cuales se mencionan a continuación las principales medidas recomendadas por la OMS y el *Center 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 puncionar a los pacientes.
- 3- Desechar jeringas, agujas, recipientes, frascos, gasas y todos los utensilios empleados en la toma y manejo de muestras, envolviéndolos en papel resistente y cerrado perfectamente el paquete con cinta adhesiva antes de esterilizarlo o incinerarlo.
- 4- Uso de guantes desechables, barbijos y bata cerrada.
- 5- Uso de lentes o mascarillas si hay riesgo de salpicaduras o contacto con algún aerosol de los pacientes.
- 6- Pipeteo mecánico de los fluidos patológicos.
- 7- Desinfectar el lugar de trabajo donde se procesa la muestra con hipoclorito de sodio al 0,5%, formol 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, estas deberán lavarse enérgicamente con agua y jabón antiséptico y vigilar al accidentado con reacciones serológicas periódicas. Hay que tomar 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.

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.
- 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 solo 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 0,5%.
- 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 líquido con cualquier clase de pipeta. Usar 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.

II- ESTERILIZACIÓN Y PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO EN MICOLOGÍA

Para todo análisis micológico deben considerarse todas aquellas precauciones tenidas en cuenta para cualquier estudio microbiológico. Es importante recalcar que el éxito de los resultados dependerá fundamentalmente de una correcta toma de muestra y de su adecuado procesamiento; posterior para ello, debemos tener en cuenta los principios básicos de esterilización para los materiales y medios de cultivos a ser utilizados.

Materiales de trabajo

Los elementos utilizados habitualmente para el desempeño en el laboratorio de Micología se describen a continuación:

Hisopos: deben estar estériles porque se corre peligro de infectar al paciente y/o agregarse al estudio otro hongo que puede llevar a una mala interpretación del resultado. Comúnmente se usa para toma de muestra.

Ansas: se utilizan distintos tipos de ansas, aguja, en forma de L y ojal. Las primeras son usadas para hongos filamentosos y la última para hongos levaduriformes.

Pinzas y bisturíes: se esterilizan por inmersión en alcohol y quemado a la llama. Se usan para toma de muestras.

Jeringas y agujas: se las utilizan estériles para toma y procesamiento de muestras clínicas.

Pipetas: tenerlas almacenadas estérilmente para ser usadas cuando se necesita transferir muestras líquidas o medios de cultivos.

Tubos de ensayo y placas de Petri: se utilizan para la distribución de los diferentes medios de cultivo en los cuales se realizan siembra y repique de cepas y muestras clíni-

cas. Las placas de Petri estériles también son usadas para la recolección de muestras clínicas (escamas, uñas, pelos).

Placas vs. tubos: la desventaja de los tubos es limitada para el aislamiento de colonias. En contraste, las placas proporcionan una gran superficie en la cual pueden observarse fácilmente cultivos mixtos y las colonias tienen una aireación máxima. La ventaja de los tubos es que requieren poco sitio para almacenamiento e incubación, además de que el potencial de contaminación es menor. Es imperativo que cuando se trabaja con placas sean abiertas y examinadas solo dentro de una campana de seguridad biológica adecuadamente ventilada.

Estos materiales deben estar correctamente estériles y almacenados para ser usados cuando sean necesarios. Se tendrá preparado, además, solución fisiológica y agua en condiciones estériles que pueden ser necesarios en el caso de realizar diluciones o suspensiones, hidratación de medios de cultivos, etc.

Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados frecuentemente en el laboratorio de Micología son los siguientes:

Agar Sabouraud 4%: contiene dextrosa como fuente de hidratos de carbono y peptona como fuente de nitrógeno; se lo utiliza para: aislamiento de hongos.

Agar Sabouraud 2%: se lo utiliza habitualmente para recuperación, subcultivos e identificación de hongos.

Agar Mycobiotic: agar selectivo para hongos patógenos. Además de la fuente de C y N contiene cicloheximida y cloranfenicol; el primero inhibe el desarrollo de hongos contaminantes, el segundo inhibe el desarrollo bacteriano.

Agar Czapeck: se utiliza para aislamiento de hongos filamentosos e identificación de especies de *Aspergillus*.

Agar infusión cerebro corazón: aislamiento y subcultivos de hongos exigentes.

DESARROLLO PRÁCTICO

1) Preparación de soluciones:

- Solución fisiológica
- Agua
- Hidróxido de Potasio 40%

2) Preparación de medios de cultivos:

- Agar Sabouraud 20 (2%)
- Agar Sabouraud 40 (4%)
- Agar Czapeck
- Agar Mycobiotic o Agar selectivo para hongos patógenos

3) Preparación de antisépticos:

- Fenol al 10%.

4) Preparación de colorantes:

- Lactofenol azul de algodón
- Gram
- Verde de malaquita

5) Preparación de materiales de vidrio:

- pipetas (1,0-5,0-10,0ml.)
- cajas de Petri.
- tubos de ensayo
- hisopos

6) Abrir cajas conteniendo agar Sabouraud 4% y Czapeck en distintos sitios y a diferentes tiempos: 5, 10, 15, 30 min. Observar en el próximo Trabajo Práctico el desarrollo fúngico de contaminantes ambientales a las que fueron expuestas. Incubar a 28°C.

TRABAJO PRÁCTICO N° 2

ESTRUCTURAS FÚNGICAS SOMÁTICAS Y REPRODUCTIVAS

Se entiende por reproducción la formación de nuevos individuos que tienen todas las características típicas de la especie. En hongos pueden haber dos tipos de reproducción: *asexual* y *sexual*.

La reproducción asexual también llamada somática o vegetativa no incluye la unión de los núcleos compatibles, células sexuales u órganos sexuales.

La reproducción sexual en cambio, está caracterizada por la unión de los núcleos compatibles.

En la formación de órganos reproductores ya sean sexuales o asexuales, todo el talo puede convertirse en una o más estructuras reproductoras, es decir, la fase somática no se distingue de la fase reproductora y nunca se pueden presentar juntas en el mismo individuo. Estos hongos se denominan *holocárpicos* (del griego *holos*: entero + *carpos*: fruto). En la mayoría de los hongos los órganos reproductores surgen solamente en una porción del talo, en tanto el resto continúa sus actividades somáticas normales. Los hongos de esta categoría se llaman *eucárpicos* (del griego *eu*: bueno + *karpos*: fruto). Las formas holocárpicas son menos diferenciadas que las eucárpicas, es decir son más primitivas.

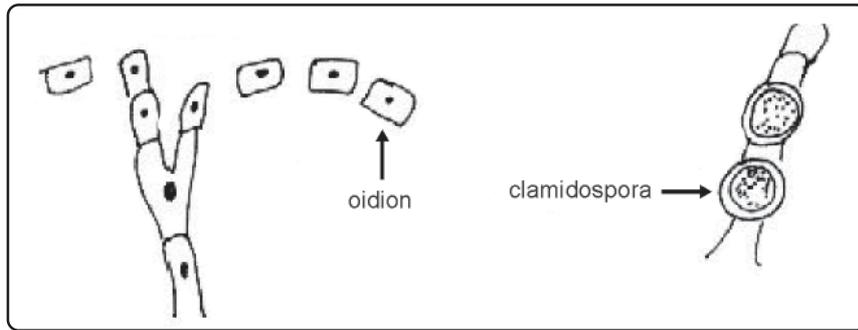
Las estructuras de reproducción o *propágulos* pueden ser de tipo sexual, denominándose las *esporas*; en tanto que a las de tipo asexual se las denomina *conidios*, a excepción de las esporas asexuales que se producen en los esporangios de los Zygomycotina. En los Mastigomycotina se observa el tipo de esporas sexuales llamadas oosporas; en los Zygomycotina, zigosporas; en los Ascomycotina, ascosporas y en los Basidiomycotina, basidiosporas.

REPRODUCCIÓN ASEJUAL

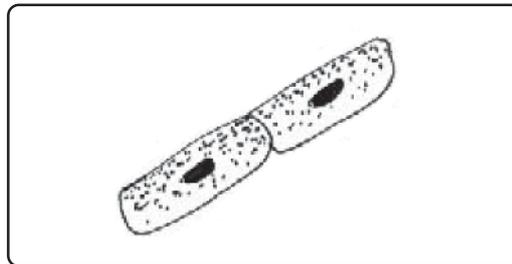
Este tipo de reproducción es más importante para la propagación de la especie ya que origina la producción de numerosos individuos, particularmente porque el ciclo asexual se repite varias veces al año; en tanto el sexual, en muchos hongos se presenta una sola vez.

Los modos de *reproducción asexual* que se encuentran comúnmente son:

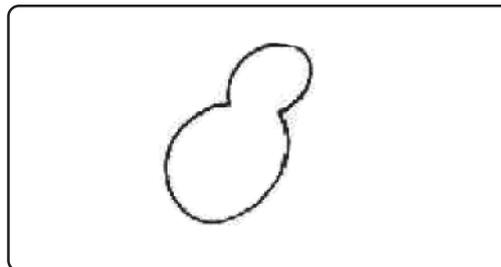
1- Fragmentación somática y crecimiento de un nuevo individuo a partir de cada fragmento: las hifas se rompen en sus células componentes que toman el nombre de *oídeos* (*oidion*: pequeño huevo) o *artrosporas* (*arthron*: articulación + *sporos*: espora). Si la célula antes de separarse se rodea de una pared gruesa se llama **clamidospora** (*chlamys*: manto + *sporos*: espora). La fragmentación puede ocurrir por rotura del micelio debido a fuerzas externas, por ejemplo, en el laboratorio cuando transferimos un trozo de micelio a un nuevo medio de cultivo empleamos la fragmentación miceliana para originar una nueva colonia.



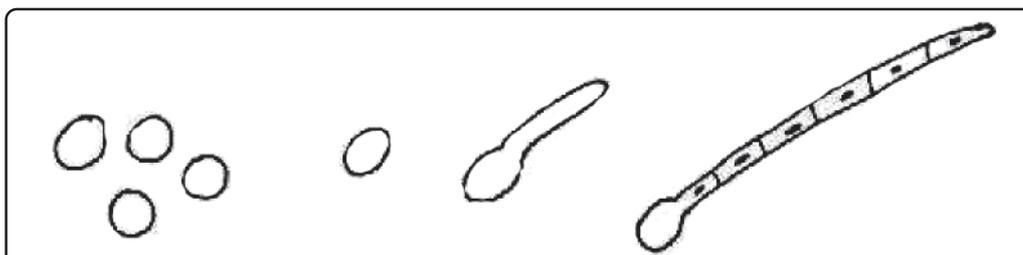
2- Fisión de células somáticas en células hijas: la fisión es la simple partición de una célula en dos células hijas por estrangulamiento y formación de una pared celular. Es característica de las bacterias y de algunas levaduras.



3- Formación de células somáticas o esporas y producción de un nuevo individuo a partir de cada yema: la gemación es la producción de un pequeño crecimiento a partir de la célula madre. El núcleo se divide y uno de los núcleos hijos migra a la yema, la que va aumentando de tamaño y luego se desprende para formar un nuevo individuo. A veces se producen cadenas de yemas que forman un corto micelio. La gemación tiene lugar en la mayoría de las levaduras y en otros hongos en ciertos estadios de su ciclo de vida o en ciertas condiciones de crecimiento.



4- Producción de conidios: cada uno de los cuales forman un tubo germinal que iniciará un nuevo micelio y cumple la función de diseminación de la especie porque se produce varias veces al año. Son menos resistentes que las clamidosporas a los cambios adversos (temperatura, humedad, pH, etc).



Según el proceso de conidiogénesis, los conidios tienen una nomenclatura específica y pueden ser dependientes de su origen: **blásticos** o **tálicos**. En los primeros hay un proceso de neoformación por síntesis y lisis de material, y en los segundos participa la célula conidiógena completa, dándose un proceso de transformación del material.

Los conidios se forman a partir de la célula conidiógena (célula que por sí misma o a partir de la cual se originan directamente los conidios), y tomando en cuenta la posición del conidio respecto a la célula conidiógena, puede ser de tipo:

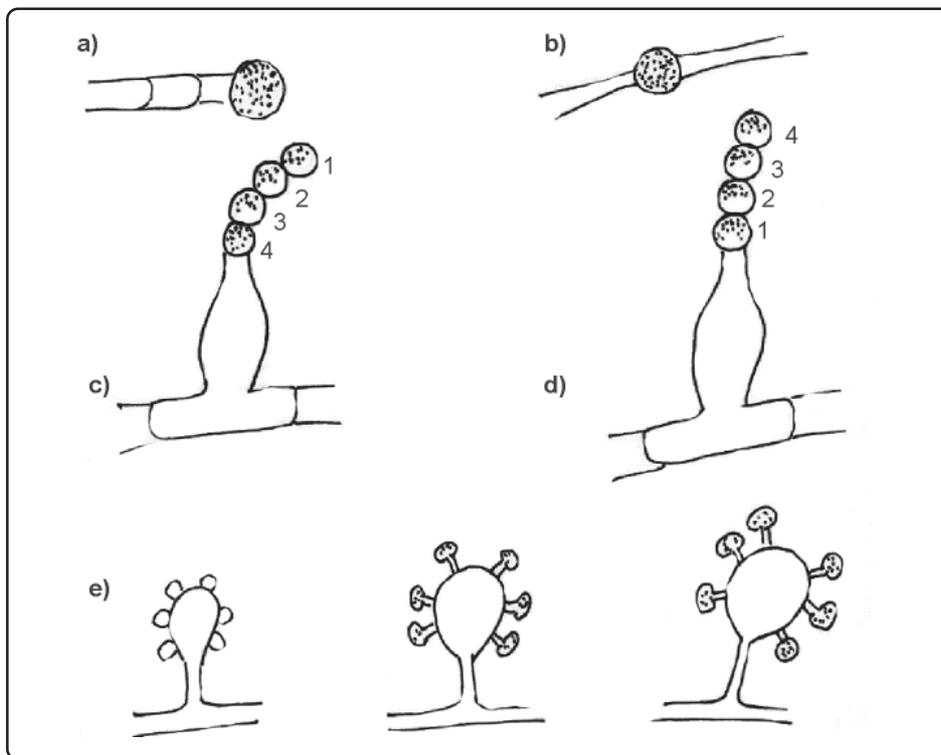
Terminal, cuando el conidio se origina en el extremo distal de la hifa.

Intercalar, cuando el conidio se origina en algún punto a lo largo de la hifa.

Basípeta, cuando 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.

Sincronógena, cuando varios conidios se desarrollan al mismo tiempo a partir de la célula conidiógena.



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

REPRODUCCIÓN SEXUAL

Este tipo de reproducción requiere la unión de dos núcleos compatibles y se realiza entre fases distintas: 1) **Plasmogamia**: se unen dos protoplastos y sus núcleos quedan muy juntos dentro de una sola célula por lo que resulta una célula binucleada (dicarion); 2) **Cariogamia**: es la fusión de dos núcleos reunidos por plasmogamia, resultando un diploide; 3) **Meiosis**: que reduce el número de cromosomas al haploide.

Con respecto a los órganos implicados en el tipo de reproducción, algunas especies producen en cada talo órganos sexuales masculinos y femeninos; tales especies son **hermafroditas** y se reproducen por sí mismas, si son autocompatibles.

Hay hongos hermafroditas cuyos órganos sexuales masculinos y femeninos no son compatibles o sea que cada individuo es sexualmente autoestéril.

Otras especies están constituidas por talos femeninos y talos masculinos; a estas especies se las llama *dioicas*, es decir de sexos segregados en dos individuos diferentes. Algunas especies de hongos no producen órganos sexuales diferentes estando delegada la función sexual a hifas somáticas.

Los órganos sexuales de los hongos se llaman *gametangios* (gametas: marido+angeion: vasija). Estos pueden formar células sexuales diferenciadas llamadas gametas. Se utiliza el término *Isogametangia* para designar gametangios morfológicamente iguales, y el de *Heterogametangia* para designar gametangios masculinos y femeninos morfológicamente diferentes. En este último caso el gametangio masculino se llama *anteridio* y el femenino, *oogonio*.

Las diferentes formas de unión de los núcleos compatibles en el proceso de plasmogamia son:

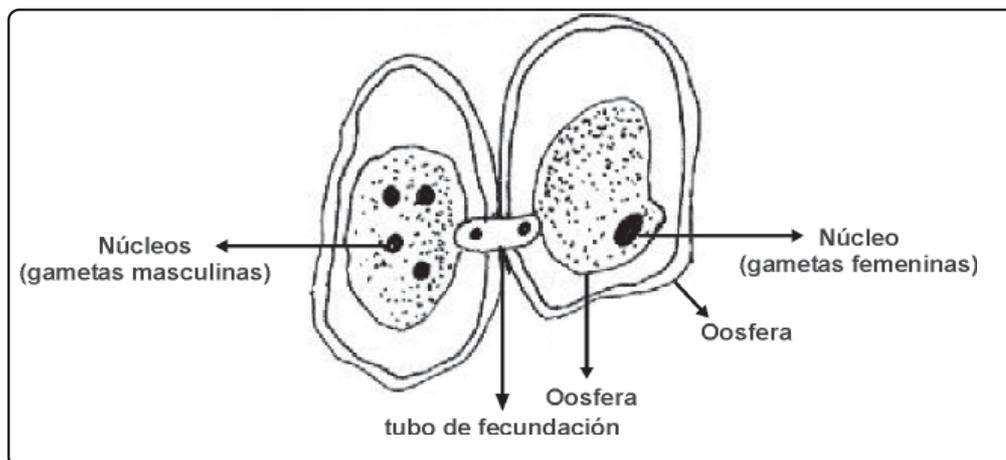
1- Copulación planogamética

Es la fusión de dos gametas desnudas de las cuales por lo menos una es móvil. La gameta móvil se denomina planogameta.

2- Contacto gametangial

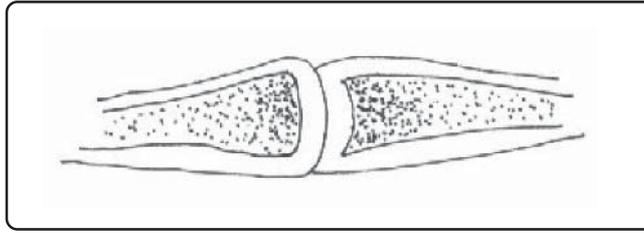
En este proceso los dos gametangios de sexo opuesto se ponen en contacto y uno o más núcleos gaméticos migran del masculino al femenino. Los gametangios no se fusionan realmente, ni pierden identidad durante el acto sexual. En algunas especies los núcleos masculinos entran al gametangio femenino a través de un poro que se ha formado en el punto de contacto por disolución de las paredes gametangicas. En otras especies un tubo de fertilización especialmente desarrollado sirve de puente para pasaje del núcleo masculino.

3- Copulación gametangial

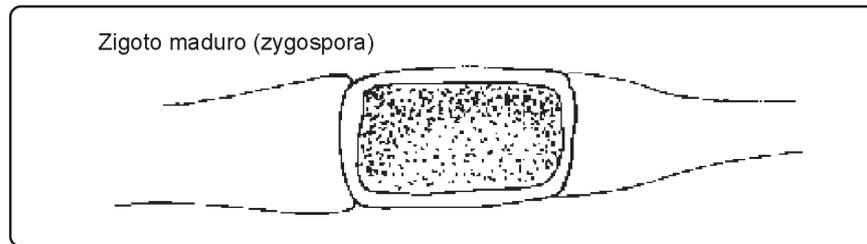


Este proceso se caracteriza por la fusión de todo el contenido de los dos gametangios en contacto. Esta fusión se produce de los siguientes modos:

3. 1. Pasaje del contenido de un gametangio al otro a través de un poro formado en el punto de contacto de la pared gametangica. Este proceso es particularmente característico de algunas formas holocárpicas, en el cual todo el talo actúa como gametangio, el talo masculino se adhiere al talo femenino y vacía en él todo su contenido.



3. 2. Fusión directa de dos células gametangias en una. Este proceso tiene lugar por disolución de las paredes de contacto de los dos gametangios, resultando entonces una célula en la cual se mezclan los dos protoplastos.



Este tipo de unión de núcleos compatibles se puede observar en el ciclo biológico del *Rhizopus stolonifer* (A) y en otros Mucorales, y en un Ascomycete tal como el *Schizosaccharomyces octosporus* (B):

A- Ciclo de vida del *Rhizopus stolonifer*

El ciclo biológico de este hongo nos servirá para ejemplificar el esquema del ciclo general de vida de los mucorales. Las esporangiosporas se liberan cuando la pared del esporangio se deshace. Las esporas son globosas u ovoides y multinucleadas (C, C').

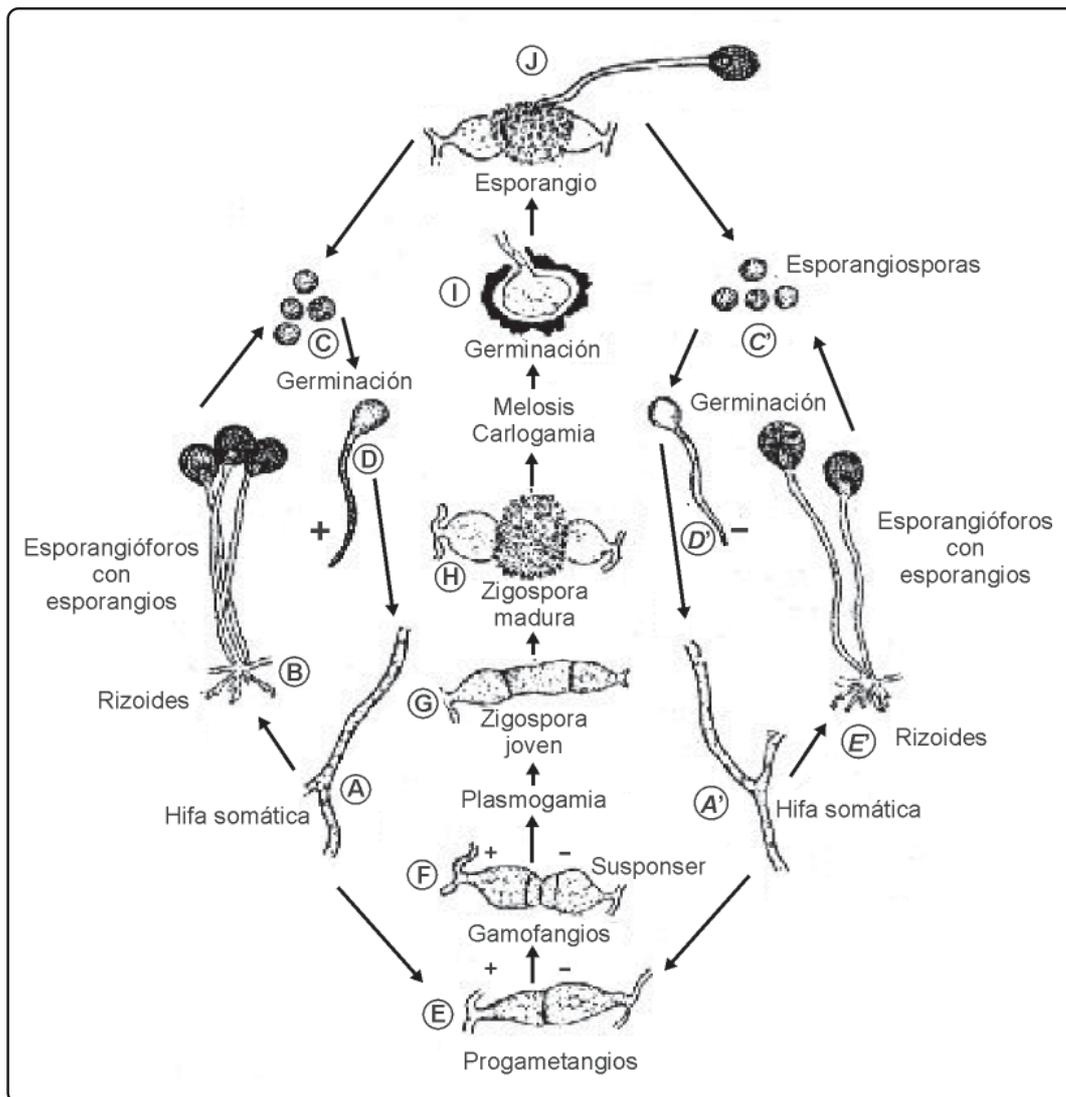
En condiciones favorables la spora germina por medio de un tubo germinativo (D, D') que va a desarrollar un micelio aéreo que en ciertos puntos desarrollan rizoides. Por encima de los rizoides se forman uno o más esporangióforos (B, B'). Al tiempo de maduración el extremo de cada esporangióforo se dilata y comienza a desarrollar el esporangio. Una gran cantidad de citoplasma, que lleva muchos núcleos, fluye hacia el esporangio joven y se concentra principalmente en la periferia. La porción central del esporangio se hace muy vacuolada y se rodea de una pared que la separa de la zona periférica. Esta porción central de la *columela*, y la zona periférica, es la que se lleva las esporas del esporangio. El protoplasma de la zona periférica pronto se divide en una gran cantidad de porciones multinucleadas que luego se redondean, se rodean de pared esporangial y se liberan las esporas al aire completándose de esta manera el ciclo asexual del *Rhizopus stolonifer*. Otros mucorales siguen el mismo esquema general aunque las estructuras pueden diferir en detalles.

La reproducción sexual del *Rhizopus stolonifer* requiere la presencia de dos micelios fisiológicamente diferentes y compatibles (+) y (-); el hongo es heterotálico. Todas las estructuras que se originan de la germinación de una sola esporangiospora son de la misma cepa, como la spora madre.

Cuando las cepas opuestas se ponen en contacto, se forman las ramas copulativas llamadas *progametangios*. Mucho citoplasma y muchos núcleos fluyen hacia los extremos de estos órganos, los cuales empiezan a agrandarse. Se forma entonces un septo cerca del extremo del progametangio y de este modo quedan separadas dos células: un *gametangio terminal* y una *célula suspensora* (F). Las paredes de los dos gametangios se deshacen en el punto de contacto y los protoplastos se mezclan (G). Los núcleos se aparean uno (+) con uno (-) y los dos

núcleos de cada par se fusionan para formar núcleos diploides. Los núcleos que no se fusionan probablemente se desintegran. En tanto la nueva célula formada se agranda, la pared se engruesa y su superficie se hace oscura y verrugosa. Esta estructura se denomina *zigospora*. Después la zigospora germina; durante este proceso tiene lugar la meiosis; la zigospora se rompe y emerge un esporangióforo que desarrolla en su extremo un esporangio, llamado esporangio germinal. Como se dijo anteriormente, la formación de zigospora, en muchos Mucorales se produce de la misma manera que la descrita. Pero muchos mucorales son homotáticos y en consecuencia cada talo es autofértil. En *Zygorhynchus*, género de Mucorales, los gametangios y suspensores son de tamaño diferente.

Ciclo biológico del *Rhizopus stolonifer*



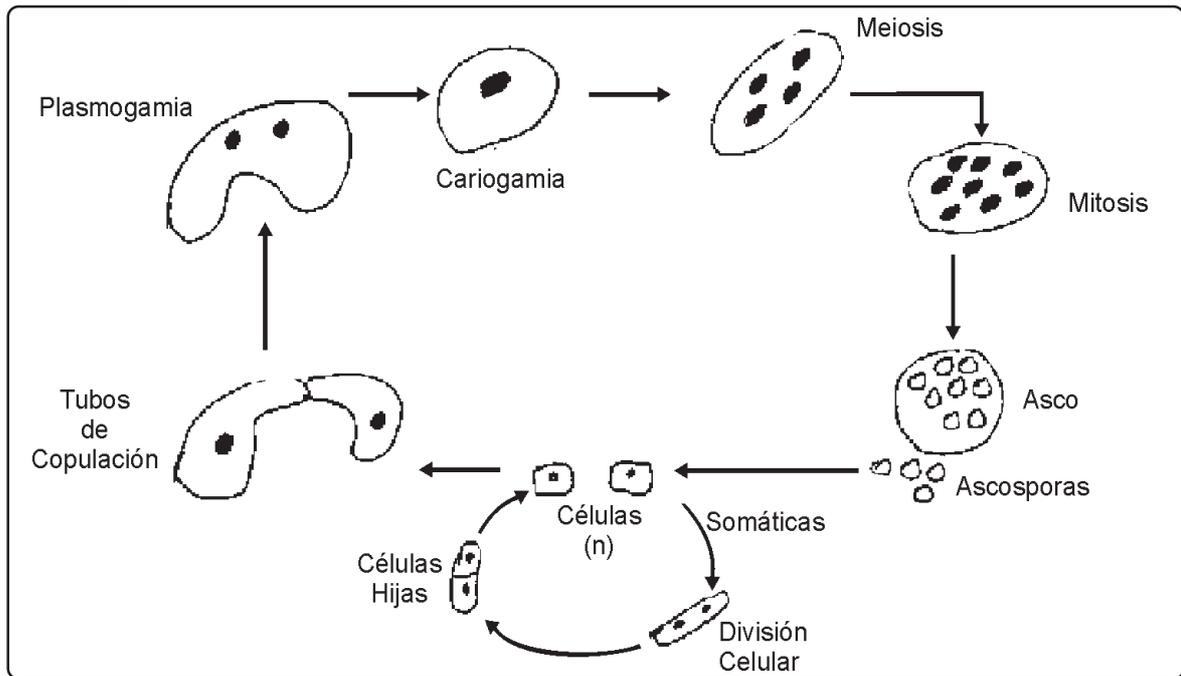
B- Ciclo de vida de *Schizosaccharomyces octosporus*

Este organismo es homotático. Las células somáticas son elongadas, uninucleadas y haploides. Cada célula se divide transversalmente en dos células hijas, las que se separan, se alargan y maduran para dividirse de nuevo. Aparentemente cada célula es un gametangio en potencia. Para la reproducción sexual se ponen en contacto dos células, las paredes se disuelven en el punto de contacto y los núcleos se mueven en el estrecho conducto que se forma.

Luego los núcleos se aproximan y fusionan. Las membranas nucleares se disuelven en el lugar donde se produce la fusión, pero permanecen intactas en el resto.

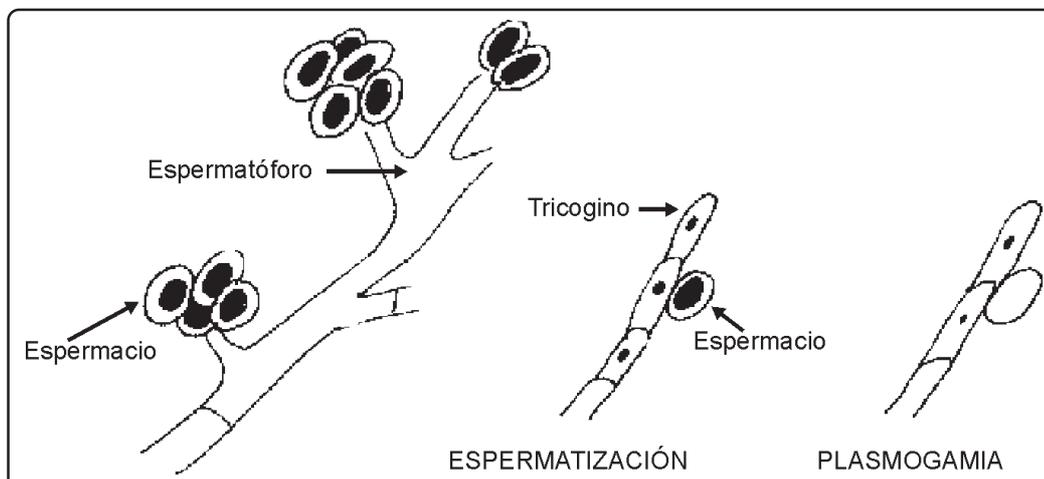
El citoplasma fluye en el conducto que se ensancha considerablemente y las dos células se unen. El núcleo de fusión sufre ahora tres divisiones, la primera de las cuales es **meiótica**, dentro de la célula zygótica convertida en asco; se forman 8 ascosporas una alrededor de cada núcleo. La rotura de la pared ascal finalmente deja salir las ascosporas, cada una de las cuales se comporta ahora como célula somática dando lugar por división transversal a células hijas.

Ciclo biológico del *Schizosaccharomyces octosporus*



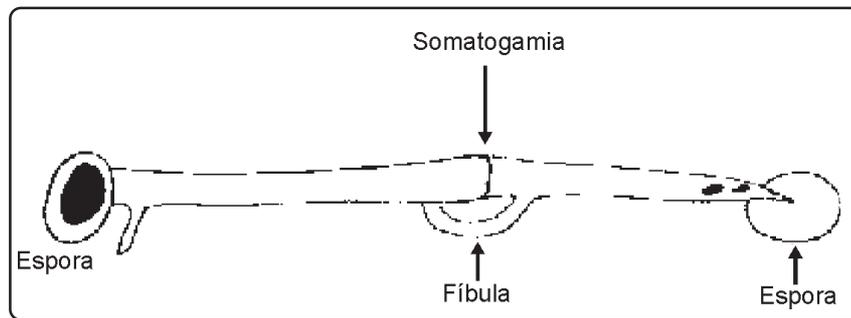
4- Espermización

Algunos hongos tienen numerosas estructuras masculinas pequeñas uninucleadas, con apariencia de esporas llamadas *espermacios*; estos son transportados por el viento o el agua o de algún otro modo, a los gametangios femeninos, a las hifas receptoras especiales o a las hifas somáticas, a los cuales se le adhieren. En el punto de contacto se desarrolla un poro y el contenido del espermacio pasa a la estructura receptiva particular que actúa como órgano femenino.



5- Somatogamia

En muchos hongos superiores no se forma ningún órgano sexual y entonces las células somáticas desempeñan dicha función.



DESARROLLO PRÁCTICO

Observación y reconocimiento de estructuras fúngicas somáticas y de reproducción:

- a. Hifas septadas
- b. Hifas cenocíticas
- c. Hongos levaduriformes
- d. Microconidios
- e. Macroconidios
- f. Clamidosporas
- g. Artrosporas
- h. Ascosporas

TRABAJO PRACTICO N° 3

SUDIVISIÓN DEUTEROMYCOTINA U HONGOS MPERFECTOS

La diferencia taxonómica de los grupos fúngicos que serán tratados en adelante, se basa en los aspectos que se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Diferenciación taxonómica de los grandes grupos fúngicos.

1a. Colonias formadas por células con capacidad de gemación, generalmente carentes de micelio.....	LEVADURAS
1b. Colonias con abundante micelio vegetativo. Presencia de conidios o de esporas.....	2
2a. Presencia de ascosporas.....	ASCOMYCETES
2b. Ausencia de ascosporas.....	3
3a. Micelio no septado o con pocas septas. Las esporas se forman endógenamente en esporangios.....	ZIGOMYCETES
3b. Micelio septado. Los conidios no se originan en esporangios, sino a partir de células especializadas.....	DEUTEROMYCETES

Aislamiento de hongos del medio ambiente

La importancia de reconocer los hongos contaminantes comunes radica en que se encuentran en el ambiente y estos pueden crecer sobre medios inoculados con materiales procedentes de lesiones humanas, o bien pueden contaminar un cultivo puro. Sabemos hoy que en pacientes con deficiencias inmunológicas, cualquiera sea el motivo, un hongo saprofito puede transformarse en patógeno secundario, el cual en circunstancias normales sería considerado un contaminante. Estos hongos no patógenos u oportunistas pueden llegar directamente a los medios de cultivo con el pus de lesiones cutáneas, superficiales o abiertas, con el esputo o con cualquier otro material. Con frecuencia aparecen estas situaciones, por lo que los datos clínicos del paciente son fundamentales para el diagnóstico; es necesario confirmarlo con examen directo y estudios histopatológicos; el cultivo define el género y especie del agente causal pero es ***muy importante la interpretación***, pues estos hongos son omnipresentes.

Los contaminantes comunes del ambiente más frecuentemente observados son:

- Deuteromycetes o Fungi imperfecti
- Zygomycetes
- Levaduras

Deuteromycetes: se incluyen en esta clase artificial aquellos hongos que poseen micelio septado y cuya reproducción sexual se desconoce.

La mayoría se reproducen asexualmente por medio de conidias. Muchos son saprófitos pero entre ellos se encuentran algunos que son parásitos y causan daño a vegetales, animales y al hombre.

Frente a un contaminante común se debe realizar:

- 1°) Observación macroscópica de la colonia
- 2°) Observación microscópica con lactofenol o solución fisiológica

Los Deuteromycetes frecuentemente encontrados contaminando cultivos son: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Curvularia*, *Escopulariopsis*, *Trichotecium*, *Fusarium*, etc.

• *Penicillium*

Observación macroscópica: la colonia crece rápidamente (50 mm. de diámetro en 8 días), es al principio blanca, pero después toma color verde azulado y aspecto muy polvoriento debido a la abundante producción de conidios a partir del micelio aéreo.

Observación microscópica: las hifas portadoras de conidios forman el pincel o cepillo. Los conidios aparecen en cadenas no ramificadas y parten de los extremos de los esterigmas los cuales se hallan dispuestos en verticilio, en los extremos de pequeñas pirámides o métulas que nacen de las ramas, del conidióforo (Figura 1).

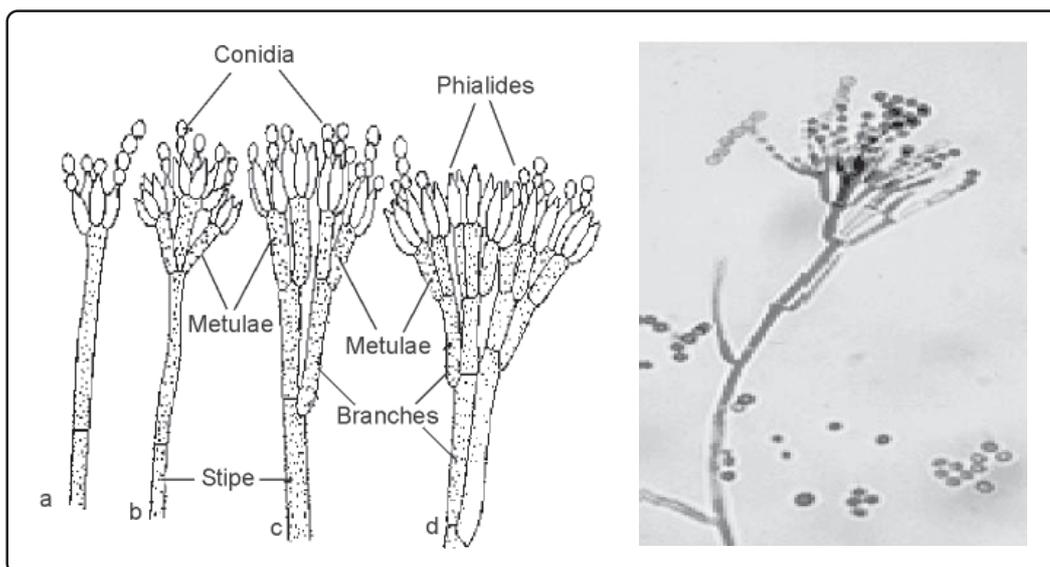


Figura N° 1

• *Aspergillus*

Observación macroscópica: la colonia compacta de crecimiento lento (28 mm de diámetro en 8 días) es al principio blanca variando la pigmentación posteriormente de acuerdo con la especie. Por ejemplo: en el *Aspergillus niger* se torna negra; en el *Aspergillus fumigatus* se torna verde-grisácea, etc.

Observación microscópica: la estructura portadora de conidios es una hifa alargada, no tabicada ni ramificada, que nace de una célula pie, en el micelio. Se ensancha en el extremo formando una vesícula, productora de esterigmas (disposición que varía de acuerdo con la especie). Por ejemplo, en el *Aspergillus niger* los esterigmas cubren totalmente la vesícula y en el *Aspergillus fumigatus* cubren la mitad de la vesícula. Los conidios parten de los extremos de los esterigmas, formando cadenas no ramificadas (Figura 2).

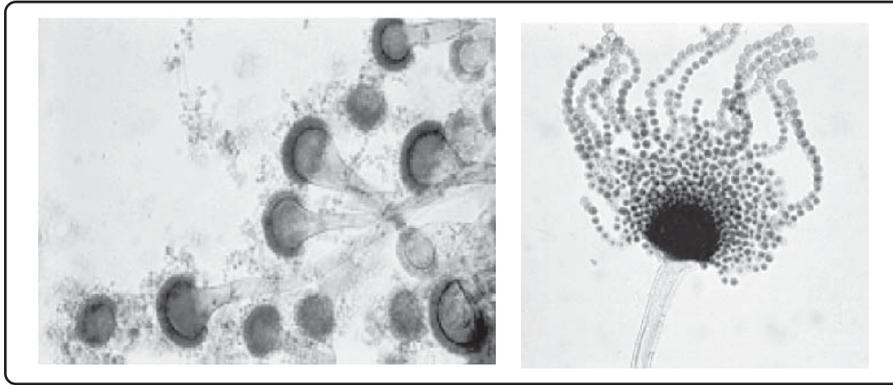


Figura N° 2

Observación macroscópica: la colonia es de crecimiento rápido (40 mm de diámetro en 4 días), desarrolla un micelio corto, gris al principio, después negro con periferia grisácea. El reverso de la colonia es negro.

Observación microscópica: a partir de los extremos de los conidióforos se producen los conidios muriformes típicos en cadena, de color oscuro y con tabicaciones longitudinales y transversales. Cualquier célula del conidio puede producir un tubo germinal (Figura 3).



Figura N° 3

• ***Curvularia***

Observación macroscópica: Colonias de rápido crecimiento. Micelio aéreo corto, de color oscuro de marrón a negro. El reverso de la colonia es negro.

Observación microscópica: posee macroconidios pardos con tabicaciones transversales (Figura 4).



Figura N° 4

• ***Escopulariopsis***

Observación macroscópica: colonia de crecimiento lento (60 mm. de diámetro en 18 días), es al principio membranosa, rugosa y sin vellosidades, hasta que aparecen hifas aéreas y conidios que dan al cultivo aspecto polvoriento y color pardo claro.

Observación microscópica: las hifas portadoras de racimos de conidios se parecen superficialmente al pincel del *Penicillium*. Los esterigmas, que sostienen cadenas no ramificadas de conidios de pared rugosa, pueden agruparse en las ramas de un conidióforo corto o aparecer aisladas a lo largo de las hifas aéreas. Los conidios tienen forma característica de limón con vértice puntiagudo y base truncada (Figura 5).



Figura N° 5

• ***Trichotecium***

Observación macroscópica: hongo de crecimiento rápido (70 mm de diámetro en 9 días) que produce micelio aéreo algodonoso blanco que gradualmente toma color rosado.

Observación microscópica: conidióforo no ramificado, largo, delgado, portadores en su extremo de racimos de conidios bicelulares, piriformes de paredes lisas (Figura 6).

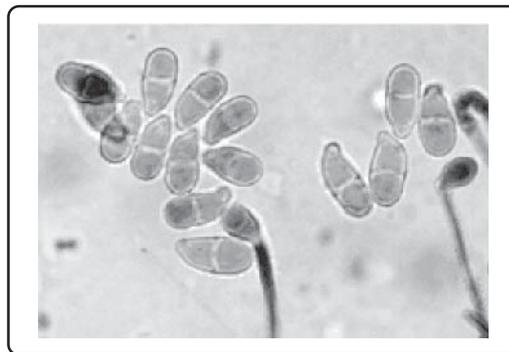


Figura N° 6

• ***Fusarium***

Observación macroscópica: hongo de crecimiento rápido, al principio blanco algodonoso, pero rápidamente desarrolla color rosa intenso en el centro y rosado claro en la periferia.

Observación microscópica: ramas cortas de hifas dan origen a conidios verticilados de los cuales parten conidios multitabcados, largos en forma de huso o de media luna, terminados en punta, típico del género (Figura 7).

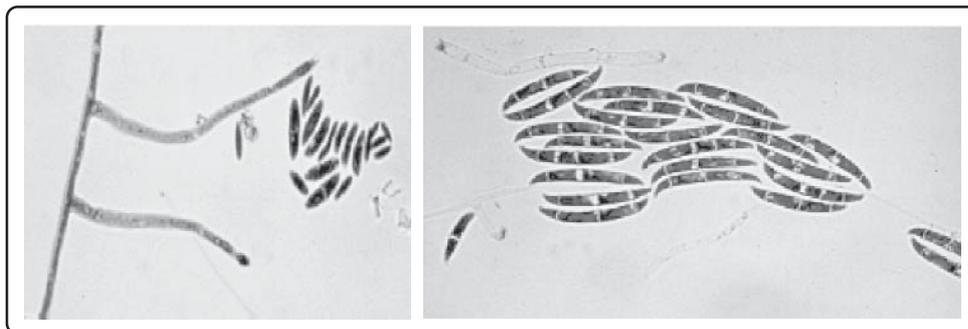


Figura N° 7

DESARROLLO PRÁCTICO

- 1) Observación macroscópica y microscópica de los hongos desarrollados en las cajas con Sabouraud y Czapek abiertas la clase anterior. Ver número de colonias según tiempo de exposición y lugar. Las cajas que no presentan desarrollo se continuarán incubando.
- 2) Observación de tubos con cultivos de Deuteromycetes provistos por la Cátedra.

Descripción macroscópica y microscópica:

a- Observación macroscópica se realizará teniendo en cuenta las siguientes características:

- **Velocidad de crecimiento:** lento, muy lento, rápido, moderado, etc.
- **Color en el anverso de la colonia y cambios de la misma:** uniforme, en zonas, en mosaico, etc. Todos los colores fugaces que se observan deben anotarse. A menudo varían en el contorno de las colonias en desarrollo.
- **Color de la colonia y cambios en el reverso de la misma.**
- **Textura:** lisa, pulverulenta, granular, algodonosa, aterciopelada.
- **Topografía general:** plana, convexa, regular, irregularmente plegada, etc.

b- Observación microscópica: usando una técnica estéril, extraer una pequeña porción de la colonia con un ansa. Colocar el material sobre una gota de lactofenol azul de algodón (líquido de montaje) y disgregar con dos ansas, si es necesario. Colocar un cubreobjetos, examinar a bajo aumento en el microscopio (x100) y luego con mayor aumento (x400). Para la identificación del hongo buscar las fructificaciones características de los distintos géneros.

3) **a-** Siembra de los Deuteromycetes en cajas de Sabouraud 20 y Czapeck (colonias gigantes), para observar velocidad de crecimiento.

b- Sembrar *Aspergillus fumigatus* en dos tubos con Sabouraud, e incubar a 37°C y a 45°C (para observar la termoresistencia de este hongo).

TRABAJO PRÁCTICO N° 4 SUBDIVISIÓN ZIGOMYCOTINA

Los Zigomicetes habitan en el agua, en el suelo, sobre cualquier sustrato que contenga sustancia orgánica (cáscara de frutas, etc.), o se encuentran constituyendo parte de la micoflora atmosférica de diversos hábitat. Pueden ser parásitos y saprofitos, algunos de gran importancia económica, como ciertas especies que son utilizadas en las industrias de las fermentaciones, mientras que unas pocas ocasionan enfermedades en los animales y en el hombre.

Se caracterizan por poseer un micelio **cenocítico** (no tabicado). El único septo que se forma de manera constante es el que separa los órganos especializados como el esporangio y zigosporas del micelio estéril. En algunos géneros aparecen septos en el micelio, pero este no es un carácter constante y además es poco frecuente.

La **reproducción asexual** tiene lugar por medio de esporangiosporas que se originan de forma endógena a partir de esporangios globosos o piriformes con o sin columela o en merosporangios. Un merosporangio carece de columela. Otra estructura presente en algunos Zygomycetes son los esporangiolos que están presentes en la Thamniaceae, Cunninghamellaceae y Chonephoraceae. Algunos géneros se caracterizan por poseer una apófisis. Otras estructuras son los estolones o hifas especializadas que se adhieren al sustrato por medio de los rizoides. Finalmente, en algunas especies se observa la formación de clamidosporas y de oídios en situación terminal o intercalar, de forma aislada o formando cadenas.

La **reproducción sexual** tiene lugar por fusión de dos gametangios multinucleados y de ello se origina una zigospora de color amarillento o marronáceo en ocasiones negrozco, cubierta de espinas u otro tipo de proyecciones externas. Las dos partes de la hifa que sostienen a la zigospora reciben el nombre de suspensores. En algunos géneros como *Absidia*, los suspensores poseen apéndices.

La **zigomicosis** es una enfermedad oportunista que engloba un amplio espectro de enfermedades causada por zigomicetos. El término “ficomicosis” debe ser desechado actualmente. Los agentes patógenos que causan la enfermedad en el hombre pertenecen a dos órdenes: Mucorales y Entomophthorales, designándose las enfermedades producidas por Mucorales como zigomicosis o mucormicosis, y las debidas a Entomophthorales, como entomofthoromicosis. Los zigomicetos producen un amplio espectro de enfermedades en el hombre, casi siempre en sujetos inmunodeprimidos que han tenido una terapia prolongada con antibióticos o esteroides; factores predisponentes como: diabetes mellitus, malnutrición, y raramente se presenta en huéspedes normales.

Los zigomicetos pertenecen a la clase *Zygomycetes*, orden Mucorales y Entomophthorales, géneros *Rhizopus*, *Absidia*, *Mucor* y *Rhizomucor*. En los últimos años se han descrito otras especies que, con menos frecuencia, ocasionan zigomicosis en el hombre, como: *Cunninghamella bertholletiae*, *Syncephalastrum*, *Mortierella wolfii* y otros. Dentro de los Entomophthorales, los géneros *Conidiobolus* y *Basidiobolus* son agentes de unas formas clíni-

cas de zigomicosis que aparecen en áreas geográficas restringidas, suelen localizarse en huéspedes sanos, tienen evolución crónica y afectan al tejido subcutáneo.

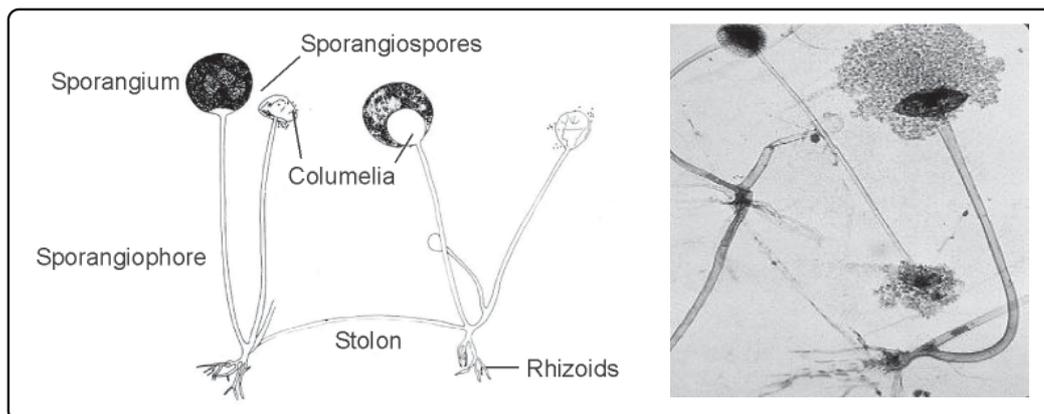
Todas estas enfermedades se caracterizan porque en los tejidos afectados se observan micelios anchos, no septados, irregularmente ramificados. Se debe recurrir a los cultivos para poder indentificar las distintas especies infectantes.

En la década de los setenta se describieron casos de origen nosocomial, adquiridos por contactos con apósitos, telas adhesivas, contaminadas. También se reportó brote nosocomial en enfermos leucémicos debido a la inhalación de grandes cantidades de esporas de zygomicetos por contaminación del sistema del aire acondicionado.

• *Rhizopus*

Características macroscópicas: el crecimiento es voluminoso y rápido, llenando la caja de Petri en unos 5 días. Presenta micelio aéreo filamentososo, grueso y lanoso, blanco al principio que se torna gris esparcido con puntos negros o marrones (esporangios).

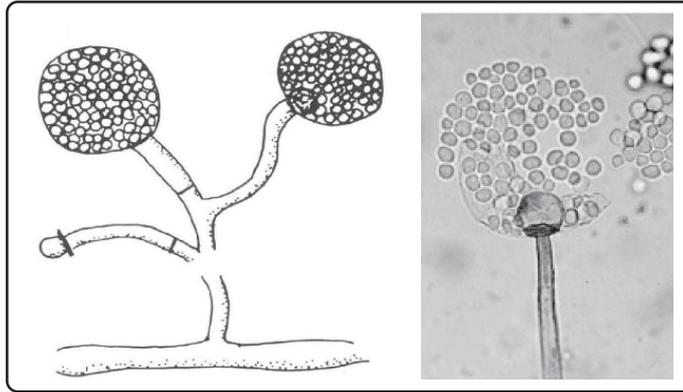
Características microscópicas: el micelio es no septado, el cuerpo de fructificación consiste en largos tallos (esporangióforos) sobremontados por esporangios esféricos. Los esporangios son de paredes oscuras, cuando maduran presentan una columella y están llenos de esporas hialinas esféricas. Los esporangióforos no son ramificados y aparecen en racimos en disposición opuesta al rizoide a lo largo de una rama horizontal (estolón).



• *Mucor*

Características macroscópicas: la colonia es de crecimiento rápido llenando la caja de Petri en 5 a 7 días con un micelio aéreo, esponjoso, que es primero blanco y luego se torna gris o marrón.

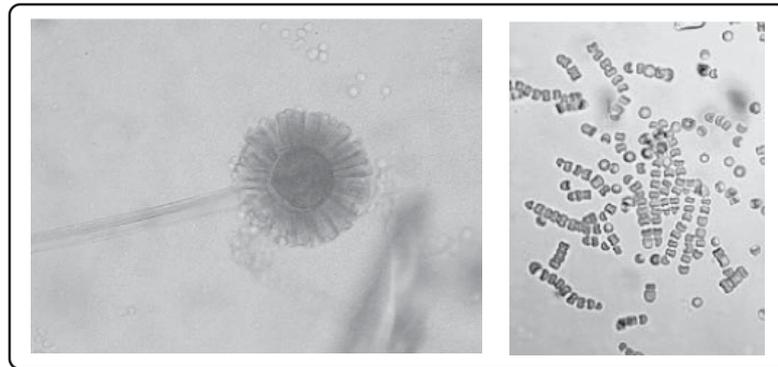
Características microscópicas: el micelio es no septado, sin color y sin rizoide (el micelio viejo puede mostrar una irregularidad en las paredes que semejan septas). El esporangióforo se eleva del micelio grueso y erecto como un tallo. Puede o no estar ramificado con un esporangio esférico terminal con muchas esporas. La columella está siempre y pueden quedar remanentes de la pared esporangial después que las esporas han salido liberadas, formando el collarete. Las zigosporas son producidas por algunas especies.



• ***Syncephalastrum***

Características macroscópicas: la colonia es de crecimiento rápido y exuberante, semejando a la colonia de *Rhizopus nigricans*.

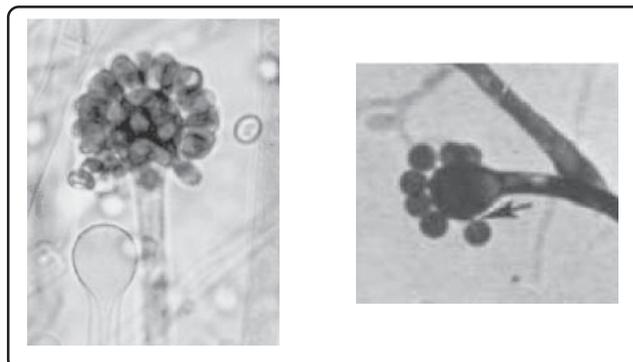
Características microscópicas: las esporas se forman en largos esporangios tubulares radiados desde un engrosamiento en el extremo del esporangióforo. Cuando se hacen preparados y se observan a pequeño aumento, las cabezas muestran un sorprendente parecido a las del *Aspergillus*. A gran aumento se ven las cadenas de esporas encerradas en membranas tubulares, y si se sigue el desarrollo de las estructuras de esporulación se observará que las esporas se forman exactamente como un tipo normal de esporangio.



• ***Cunningamella***

Características macroscópicas: micelio blanco, flocoso. Ligeramente engrosado y ramificado.

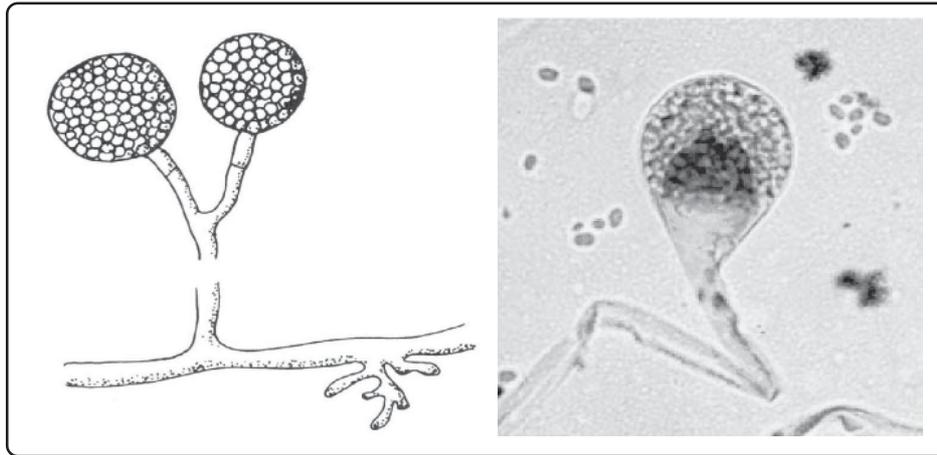
Características microscópicas: las hifas son ligeramente engrosadas, el eje principal así como las ramas laterales terminan en cabezas esféricas ornamentadas con pequeñas hinchazones que son el punto de inserción de los conidios. Los conidios son esféricos u ovals, frecuentemente con una irregularidad externa, la membrana externa es espinosa y con agujas de cristal. Las clamidosporas son globosas intercalándose en el micelio.



• **Absidia**

Características macroscópicas: colonias blancas al principio, luego gris pálido, velloso y de crecimiento muy rápido; es capaz de cubrir casi una placa de Petri en 24 horas a 37°C, y prospera más que la mayoría de los hongos en los medios bacteriológicos.

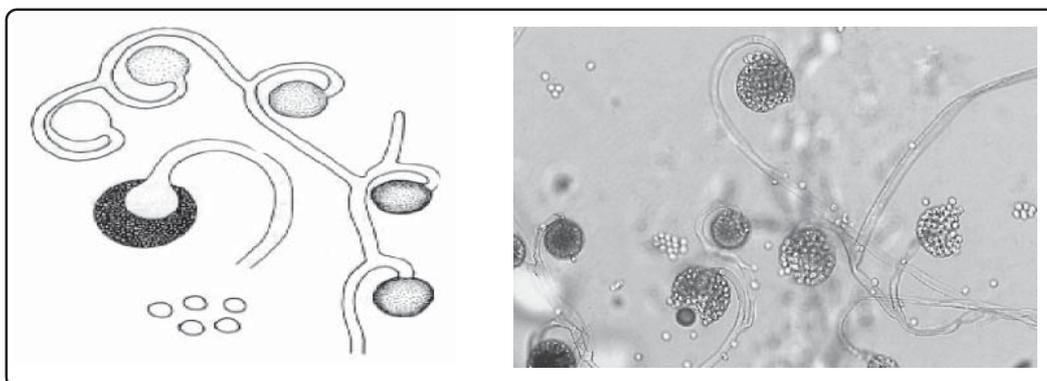
Características microscópicas: el género difiere en varios aspectos del *Rhizopus*. Los rizoides y estolones no están claramente diferenciados; los esporangióforos nacen de los estolones y no de los puntos de unión de los rizoides. Los esporangios son relativamente pequeños y piriformes, el rango más característico de todo es la presencia de una apófisis bien definida, es decir, un pie o una prominencia infundibuliforme del esporangio en el punto en que se unen las paredes de este y la columella.



• **Circinella:**

Observación macroscópica: según las especies, la pigmentación de las colonias puede variar del marrón al gris. El micelio es corto.

Observación microscópica: los esporangios son globosos, habitualmente envueltos con esporangiosporas de color amarillo-marrón. Se originan en esporangióforos delgados que característicamente se curvan sobre sí mismos, un aspecto del cual deriva el nombre del hongo (*circinus*-círculo). La punta de los mismos crece indefinidamente y nunca termina en un esporangio, las ramas laterales son curvadas y llevan en sus extremos esporangios de variadas dimensiones. Los esporangios son multiesporados esféricos, con incrustaciones de oxalato de calcio en las paredes. Las esporas son esféricas u ovals. Las zygosporas nacen sobre hifas erectas distintas de los esporangióforos. Los supensores no tienen accesorios.



DESARROLLO PRÁCTICO

1º) El instructor dará las indicaciones de cómo observar un cultivo de Zygomycetes, qué observaciones deberá hacerse y cómo se realiza un preparado para su posterior observación microscópica.

2º) Los alumnos deberán:

- a- Hacer preparados con lactofenol azul de algodón del aparato esporífero.
- b- Observar las formas jóvenes, intermedias, y las viejas zigosporas de los Zygomycetes.
- c- Dibujar cada una de las estructuras de preparados apropiados controlados por el instructor.
- d- Sembrar las cepas proporcionadas por la cátedra en tubos de Sabouraud y Czapeck.
- e- Efectuar colonias gigantes de los géneros mencionados anteriormente.
- f- Continuar la identificación de los contaminantes del aire y de las colonias de Deuteromycetes. Los datos se volcarán en Cuadros con las siguientes características:

DESCRIPCIÓN DE LAS COLONIAS							
Nombre	Medio de cultivo	Velocidad de crecimiento	Color en la superficie	Color en el reverso	Topografía	Textura	Bordes

DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA			
Nombre	Tipo de micelio	Tipo de esporo	Forma de fructificación

TRABAJO PRÁCTICO N° 5 SUDIVISIÓN BASIDIOMYCOTINA

El filo Basidiomycetes con unas 22.000 especies constituye el segundo grupo más importante después de los Ascomycetes. Viven sobre todo en medios terrestres. Se caracterizan por producir, al final de su ciclo de vida, unas estructuras reproductoras que son los basidios, que se localizan en las puntas de las hifas, sobre unos salientes con forma de tallo. Lo normal es que, en cada basidio, se formen cuatro basidiosporas. Los basidios pueden ser con forma de maza, cilíndricos u ovals.

En Basidiomycetes podemos encontrar tres tipos de micelio dependiendo de que las hifas que lo constituyen sean monocarióticas o dicarióticas, y haploides o diploides. Las hifas son septadas. Cada septo está atravesado por un poro selectivo (doliporo) encargado de regular el flujo de protoplasma entre dos hifas contiguas.

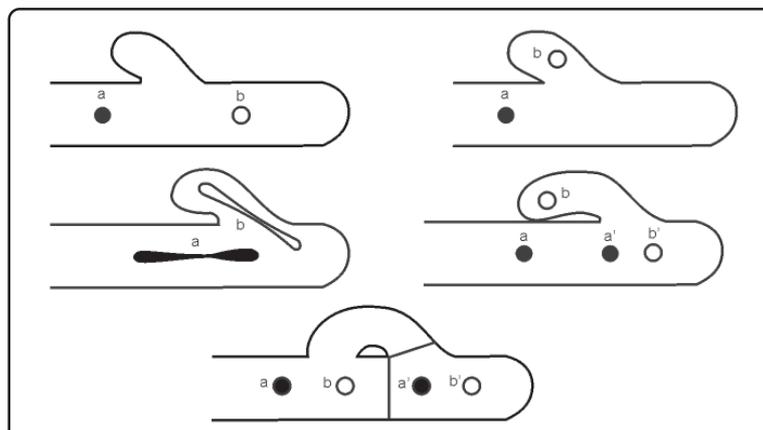
Las estructuras típicas de los basidiomycetes son: **a) micelio dicariótico, b) el basidio, c) la formación de fibula, y d) el tabique doliporo-parentosoma.**

MICELIO

El micelio, en su ciclo de vida, pasa por tres estadios:

-micelio primario: se desarrolla a partir de la germinación de la basidiospora. Al principio puede ser multinucleado ya que el núcleo de la basidiospora se divide muchas veces; inmediatamente se forman los tabiques que dividen el micelio en células uninucleadas. Por lo tanto, el micelio es **tabicado y uninucleado**.

-micelio secundario: se origina del micelio primario. Sus células son **típicamente binucleadas**. El estadio binucleado comienza cuando se fusionan los protoplasmas de dos células uninucleadas, sin que haya cariogamia. La célula binucleada que así se forma produce una rama o estructura especial llamada fibula, a la cual migra un par de núcleos. Los mismos se dividen y los núcleos hermanos se distribuyen en dos células hijas para iniciar así el micelio

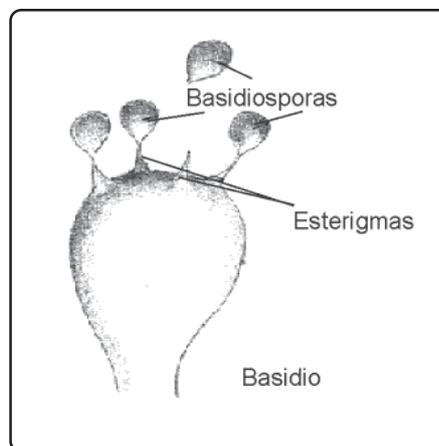
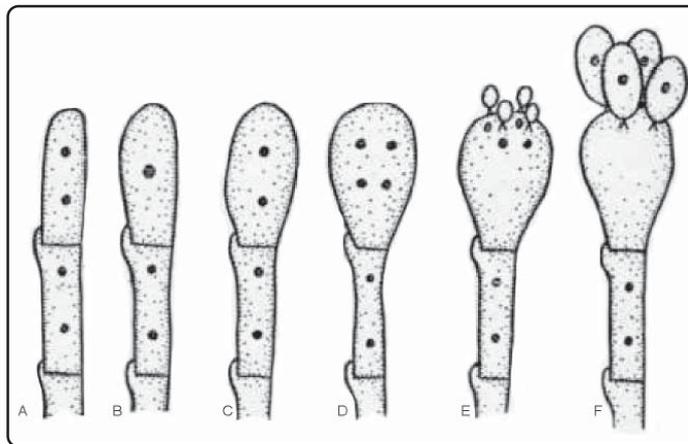


-micelio terciario: está representado por los tejidos que forman el esporóforo o conidióforo de los basidiomycetes superiores. Las células en este estadio son **binucleadas**.

BASIDIO

Estructura típica de los basidiomycetes. Se origina como una célula terminal binucleada separada por un tabique a cuyo lado se encuentra una fíbula.

Al principio el basidio es alargado y angosto, pronto se agranda y se hace más ancho; mientras ocurren estos cambios se produce la cariogamia (fusión de dos núcleos). Luego el cigoto sufre meiosis, dando lugar a cuatro núcleos haploides. Entre tanto emergen cuatro esterigmas en el extremo del basidio, para formar cuatro basidiosporas, los núcleos migran hacia las jóvenes basidiosporas. Queda así formado el basidio con cuatro basidiosporas.



FÍBULA

Estructuras en forma de codo o hebilla que participan en la formación del micelio dicariótico.

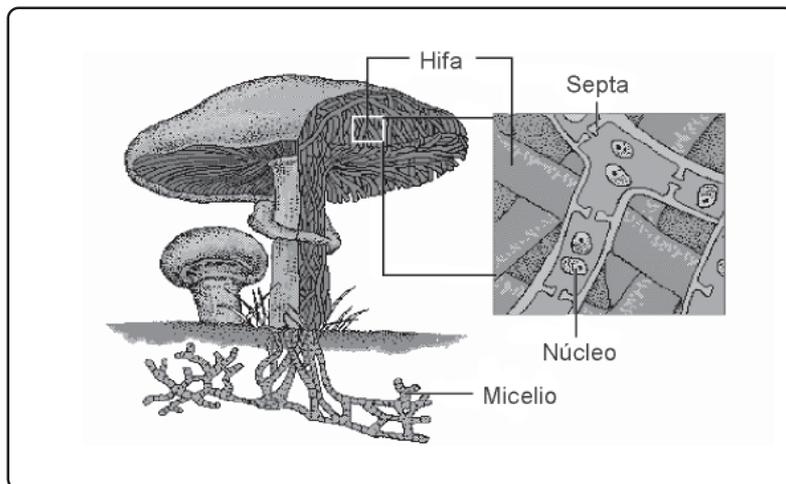
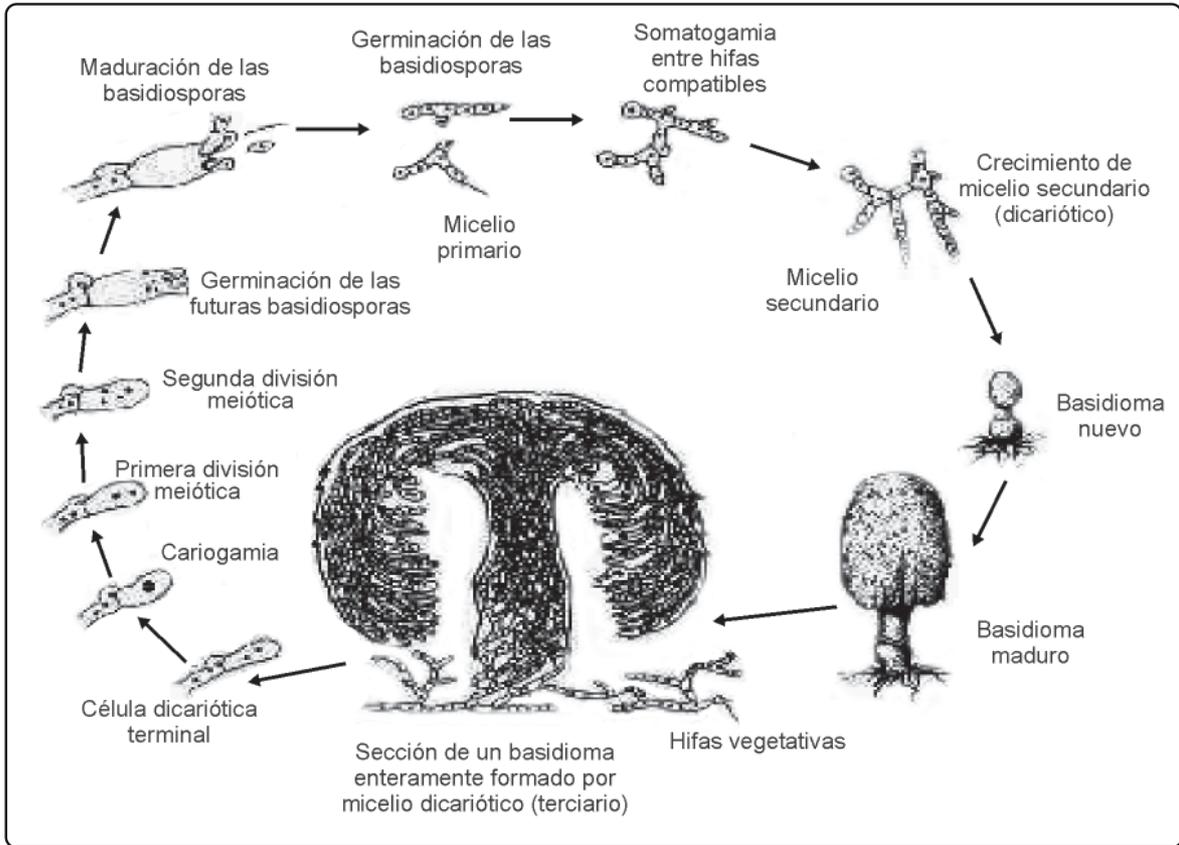
TABIQUE DOLIPORO - PARENTOSOMA

- rodeado por una dilatación en forma de barril situada en el centro de la pared septal;
- recubierto a uno y otro lado por una estructura membranosa en forma de cúpula, el parentosoma, banda de cierre o casquete del poro central, formado por retículo endoplásmico modificado, como parte integrante y funcional del aparato septal.

Función:

- controla el paso de ciertas estructuras celulares;
- relacionado con las migraciones nucleares ligadas a la dicariorización, en cuyo momento se destruye;
- relacionado con la formación de los basidiocarpos.

CICLO DE VIDA DE LOS BASIDIOMYCETES



CLASIFICACIÓN DE LOS BASIDIOMYCETES

La clase Basidiomycetes se subdivide en dos subclases: **Homobasidiomycetidae** y **Heterobasidiomycetidae**.

Homobasidiomycetidae: los basidios son claviformes, no tabicados que llevan sobre los esterigmas cuatro basidiosporas. Los hongos que se incluyen en esta subclase son los que conoce la mayoría de la gente: setas, hongos en ménsula, hongos corales, estrellas de tierra, etc. Son los más evolucionados de todos los hongos en la escala de progresión orgánica.

Dentro de los Homobasidiomycetidae se pueden distinguir dos grupos: **Hymenomyces** y **Gasteromyces**

- **Hymenomyces:** llevan los basidios en un himenio bien definido, que queda al descubierto cuando las basidiosporas son jóvenes todavía. Se clasifican a su vez en dos grandes órdenes: **Poliporales** y **Agaricales**.

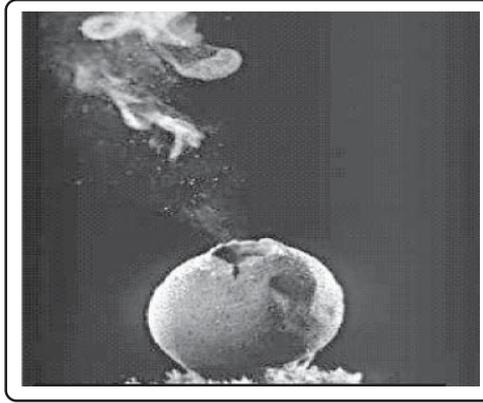
Poliporales: dentro de este orden se ubican generalmente hongos en ménsula, costra repisa. Son de textura dura o leñosa, el himenio está dispuesto en forma de tubos o poros. Estas especies atacan y destruyen la madera.



Agaricales: incluyen los hongos en seta o sombrilla. Son generalmente de texturas carnosas, llevan los basidios en un estrato himenial en forma de láminas. Dentro de este orden están los hongos comestibles y venenosos.



Gasteromyces: los cuerpos fructíferos permanecen cerrados, o se abren solo cuando las esporas han madurado. En este grupo se incluyen los bejines, estrella de tierra, cuscoco de lobo, hongos en nido de pájaros.



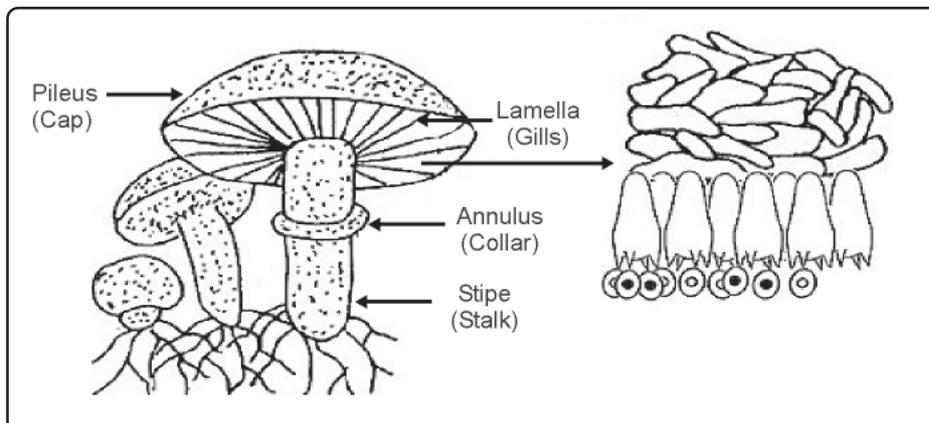
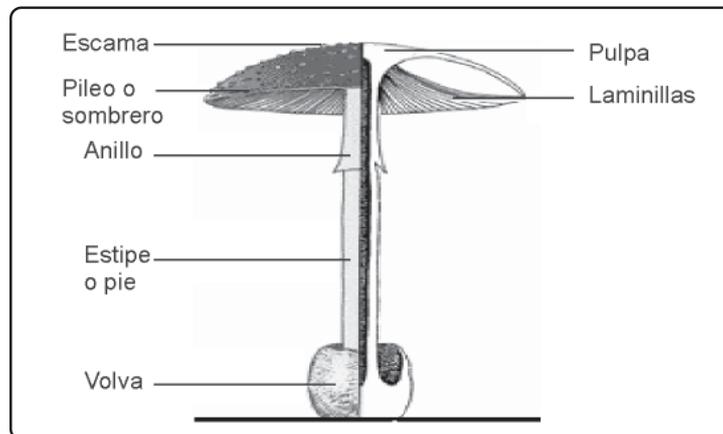
Heterobasidiomycetidae: son los hongos gelatinosos, royas y carbones. Los primeros son masas gelatinosas, que no parasitan las plantas, pero sí son útiles en la producción de carotenoides.

Las **royas** parasitan cereales, vegetales, causando grandes pérdidas de cultivos.

Carbones: se designan así porque forman masas pulverulentas de esporas negras, que se parecen al hollín o tizne. Parasitan vegetales y cereales, pero su parasitismo no es obligado.

CARACTERÍSTICAS DE LOS BASIDIOMYCETES

1- Forma de seta o sombrero: posee una sombrilla superior y un pie que lo sostiene. El sombrero puede tener forma de campana, ovoide, claviforme, plana, etc. El pie varía en forma y ubicación.



El velo general encierra al hongo joven en una túnica que se rompe cuando el embrión crece. El velo parcial es una formación interna que se rompe hacia abajo donde nace el himenio. Los restos de este velo se conservan en forma de anillo que rodean al pie. Es decir que el anillo está formado por trazas fibrinosas y membranosas que constituyen vestigios del velo parcial. El anillo puede ser superior o descendente, mediano o inferior, simple o doble. Cuando está en la parte inferior del pie para evadirse hacia lo alto constituye un collarete. La volva es una estructura membranosa en forma de saco enterrada en la base del pie. La volva puede romperse o reducirse a pústulas.

2- Carpóforo: es la parte del hongo que asoma fuera de la madera, pueden ser de forma muy variada. Hay dos formas principales:

- la de plataforma saliente, **ménsula o repisa**, posee forma de lengua o disco, con la zona de inserción más gruesa y el borde libre más estrecho y de una tendencia semicircular;
- la forma **resupinada** es cuando está recubriendo el soporte, o sea que está solamente reducida a la superficie himenial.

Del carpóforo se estudian las siguientes características:

Color: posee diversos colores que varían con la edad y el ambiente por lo que no es decisivo para su clasificación. Algunos producen el fenómeno de fluorescencia.

Consistencia: las formas de seta son carnosas, las formas de ménsula suelen ser tan duras como la madera que las sostiene. Los de consistencia gelatinosa se los puede considerar como un grupo aparte. La mayor o menor consistencia depende de la cantidad de hifas en su trama. El carpóforo aparece en el exterior si hay condiciones de temperatura y humedad adecuada. No resisten las bajas temperaturas, vientos, climas secos, etc.

3- Formas de sombrero: plano, arqueado, convexo, hemisférico, campanuliforme, ovoide, truncado, ojival, deprimido, infundibuliforme.

4- Ubicación del pie: central, excéntrico, lateral, sub-lateral excéntrico.

5- Formas de pie o tronco: delgado, cilíndrico, flexuoso, ondulado, adelgazado, hinchado, bulboso, claviforme.

6- Himenio: es la parte del carpóforo donde se encuentran los basidios. El himenio se halla como una cubierta generalmente localizada en la parte inferior del carpóforo, para permitir la libre caída de las esporas. El himenio puede adquirir dos formas:

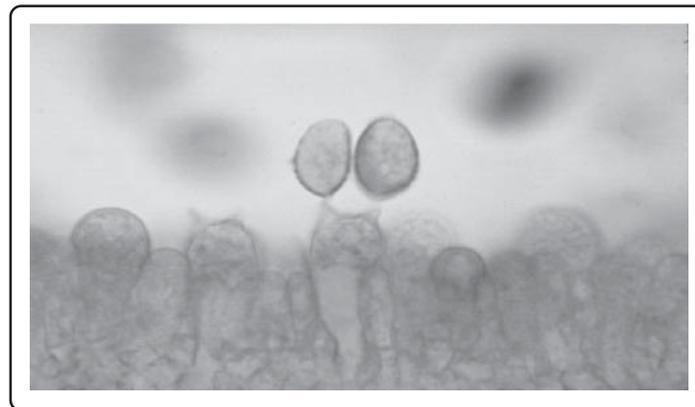
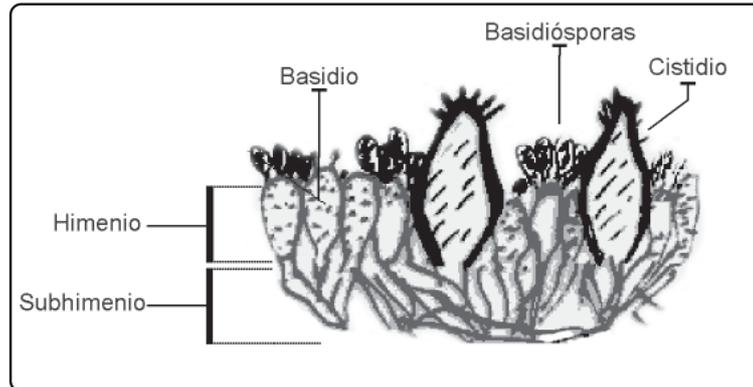
a- forma de láminas: donde interesa observar el color, grosor, anchura, abundancia, forma de filo, su relación con el pie

- libre: cuando las láminas no llegan hasta el pie
- adherentes: cuando llegan hasta el pie
- recurrentes: tocan el pie y además bajas adheridas a él



b- forma de poros: (poliporáceos) formados por tubos que terminan en poros. Varían en forma: redondos, angular, poligonal, desiguales, etc; tamaño y disposición. **Los poros se observan mediante corte transversal de los tubos.**

7- Elementos estériles del himenio: se denomina hifidios a los elementos estériles de las hifas que nacen en el aparato reproductor fúngico, aparecen en el himenio joven antes que los basidios y conservan las características de hifas. Se nombran como: cistidios verdaderos, cistidios tramales, gleocistidios, leptocistidios, lamprocistidios, quilocistidios, quetas o pelos. Los cistidios pueden tener diferentes formas, ser incoloros o coloreados.



¿HONGOS COMESTIBLES O VENENOSOS?

Es necesario afirmar que ninguna técnica popular de identificación de hongos venenosos tiene valor.

El método científico consiste en el reconocimiento de las siguientes características morfológicas:

- **Color:** los venenosos son de colores vivos y atrayentes, mientras que los comestibles son claros, exceptuando la *Amanita phalloides* que es color blanquecino.
- **Himenio:** los venenosos poseen esporas claras o rosadas, tonalidad que persiste sin variación durante la vida del hongo.
- **Volva y anillo:** todos los hongos venenosos poseen esas dos características, son elementos esenciales para su identificación.

Como estas características de las especies pueden variar por rotura, acción de animales, etc. es mejor desecharlas y consumir hongos cultivados. No corra riesgos.

MICETISMO: intoxicación por la ingestión de hongos venenosos.

Formas clínicas: tipos de intoxicación según período de incubación

-Hongos de acción lenta: dentro de las 6 a 24 horas de la ingestión.

-Hongos de acción rápida: 30 minutos a 3 horas.

Hongos de acción lenta: la respuesta a la ingestión de *Amanita phalloides* y sus variedades *A. verna* y *A. virosa* se inicia con un período silencioso o de latencia asintomático, variable de acuerdo con la cantidad de toxina absorbida. Los primeros síntomas son gastrointestinales (vómitos, diarreas profusas cada 15 a 30 min.). Puede morir en este período o pasar a la etapa terminal de hepatitis, con atrofia aguda de hígado, estado de coma y muerte. Poseen potentes toxinas termoestables denominadas amanitinas. En nuestro país se ha encontrado *Amanita phalloides* en las zonas de Mar del Plata, La Plata, Tandil. Abundan al final del verano y principios del otoño.

Hongos de acción rápida: dentro de las dos horas de la ingestión se produce un cuadro gastrointestinal de irritación, que remite a los 2 ó 3 días sin dejar secuelas. Especies causales: *Agaricus*, *Boletus*, *Tricholoma* y otros. Además del síndrome irritativo gastrointestinal, algunas especies afectan al sistema nervioso central. *Amanita muscaria*, *Amanita pantherica*, produce el síndrome neurológico, de delirio o iboténico, con vértigo, somnolencia, midriasis, hiperactividad, temblores, delirio, confusión y alucinaciones pudiendo evolucionar hacia estupor y coma.

MICOTOXICOSIS: intoxicación por la ingesta de micotoxinas.

Las micotoxinas son productos naturales procedentes del metabolismo de diferentes especies de hongos microscópicos, que al ser ingeridos en pequeñas cantidades por el hombre o los animales les ocasionan trastornos de naturaleza tóxica.

Entre los mohos productores de toxinas se encuentran: *Claviceps purpúrea*, *Aspergillus* (*A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. versicolor*, etc), *Penicillium spp*, *Alternaria spp*, *Fusarium spp* y muchas otras.

Según la dosis ingerida y el tipo de micotoxina se pueden producir cuadros agudos o crónicos.

DESARROLLO PRÁCTICO

1- Observación macroscópica: examinar, describir, dibujar los hongos, color, textura, olor, velos, anillos, ornamentaciones, inserción del carpóforo, el pie, etc.

2- Examinar y dibujar la capa himenial: himenio en láminas, en poros, en tubos.

3- Observación microscópica: se demostrará al alumno cómo realizar los cortes para la observación. Buscar y dibujar basidios, fibulas, hifas, cistidios, poros.

4- Observación de basidiosporas: color, forma, tamaño, coloración, ornamentaciones, etc.

5- Con hongos frescos preparar una esporada: golpear suavemente el carpóforo de los hongos sobre un papel para observar el color de las basidiosporas en masa. En caso de trabajar con poliporaráceos rodearlos de un algodón húmedo bajo campana.

6- Sembrar Basidiomycetes en: agar extracto de malta, agar harina de maíz, agar Czapek.

7- Aislamiento de hongos de la madera: observación macro y microscópica de una madera atacada. Cultivo de la misma en agar extracto de malta.

TRABAJO PRÁCTICO N° 6 SUBDIVISIÓN ASCOMYCOTINA

Los Ascomycetes se caracterizan por presentar dos fases reproductoras distintas: el **asco o estado sexual** y el **estado conidial o asexual**.

El asco es el carácter principal que distingue a los Ascomycetes de los demás hongos, se trata de una estructura de forma de saca que contiene una cantidad, por lo general determinada, de ascosporas que se producen como resultado de copulación sexual de dos individuos compatibles, cariogamia y meiosis. Típicamente se forman ocho ascosporas dentro de cada asco, pero este número puede variar según la especie, desde uno hasta mil. Otros caracteres de los Ascomycetes son: el **micelio septado**, en la mayoría de las especies la formación de un **cuerpo fructífero (ascocarpo)** que lleva los ascos, y la **ausencia** de todo tipo de **célula flagelada**.

Pero estos caracteres secundarios también se presentan en otros hongos. De modo definitivo, si un hongo produce sus esporas dentro de ascos se trata de un ascomiceto y no es necesario considerar ningún otro carácter.

Los Ascomycetes en general tienen dos fases reproductoras distintas, el asco o estado sexual, a menudo llamado estado perfecto, y el estado conidial o asexual a menudo llamado estado imperfecto. Hay sin embargo una cantidad de Ascomycetes cuyos estados perfectos o sexuales no se han hallado todavía, y por sus estados conidiales se los estudia entonces en la clase Deuteromycetes.

Reproducción asexual: en los Ascomycetes la reproducción asexual según las especies y las condiciones ambientales puede hacerse por fisión, gemación, fragmentación o formación de artrosporas, clamidosporas o conidios. La mayoría de los conidios se forman de manera aislada o bien a partir de un conidióforo. En otras ocasiones, los conidios se forman a partir de estructuras complejas u ornamentadas. Finalmente los conidios pueden estar contenidos en unas estructuras llamadas cuerpos fructíferos, como son los picnidios, acérvulos, esporodoquios o synemas (Figura 1).

Reproducción sexual: la reproducción sexual en los Ascomycetes, al igual que en otros organismos vivos, se produce por la unión de dos núcleos compatibles. Estos núcleos se reúnen en una misma célula por alguno de los muchos métodos que los Ascomycetes han desarrollado durante su evolución. Aquí dos núcleos permanecen en estrecha asociación y sufren sucesivas divisiones que generalmente van a dar una cantidad de células dicarióticas. Posteriormente la fusión nuclear tiene lugar en la célula madre del asco que se desarrolla para dar un asco. La meiosis del núcleo diploide del cigoto se produce casi inmediatamente después de la fusión y va a originar cuatro núcleos haploides. Estos cuatro se dividen por mitosis y se forman ocho núcleos que van a formar las ocho ascosporas que típicamente producen ascos.

Los Ascomycetes se pueden dividir en cinco categorías según la forma de llevar los ascos (Figura 2):

- Los que llevan los **ascos desnudos** y carecen de cuerpo fructíferos.
- Los que llevan los ascos dentro de un ascocarpio completamente cerrado llamado **cleistotecio**.
- Los que tienen un ascocarpio cerrado, **peritecio** que a la madurez está provisto de un poro u ostiolo a través del cual escapan las ascosporas.
- Los que producen sus ascos en un ascocarpio parcialmente abiertos llamados **apotecios**.
- Los que forman los ascos directamente **en una cavidad (lóculo) dentro del estroma**.

Figura 1: Cuerpos fructíferos con conidios (asexuales): a) *picnideo*; b) *acérvulo*; c) *esporodoquio*; d) *synema*

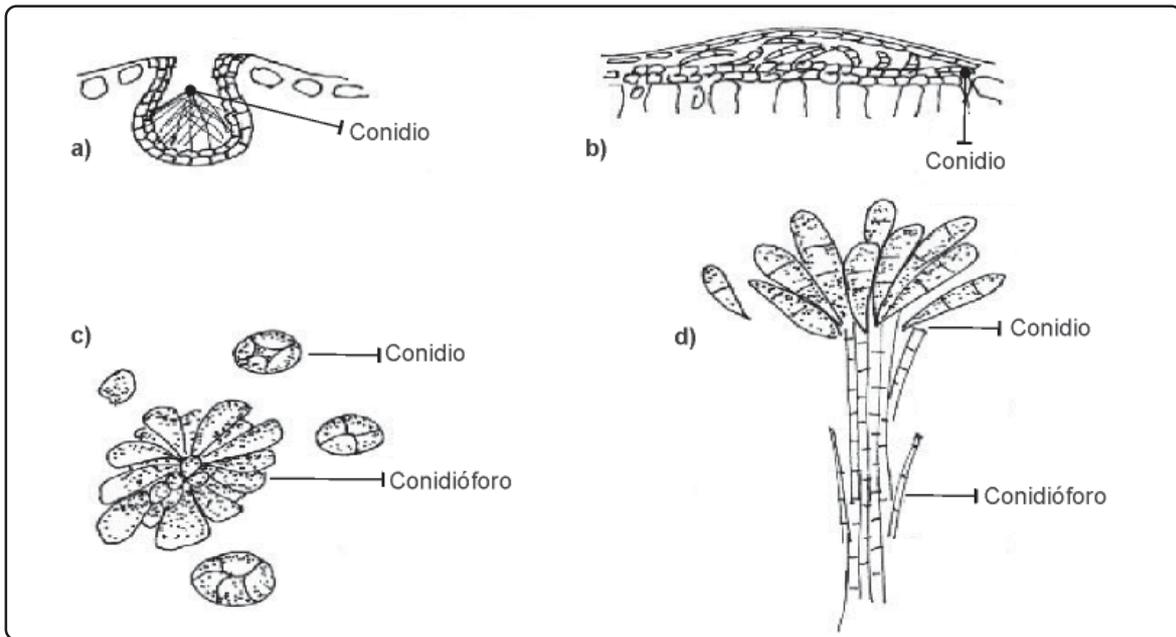
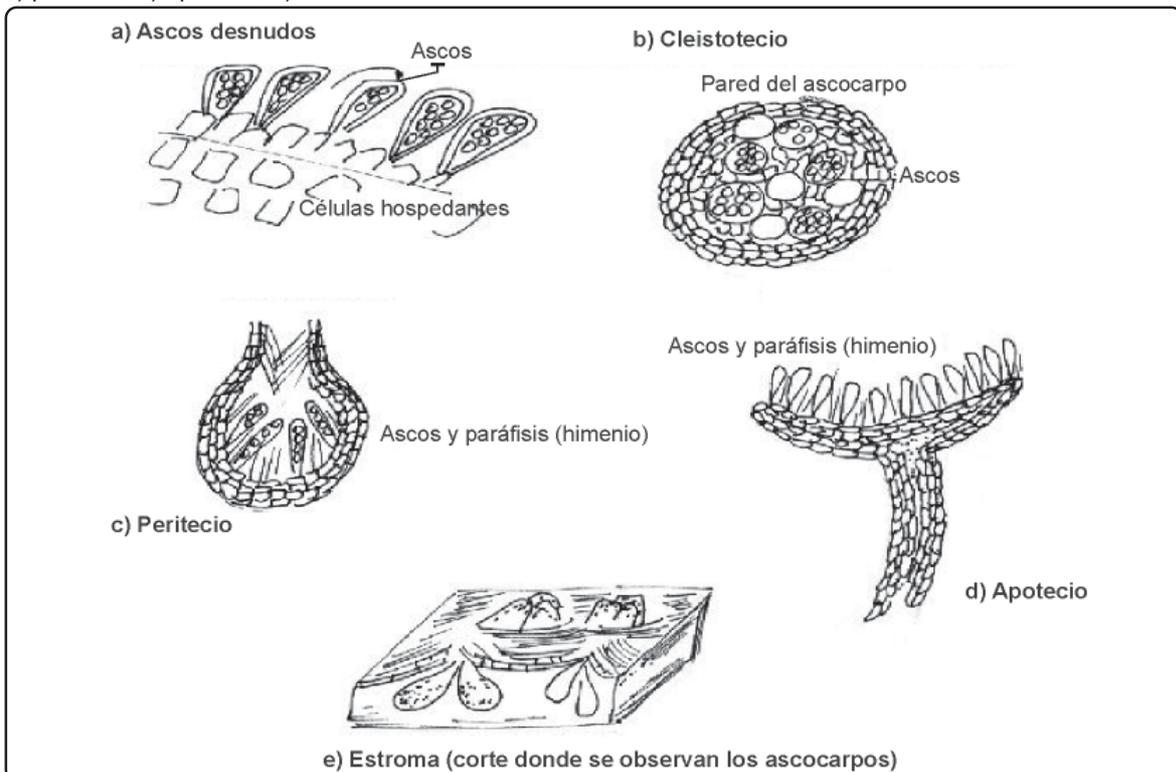


Figura 2: Distintas manera de llevar sus ascos los *Ascomycetes*: a) ascos desnudos, b) cleistotecio, c) peritecio, d) apotecio, e) estroma.



La familia Gymnoascaceae constituye un grupo muy importante, porque algunos miembros de esta familia son los estados perfectos de hongos que causan enfermedades de la piel (Dermatofitos) y micosis profundas en el hombre y en animales. Los dermatofitos que pertenecen a esta familia muestran ascos pertenecientes a los géneros *Arthroderma* y *Nannizzia* (Figura 3).

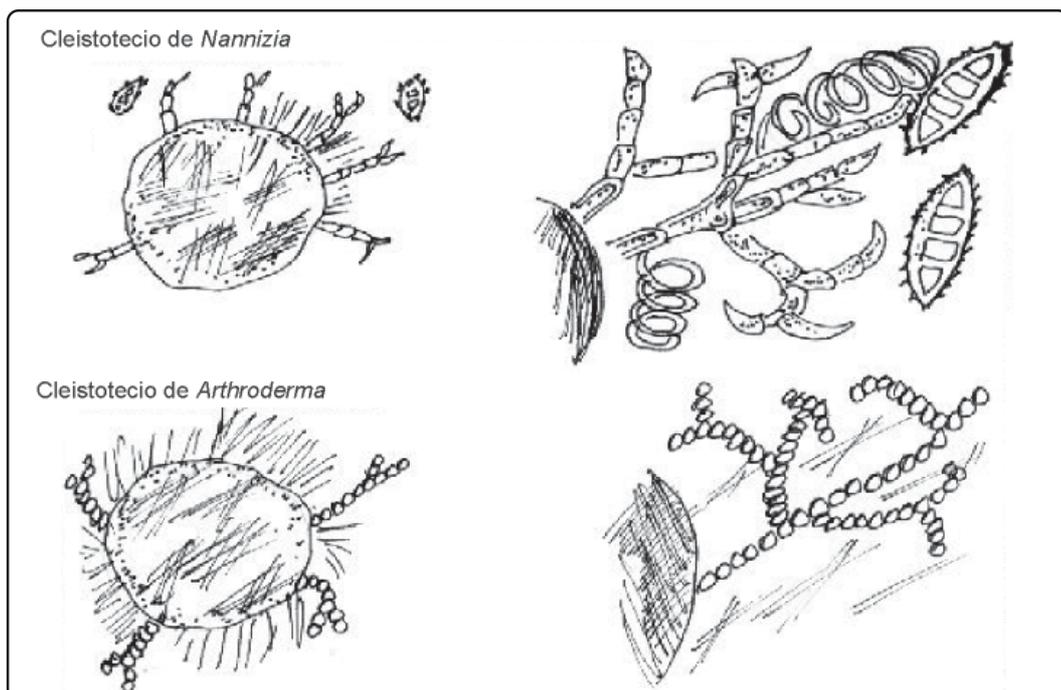
En la familia Gymnoascaceae el asco está rodeado de una red laxa de hifas que está constituido por un cleistotecio flojamente entretejido, con apéndices característicos (hifas peridiales) o sin ellos. Tales apéndices tienen valor taxonómico para distinguir entre los doce géneros que tiene esta familia.

***Nannizzia*:** cleistotecio globoso. El peridio consiste de una red de hifas hialinas septadas, que se ramifican verticiladamente. Las células son de paredes moderadamente gruesas, densamente ásperas y más o menos constreñidas simétricamente. Las hifas se presentan con numerosos extremos libres, y con apéndices de tres clases:

- 1) alargados, largos, delgados, con paredes laxas, septados, ocasionalmente ramificados, con extremos lisos o con extremos arrollados flojamente;
- 2) largos, delgados, paredes lisas, septados, ocasionalmente ramificados, con extremos fuertemente arrollados;
- 3) con macroconidios, ascos globosos, u ovales, hialinos, con ocho esporas. Ascosporas: amarillas, lenticulares.

***Arthroderma*:** cleistotecio blanquecino o amarillo pálido, globoso. El peridio constituido por una red de ramas anastomosadas, casi hialinas, compuestas de paredes gruesas, densamente ásperas, constreñidas simétricamente o asimétricamente, con células como rosario, unas pocas delgadas y altas de paredes delgadas, septadas, con apéndices en espiral producidos terminal o lateralmente, con numerosos extremos libres. Ascos globosos con ocho ascosporas amarillas en masas, pequeñas, lisas que observadas con contraste de fase, parecen tener un ligero corte o escotadura ecuatorial. Aleuriesporas en forma de clava se producen en cantidad por las hifas vegetativas.

Figura 3



Las verdaderas levaduras se clasifican como Ascomycetes. Estas poseen un talo predominantemente unicelular, se reproducen asexualmente por gemación, división transversal (fisión) o por ambas, y producen ascosporas en un asco desnudo que se origina de un cigoto o partenogénicamente de una sola célula somática. En las levaduras, la unión sexual se realiza entre dos células somáticas, o bien entre dos ascosporas que asumen la función de gametangios; estos elementos se unen y forman un cigoto. Posteriormente se forma un asco, el cual contiene ascosporas cuyo número depende de las divisiones nucleares que se han producido y del desarrollo ulterior de los núcleos. El número corriente de ascosporas es de 4-8 por asco; pueden hallarse en otra cantidad.

DESARROLLO PRÁCTICO

1) El instructor describirá las condiciones para la inducción de los cuerpos fructíferos en cada hongo estudiado e indicará cómo se deben montar los preparados para la observación microscópica.

2) Los alumnos realizarán lo siguiente:

a- hacer preparados con lactofenol de los ascos, cleistotecios de los cultivos recibidos. Dibujar las ascosporas y los ascos;

b- dibujar los ascos y ascosporas de *Sacharomyces*. Teñir las ascosporas de *Sacharomyces* con verde de malaquita;

c- dibujar marcando las diferencias entre los cleistotecios de *Eurotium*, y *Gymnoascus*; peritecios de *Neurospora*; esclerocios de *Claviceps* sobre trigo.

TRABAJO PRÁCTICO N° 7

MICOSIS SUPERFICIALES Y CUTÁNEAS

I- MICOSIS SUPERFICIALES

Entre las infecciones superficiales se incluyen las enfermedades en las cuales suele faltar la respuesta celular del huésped, porque los microorganismos están demasiado lejos del tejido vivo, o la infección es inocua. En forma esencial no hay patología alguna por la presencia del hongo, y los pacientes pueden no darse cuenta de su trastorno. En estas enfermedades el paciente busca la atención del médico por los efectos estéticos que le causan. Dentro de estas micosis tenemos las que afectan epidermis como la pitiriasis versicolor y tiña negra, y las que afectan pelos (piedras).

PITIRIASIS VERSICOLOR

Definición: es una infección crónica, en general asintomática, del estrato córneo. Las lesiones se caracterizan por tener consistencia furfurácea o parecida al salvado; las áreas afectadas presentan cambios de color, pueden estar hipopigmentadas o hiperpigmentadas. Las zonas principales que afecta son: tórax, abdomen, miembros superiores y espalda.

Agente etiológico: varias especies de la levadura lipofílica *Malassezia* que es parte de la flora normal de la piel humana (*M. furfur*, *M. obtusa*, *M. pachydermatis*, *M. restricta*, *M. globosa*, *M. sympodialis*, *M. slooffiae*).

Diagnóstico clínico y micológico: el diagnóstico se basa en la típica apariencia clínica en combinación con una fluorescencia brillante verdoso-amarillenta con la luz de Wood y el examen directo positivo.

El examen directo es el de mayor importancia porque los característicos conglomerados de elementos levaduriformes asociados a hifas cortas, “aspecto de spaghetti con albóndigas”, son fácilmente identificables. Se puede utilizar hidróxido de potasio al 20% o bien una mezcla de partes iguales de azul de metileno con hidróxido de potasio que facilita la visualización.

El aislamiento del hongo por cultivo no es necesario para el diagnóstico de pitiriasis versicolor, pero debe ser utilizado para identificar las levaduras lipofílicas, o para efectuar estudios de sensibilidad in vitro, o en casos de fungemia o de sospecha de infección profunda. La fase levaduriforme de la *Malassezia spp* puede obtenerse por cultivo en agar Sabouraud con cloranfenicol y cicloheximida bañando la superficie del medio con aceite de oliva estéril. Se incuba a 35-37°C, permite el crecimiento de colonias de consistencia cremosa al cabo de dos a cinco días.

La identificación del género se efectúa por las características morfológicas macroscópicas y microscópicas, por el crecimiento a 37°C y el requerimiento de lípidos para su cultivo.

Diagnóstico diferencial: hay que diferenciar principalmente del vitiligo y la pitiriasis alba.

TIÑA NEGRA

Definición: la tiña negra es una infección benigna superficial del estrato córneo de la piel, caracterizada por la presencia de manchas de color negro o marrón oscuro, desprovisto de descamación. Se localiza habitualmente en la superficie palmar y plantar. No hay descamación, prurito, el paciente no consulta al médico durante años.

Es considerada como una enfermedad tropical común en Sudamérica, América Central, África y Asia.

Etiología: la clasificación taxonómica definitiva de este hongo es difícil; así también se denominó *Exophiala werneckii*; recientemente se ha acuñado el término *Phaeoannellomyces werneckii* (*Cladosporium werneckii*). Se trata de un hongo dematiáceo por su capacidad para producir pigmento negro.

Diagnóstico micológico: el examen directo, con OHK al 10% de las escamas obtenidas por raspado mediante bisturí permite establecer el diagnóstico presuntivo. Se observan hifas septadas con un característico color oscuro. También se observan células gemantes, pueden observarse clamidosporas, células levaduriformes y fragmentos de hifas.

El hongo se aísla mediante el cultivo en placas con Sabouraud, incubando a 30°C en tres o cuatro semanas. Inicialmente las colonias son pálidas, pero pronto se tornan húmedas brillantes y de color oliváceo-negruzco. La colonia al envejecer produce micelios tortuosos septados, con pigmentación, rodeados de conidios. Los micelios suelen ser gruesos y los conidios pueden ser uni o bicelulares. Son frecuentes las clamidosporas pigmentadas.

Diagnóstico diferencial: se puede confundir con melanoma maligno (son lesiones que aumentan y tienen una pigmentación irregular y bordes irregulares), sífilis pinta, manchas producidas por productos químicos y tintes, los eritemas de origen tóxico, pigmentación de la enfermedad de Addison y pitiriasis versicolor con hiperpigmentación.

PIEDRA NEGRA

Definición: son infecciones fúngicas de la porción extrafolicular del pelo, caracterizadas por la presencia de nódulos duros e irregulares. Estos nódulos están compuestos por agregados fúngicos.

La afectación al pelo cursa con escasa alteración pilosa, ya que el hongo crece superficialmente alrededor del pelo por lo que los sujetos parasitados no muestran síntomas subjetivos. La afección solo tiene un interés cosmético. Los nódulos son de coloración negra o marrón y su tamaño oscila entre 1-5 mm. Los pelos que suelen afectarse son los de la cabeza, y con menos frecuencia los de la barba o bigote; raramente interesa a los pelos púbicos o axilares.

Etiología y ecología: la *Piedraea hortae* pertenece a la clase de los Ascomycetes, subclase Loculoascomycetes, orden Myriangiales, género *Piedraia*. La fuente infectiva o reservorio es el suelo.

Diagnóstico clínico y micológico: los nódulos que se presentan negros y duros, se encuentran superficialmente alrededor del pelo.

El examen directo de los pelos parasitados con KOH al 20% permite establecer el diagnóstico. Los nódulos de piedra negra están formados por una masa o estroma de células romboidales (semejantes a artroconidios) e hifas ramificadas unidas por una sustancia cementadora. Las hifas y células tienen un diámetro de cuatro a ocho μ , con pigmentación

regular. La sección de los nódulos pone de manifiesto la existencia de ascas localizadas en cavidades.

El cultivo permite establecer el diagnóstico definitivo, la *P. hortae* crece lentamente a 25°C, dando colonias pequeñas, marrón-negras, adherentes, cerebriformes. El examen microscópico muestra la presencia de hifas septadas gruesas, clamidoconidios y células irregulares hinchadas.

Diagnóstico diferencial: el diagnóstico diferencial más importante es con nódulos de piedra blanca y de los huevos o liendres de *Pediculus humanus*. El examen directo y el cultivo permiten fácilmente la diferenciación.

PIEDRA BLANCA

Definición: algunos usan el término de tricosporonosis cuando se refieren a esta enfermedad. Suele afectar los pelos de la cabeza, barba, bigote, pestañas, cejas, axilas, genitales. Los nódulos varían de color: blanco, marrón, verdosos. Son visibles a simple vista, blandos, esponjosos de 0,5-3 mm. Se pueden ubicar en la parte distal del pelo, y también pueden existir múltiples nódulos en el mismo pelo. La infección se puede originar en la cutícula del pelo y luego intrapapilar, lo que torna al pelo sumamente friable.

Etiología: la piedra blanca es originada por *Trichosporon beigeli* (*cutaneum*), perteneciente a la familia Criptococaceae.

Diagnóstico clínico y micológico: las características más importantes son los nódulos que se presentan blancos, blandos y se desprenden fácilmente.

En la observación microscópica directa con OHK se realiza el diagnóstico presuntivo y se diferencia con la piedra negra. Se observan hifas hialinas con artrosporas y algunos blastoconidios que miden entre 2-4 micras de diámetro. En el cultivo este hongo crece rápidamente en agar Sabouraud a temperatura ambiente, es inhibido por la cicloheximida. El aspecto de la colonia se presenta con pliegues radiales y es de color crema que se tornan grises al envejecer.

Diagnóstico diferencial: se debe realizar el diagnóstico diferencial con piedra negra, tricomycosis axilar, liendres de pediculosis, etc.

II- MICOSIS CUTÁNEAS

Las infecciones cutáneas del hombre incluyen una amplia variedad de enfermedades que afectan piel y sus apéndices: pelos y uñas.

En general la infección está limitada a las capas cornificadas, pero se presentan diversos cambios patológicos en el huésped, debido a la existencia del agente infeccioso y sus productos metabólicos. La mayor parte de estas infecciones son causadas por un grupo homogéneo de hongos queratinófilos denominados dermatofitos. Este grupo de enfermedades se conoce en forma colectiva como **dermatofitosis**.

Además de los hongos dermatofitos, pero con menor frecuencia, en las infecciones cutáneas participan otros mohos y hongos levaduriformes. La enfermedad que producen se llama en general **dermatomicosis**.

DERMATOFITOSIS

Definición: las dermatofitosis son afecciones producidas por un grupo de hongos queratinofílicos denominados dermatofitos que atacan los estratos córneos de la piel y sus faneras (pelos y uñas).

Etiología: los géneros involucrados son tres: *Trichophyton*, *Microsporum*, y *Epidermophyton*. Este grupo de hongos pertenece, en su fase teleomórfico a los *Ascomycotina* y se ubican dentro de la familia *Arthrodermataceae*.

Patogenia: los dermatofitos solo invaden la capa córnea de la piel, que carece de irrigación y no pueden penetrar más profundamente. Esto es debido a factores séricos (factor antidermatofito) que inhiben el desarrollo de estos hongos. La infección se transmite a través de las artroconidias que se adhieren a la piel y necesitan una pequeña abrasión o traumatismo cutáneo para establecerse. Otros factores que intervienen son alteraciones locales del pH, de los ácidos grasos de la piel, maceración, etc.

Clasificación clínica de las dermatofitosis: desde el punto de vista clínico las dermatofitosis se dividen, de acuerdo con la región del cuerpo afectado, en:

Tinea capitis	Tinea corporis	Tinea cruris	Tinea pedis
Tinea unguium	Tinea barbae	Tinea barbae	Tinea manuum

Clasificación de los dermatofitos: Ajello clasificó los dermatofitos de acuerdo con su hábitat en geofílicos, zoofílicos y antropofílicos. Esta clasificación tiene gran utilidad desde el punto de vista epidemiológico (Cuadro N° 1).

Cuadro N° 1: Clasificación de los dermatofitos según su hábitat natural

Geofílicos	Zoofílicos	Antropofílicos
<i>M. gypseum</i>	<i>M. canis</i>	<i>E. floccosum</i>
<i>M. nanum</i>	<i>M. distortum</i>	<i>M. audouinii</i>
<i>M. cookei</i>	<i>M. equinum</i>	<i>T. violaceum</i>
<i>M. fulvum</i>	<i>M. gallinae</i>	<i>T. rubrum</i>
<i>T. terrestre</i>	<i>M. persicolor</i>	<i>T. schoenleinii</i>
<i>T. ajelloi</i>	<i>T. mentagrophytes</i> (var. <i>Mentagrophytes</i>)	<i>T. mentagrophytes</i> (var. <i>Interdigitale</i>)
<i>T. flavescens</i>	<i>T. mentagrophytes</i> (var. <i>Ericnacei</i>)	<i>T. tonsurans</i>

Estructuras que atacan: no todos los géneros y especies atacan todas las estructuras queratinizadas (Ver Cuadro N° 2).

Cuadro N° 2: Clasificación de los dermatofitos según su ubicación topográfica

Género	Pelo	Piel	Uña
<i>Microsporum</i>	(+)	(+)	(-)
<i>Trichophyton</i>	(+)	(+)	(+)
<i>Epidermophyton</i>	(-)	(+)	(+)

Morfología: todos los dermatofitos se presentan en las escamas de las lesiones de piel lampiña y uñas como filamentos hialinos, tabicados, a veces divididos en artroconidias. Solo por la realización de cultivos es posible la diferenciación de los distintos géneros y especies.

En la invasión de los pelos es más fácil discriminar entre las lesiones producidas por especies de *Microsporum* o de *Trichophyton*. *Epidermophyton floccosum* no ataca la porción pilosa.

Inicialmente todos los dermatofitos parasitan el interior del tallo del pelo y forman filamentos ramificados; por lo tanto, en este primer período de invasión todas las especies se presentan en forma idéntica. Después se dividen en artroconidias que forman una disposición característica para cada una de ellas.

El *Microsporum* es visualizado microscópicamente como una vaina de pequeñas esporas que rodea el tallo del pelo, dispuestas en forma de mosaico.

El *Trichophyton* se presenta como cadenas de esporas que se ubican dentro (endothrix) o por fuera (ectothrix) del tallo del pelo. El pelo fávico (producido por *T. schoenleinii*) presenta filamentos tabicados en el interior del tallo del pelo y rodeado de burbujas de aire.

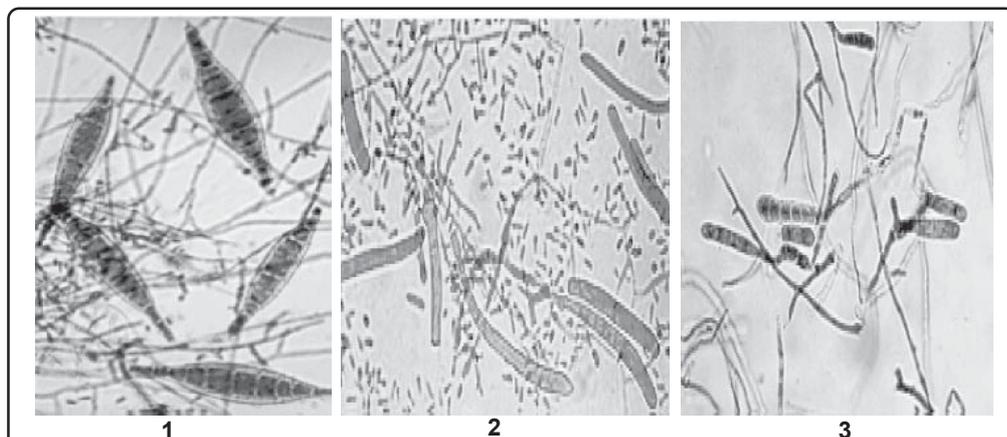
En los cultivos podemos diferenciar las distintas especies de los tres géneros de dermatofitos cuyas características generales son las siguientes:

- a) las colonias pueden ser: yesosas, pulverulentas, vellosas o céreas; esto está en relación con la mayor o menor producción de elementos de fructificación;
- b) algunas especies presentan pigmentos característicos que, generalmente, difunden al medio de cultivo;
- c) todos tienen esporas asexuadas externas llamadas conidias cuyos caracteres difieren según los géneros (Cuadro N°3).

Cuadro N°3: conidias de los tres géneros de dermatofitos

Género	Macroconidias	Microconidias
<i>Trichophyton</i> (Figura 1)	Escasas, de paredes lisas en forma de lápiz o cigarro, con escasos tabiques transversales.	Abundantes, globulosas o piriformes.
<i>Microsporum</i> (Figura 2)	Abundantes. De paredes gruesas y rugosas, fusiformes y con varios tabiques transversales.	Escasas, piriformes.
<i>Epidermophyton</i> (Figura 3)	Forma de clava, con paredes lisas, 2-3 tabiques. Pueden agruparse de 2-3.	Ausentes.

Figuras 1, 2 y 3: se observa morfología microscópica de *Microsporum*, *Trichophyton* y *Epidermophyton*



DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO DE LAS DERMATOFITOSIS

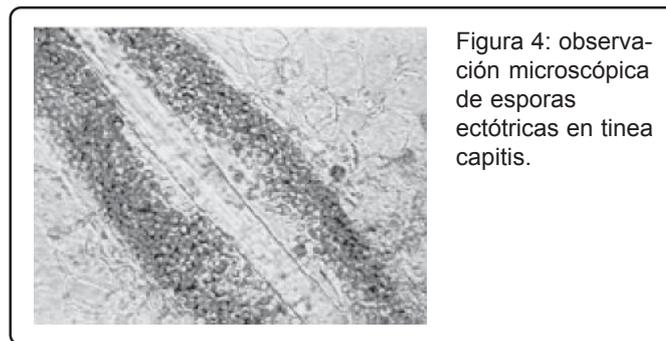
Infecciones de cuero cabelludo

Se puede examinar el cuero cabelludo en una habitación oscura con luz de Wood (luz UV de 365 nm de longitud de onda, que pasa a través de un filtro de cristal que contiene óxido de níquel). La piel normal muestra un color azul, y las zonas infectadas por algunos dermatofitos una fluorescencia verde brillante. Es positiva en *M. canis*, *M. audouinii*, *T. schoenleinii* y *M. distortum*. Es negativa para las especies de *Trichophyton*, que causan infección endótrica.

Toma de muestra: es muy importante realizar una toma correcta del material, arrancando los pelos enfermos de pocos milímetros de longitud, a veces mezclados con escamas, y desechando los pelos largos sanos. El material obtenido se deposita en una placa de Petri, destinando una parte del mismo al examen directo y otra a los cultivos.

Examen directo: para el examen directo se coloca el material entre porta y cubreobjetos con OHK 20%, se calienta suavemente con un mechero y se observa al microscopio óptico (x400) en busca de los elementos fúngicos; podemos ver así el tipo de parasitación (endótrix o ectótrix) (Figura 4).

Cultivos: las muestras se cultivan en medio glucosado de Sabouraud al que se le puede agregar antibióticos para inhibir contaminantes. Se incuban a 28°C. Crecen lentamente en aproximadamente dos semanas.



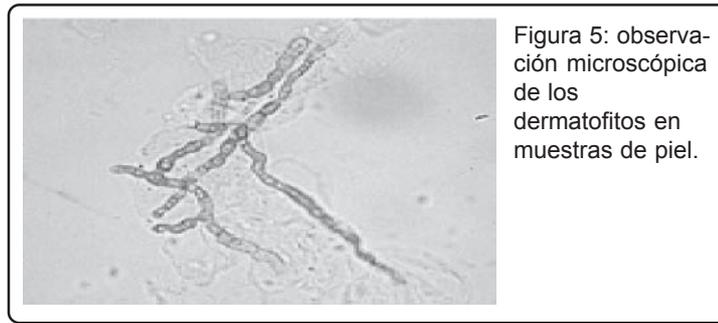
Identificación de género y especies: cuando se puede apreciar el desarrollo de las colonias, se toman fragmentos para hacer preparaciones en portaobjetos con una gota de líquido de montaje (lactofenol azul de algodón, por ej.), y se realiza la diferenciación de géneros y especies por sus características microscópicas y macroscópicas. Cuando es necesario se realiza estudio de las propiedades fisiológicas: requerimientos vitamínicos, test de ureasa, perforación de los pelos in vitro, etc.

Infecciones de piel lampiña

El material se debe tomar del borde de las lesiones raspando con un bisturí y recogiendo las escamas sobre un portaobjeto o placa de Petri estériles.

El diagnóstico micológico consiste en el examen microscópico en fresco con KOH de las escamas obtenidas y siguiendo la misma técnica indicada en tinea capitis: cuando es positivo se observan hifas tabicadas o cadenas de artrosporas (Figura 5).

Los cultivos se realizan en medios tales como agar glucosado de Sabouraud 4%, agar selectivo para hongos patógenos y agar selectivo para dermatofitos (DTM). Las indicaciones para el seguimiento de los cultivos son las mismas que para infecciones del cuero cabelludo.



Infecciones en uñas

El material se obtiene raspando con la punta de un bisturí (o espátula) la superficie inferior del borde libre subungueal recolectando el detritus que se acumula por debajo de la uña. En los casos que no existe detritus subungueal es necesario romper la capa superficial de la uña para poder conseguir material infectado. Se realiza el examen microscópico directo con KOH y los cultivos en medio de Sabouraud con cicloheximida y sin ella. El seguimiento del cultivo es igual que en infecciones del cuero cabelludo.

DESARROLLO PRÁCTICO

- Preparación de colonias gigantes de cepas de dermatofitos.
- Diferenciación de las especies más frecuentes por sus características macroscópicas y microscópicas.
- Pruebas complementarias para identificación de especies de *Trichophyton*.
- Procesamiento de muestras clínicas provenientes de lesiones en piel, pelo y uñas.

TRABAJO PRÁCTICO N° 8 LEVADURAS

Las levaduras comprenden un gran número de microorganismos ampliamente distribuidos en la naturaleza. Se las puede encontrar en la piel de las frutas, granos, miel, materia orgánica que contenga hidratos de carbono, en el suelo, aire, mar y también como parte de la flora normal de mamíferos en zonas como la piel, mucosa bucal e intestinos.

Muchas de las especies de levadura son útiles para el hombre, tal como las que se emplean en la producción de cerveza, vino, pan y otros alimentos nutritivos. Mientras que otras especies son perjudiciales ya que descomponen alimentos, deterioran fibras textiles o causan enfermedades a las plantas, animales y hombres.

Las levaduras pueden ser definidas como hongos unicelulares que se pueden reproducir sexual y asexualmente; carecen de clorofila y por lo tanto son heterótrofos, es decir viven a expensas de otros seres vivos (parásitos), o sobre materia orgánica muerta (saprófitos).

Dependen, para obtención de energía, como las plantas y animales, de la desasimilación oxidativa aeróbica y de la fermentación anaeróbica.

Las células pueden ser esferoidales, elipsoidales, ovoideas, cilíndricas, alargadas, en forma de luna, etc. En algunas levaduras las formas son características que se las puede emplear para diferenciar los géneros.

Sus dimensiones pueden variar según la especie, nutrición y otros factores, pero oscila entre uno a cinco micras de ancho por uno a diez micras de largo.

Teñidas con Gram, son Gram positivas. Su pared celular está constituida por macromoléculas: manán, glucán y proteínas, la mayor parte en forma de glicoproteínas.

Existen 623 especies conocidas de levaduras distribuidas en 60 géneros taxonómicos de las cuales solo aproximadamente 20 especies son capaces de producir enfermedades en humanos y animales, por lo que se les ha considerado de interés médico. Dentro de ellas, las más frecuentemente aisladas como agentes causantes de infecciones humanas son *Candida albicans* y otras levaduras del género *Candida* entre las cuales podemos mencionar a la *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*. Otros hongos levaduriformes importantes son el *Cryptococcus neoformans*, *Malassezia spp*, *Geotrichum spp*, *Trichosporon spp*, *Rhodotorula rubra*, *Rhodotorula glutinis*.

REPRODUCCIÓN

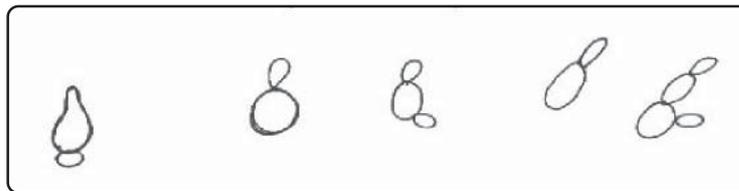
1) ASEXUAL O VEGETATIVA: FASE ANAMORFA

Pueden reproducirse por distintas formas: a) brotación, b) fisión, c) mecanismos especiales, d) forma de hifas.

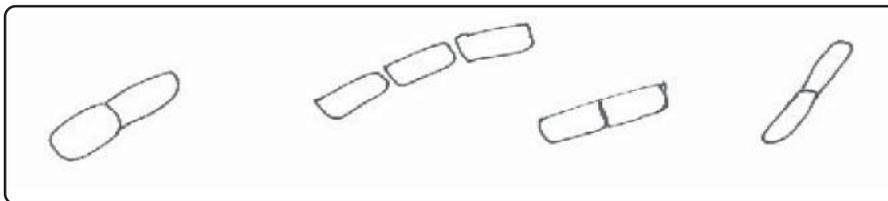
a) Brotación

El proceso se inicia cuando las células madres emiten un conducto tubular desde una vacuola nuclear hacia un punto periférico próximo a la misma, donde se forma una pequeña evaginación o protuberancia sobre la superficie externa de la célula madre. Una vez que el brote ha alcanzado el tamaño de la **célula madre se separa** sin formación de un tabique. El brote se puede producir en determinados sitios de la célula madre, según el grupo de levaduras al que corresponde, pudiendo estar restringido a:

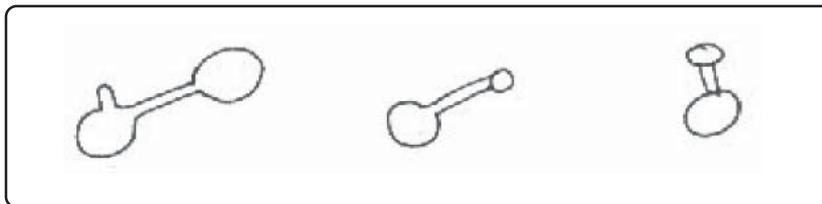
- Un solo polo: brotación monopolar: Ej. *Malassezia spp.*
- Los polos distales de la célula madre: brotación bipolar. Levaduras apiculadas.
- Distintos sitios de célula madre: brotación multipolar o multilateral. La mayoría de las levaduras de interés médico presentan este tipo de brotación.

**b) Fisión**

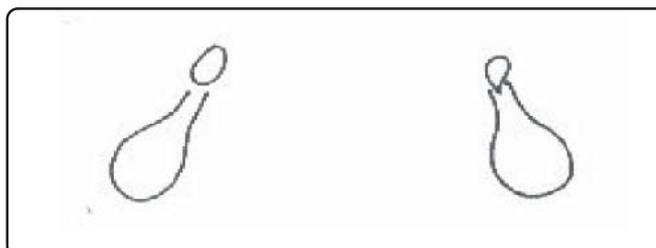
Implica la duplicación de las células madres mediante el crecimiento de las paredes celulares para formar un septo transversal que divide el eje más largo de la célula para formar artrosporas, las células luego se elongan y se repite el mismo proceso. Ejemplo de levaduras que se reproducen por fisión: *Schizosacharomyces spp*, *Trichosporon spp*.

**c) Formas especiales**

Una forma de reproducción vegetativa es la formación de conidios sostenidos por un péndulo de estructura tubular. Ej. Levaduras del género *Sterigmatomyces*.



Otra forma es la formación de balistosporas o esporas de descarga; son generadas por las células vegetativas y descargadas en el aire por el mecanismo de gota. Ej. *Sporobolomyces*.



d) Formación de pseudohifas o hifas verdaderas

Algunas levaduras también pueden reproducirse por la formación de estructuras más o menos filamentosas, pudiendo ser estas hifas verdaderas o pseudohifas. Las denominadas pseudohifas o pseudomicelio se refieren a la formación de cadenas de células elongadas que se originan por gemación.

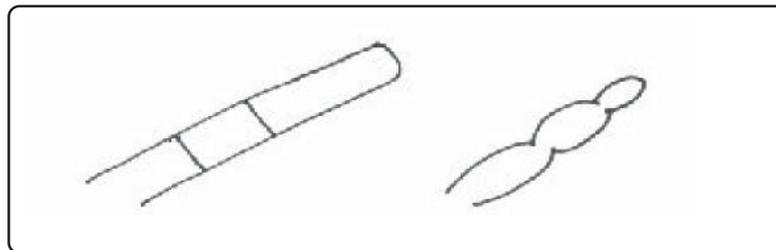
A su vez, el pseudomicelio puede ser rudimentario y limitarse a una cadena de células elongadas de tamaño semejante, o estar bien desarrollado y formado por células diferenciadas elongadas que producen blastosporas dispuestas en formas características y regulares. La disposición de las blastosporas fue usada antiguamente como carácter taxonómico, pero debido a la existencia de tipos taxonómicos intermedios y a la gran variación que sufren se ha dejado de usar.

En la práctica es difícil distinguir un pseudomicelio de un micelio verdadero o de formas intermedias. Además, en un mismo cultivo pueden aparecer todas estas formas a la vez. *Para poder diferenciarlos existen tres criterios basados en la observación de la célula terminal de la estructura hifal:*

1º criterio

Micelio: las hifas verdaderas generalmente son refráctiles. El septo es recto, generalmente grueso y refráctil.

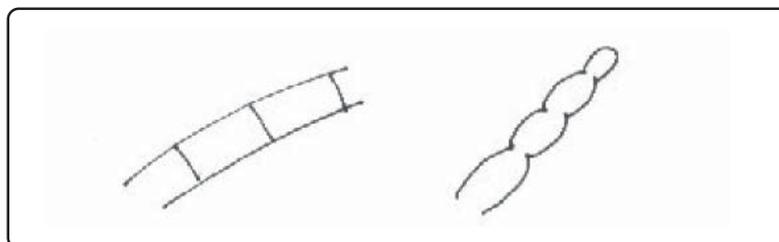
Pseudomicelio: no tiene septos discernibles y los extremos de las células intercalares son curvos y no refráctiles.



2º criterio

Micelio: la mayoría de las células terminales son considerablemente más largas que las adyacentes.

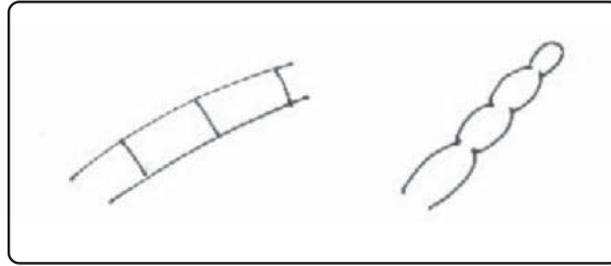
Pseudomicelio: las células terminales por regla general son más cortas o aproximadamente iguales a las adyacentes.



3º criterio

Micelio: las hifas verdaderas no muestran constricción (o es muy pequeña) en el septo o en el punto donde se va formando el septo.

Pseudomicelio: marcada constricción en el septo.



Algunos géneros producen simultáneamente hifas y pseudohifas, por ejemplo: *Trichosporon*.

Otras estructuras de propagación del ciclo sexual son: artrosporas o artroconidias que se producen por rotura o desarticulación de micelio en cada una de las células.

2) REPRODUCCIÓN SEXUAL: FASE TELEOMORFA

Mediante la formación de ascos o basidiosporas. La característica de los ascos y ascosporas son un criterio taxonómico de gran importancia a nivel de género y especie.

Cuando las levaduras desarrollan en medios líquidos pueden formar anillos, sedimentos, películas, etc.

En medio sólido las colonias pueden ser mucoides, friables, adherentes, rugosas, suaves, compactas, extendidas, etc.

CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS

La utilización de los compuestos orgánicos como fuente de energía puede hacerse por dos vías diferentes: vía oxidativa y vía fermentativa.

En la vía oxidativa o metabolismo respiratorio: el oxígeno es el aceptor final de electrones y solo ocurre en aerobiosis. Las levaduras no fermentadoras solo tienen este tipo de metabolismo.

En la vía fermentativa anaeróbica: algunas levaduras forman como producto final de su metabolismo etanol y dióxido de carbono mientras que otras forman ácido láctico a partir de la glucosa. Es decir que pueden producir fermentación alcohólica y fermentación láctica. En ambas fermentaciones se produce la oxidación parcial del compuesto orgánico y se libera únicamente una pequeña cantidad de energía produciéndose ambas en anaerobiosis. Para la levadura el producto crucial es el ATP, siendo el dióxido de carbono y etanol productos de desecho. Para el hombre, en cambio, esto no es así, ya que para la industria de la cerveza, la fermentación anaeróbica de la glucosa por las levaduras es el medio para obtener etanol, y para la industria panadera lo es para obtener el dióxido de carbono.

Las propiedades fermentativas y oxidativas de las levaduras han permitido desarrollar técnicas que son la base de la descripción de las levaduras.

Es importante tener en cuenta que:

- toda levadura que utiliza fermentativamente un hidrato de carbono lo puede usar también oxidativamente;
- no todos los carbohidratos utilizados oxidativamente (asimilado) son siempre ocupados fermentativamente;
- una levadura capaz de fermentar glucosa es capaz de fermentar cualquier azúcar;

d) una levadura que no puede fermentar glucosa no puede fermentar otro azúcar.

Otras características fisiológicas

OSMOFILIA: Las levaduras toleran altas concentraciones de azúcares; por ello, pueden alterar alimentos desecados, descomponer jarabes, almíbares, etc.

TERMOFILIA: La mayoría de las levaduras tienen una temperatura óptima de crecimiento, pero sin embargo hay excepciones. Las levaduras de regiones polares crecen poco a 20°C, pero desarrollan bien a 4°C.

IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS

La marcha de identificación de levaduras puede variar desde unos pocos tests simples para identificación presuntiva de *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*, a una gran variedad de pruebas necesarias para identificar a todas las levaduras comúnmente aisladas en los laboratorios de Micología (Esquema 1).

Pruebas para identificación presuntiva de levaduras

- 1- Crecimiento a 28°C y 37°C.
- 2- Prueba de formación de tubo germinativo para *C. albicans*.
- 3- Prueba de formación de clamidosporas para *C. albicans*.
- 4- Crecimiento en medios cromogénicos CHROMagar Candida.

Pruebas para identificación definitiva de levaduras

A- Características de la reproducción vegetativa:

- 1- Crecimiento en agar morfología para macromorfología.
- 2- Crecimiento en extracto de malta (medio líquido), para estudio micromorfológico.
- 3- Cultivo en lámina o microcultivo, para estudio micromorfológico.

B- Características de la reproducción sexual:

- 1- Producción de ascosporas.

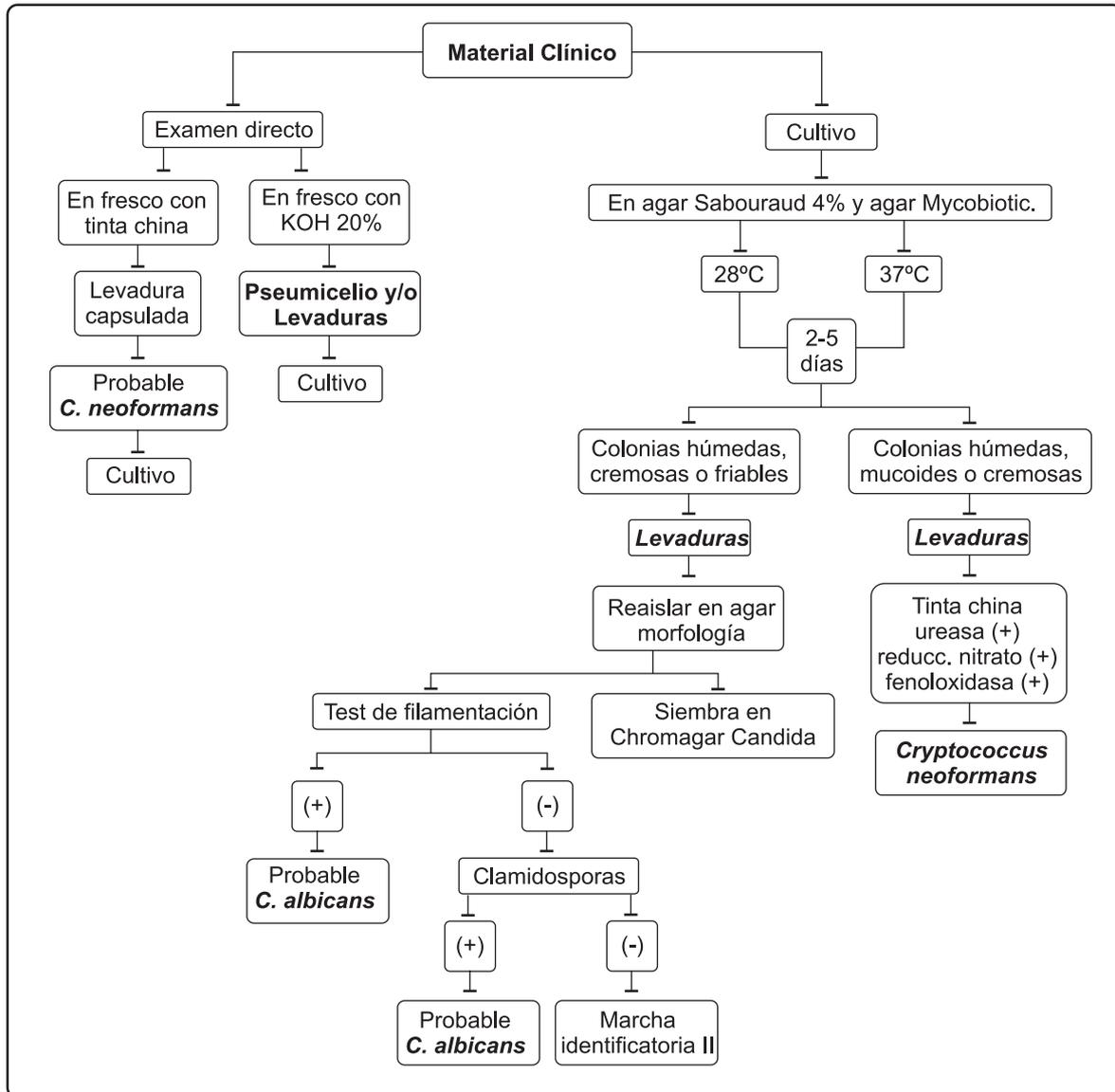
C- Características fisiológicas y bioquímicas:

- 1- Ensayo de fermentación de glucosa, sacarosa, galactosa, maltosa y lactosa. (Zimograma).
- 2- Ensayo de asimilación de compuestos carbonados (Auxonograma).
- 3- Ensayo de asimilación de compuestos nitrogenados (Auxonograma)

Pruebas para la identificación de *Cryptococcus neoformans*

- Crecimiento a 37°C.
- Formación de micelio o pseudomicelio.
- Test de tinta china
- Prueba de producción de ureasa.
- Ensayo de la fenoloxidasa.
- Agar semilla de girasol para diferenciación.

Esquema 1: Marcha de identificación de levaduras



DESARROLLO PRÁCTICO

- 1- Se realizarán marchas de identificación presuntiva y confirmatoria de cepas puras de levaduras, entregadas por la Cátedra.
- 2- Se procesarán muestras clínicas de pacientes con probable infección por levaduras.

DESCRIPCIÓN DE LAS PRUEBAS

a) Crecimiento a 37°C

Algunos hongos y levaduras pueden crecer a 28 y 37°C. Generalmente un hongo que no puede crecer a 35-37°C es un contaminante, en cambio si puede hacerlo es probable que actúe como oportunista invasor.

Procedimiento:

Sembrar la cepa en dos tubos de agar Sabouraud e incubar, uno a 37°C y el otro a 28°C.

Observar el tubo a 37°C a los cuatro días y luego semanalmente hasta que se observe crecimiento en el tubo control a 28°C.

Interpretación

El resultado es positivo cuando se observa igual o mayor desarrollo en el tubo a 37°C que en el de 28°C.

b) Test de filamentación

Procedimiento

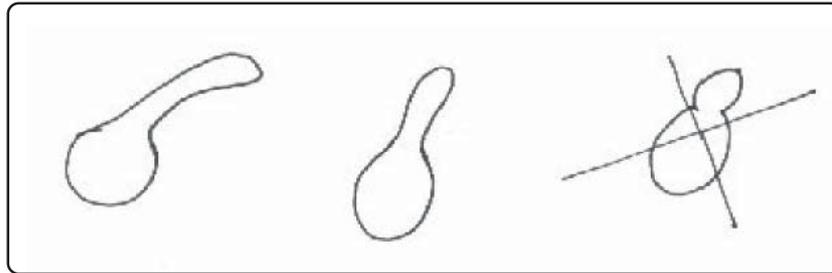
Realizar una suspensión ligera de un cultivo de 24 hs. de la cepa en estudio en 0,5ml. de suero bovino, o bien suero humano inactivado a 56°C durante 30 min. Tocar la superficie de una colonia con un ansa y emulsionar en el suero. Incubar luego a 37°C y observar microscópicamente cada media hora hasta las tres horas.

Es necesario incubar un testigo positivo (*C. albicans*) y uno negativo (*C. guilliermondii* u otra).

Interpretación

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

Esta prueba se considera la más confiable para identificar presuntivamente a la *C. albicans*, tiene una exactitud de 95100% cuando se la compara con la identificación convencional.



c) Producción de clamidosporas: microcultivos en lámina

Esta técnica se utiliza para la observación de micelio, pseudomicelio y clamidosporas, que son esporas de resistencia, redondas, refringentes, de pared engrosada y ricas en lípidos.

Procedimiento

Preparación de las placas de micro cultivo y siembra:

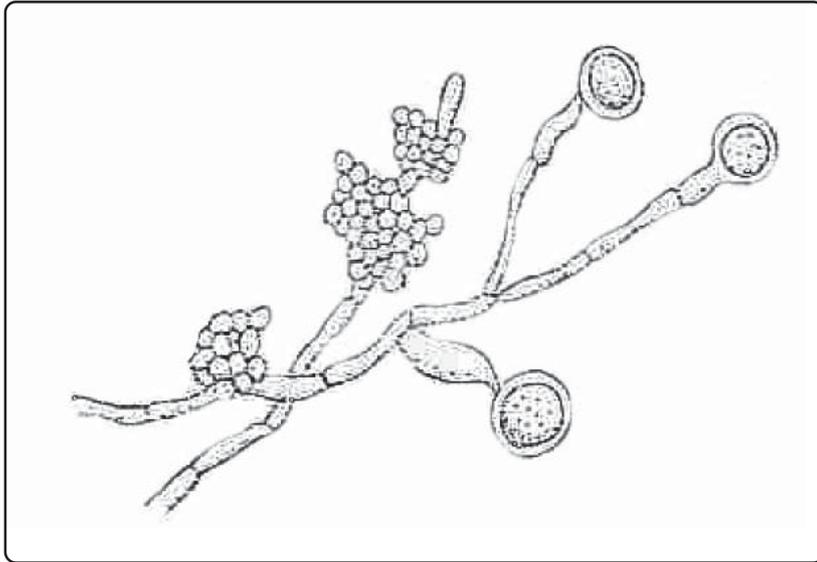
Colocar en una caja de Petri una varilla de vidrio o de acero inoxidable doblada en forma de U y depositar sobre ella un portaobjetos limpio. Esterilizar por calor seco.

Colocar unos mililitros de agua estéril en el fondo de la placa o bien humedecer un algodón estéril. Luego fundir harina de maíz + tween 80 al 2% y con una pipeta estéril colocar 2,5 ml del medio sobre el portaobjetos y dejar solidificar. Inocular usando ansa aguja; para ello se toca una colonia y se hace una línea cortando el agar. Colocar sobre la línea de siembra un cubreobjetos. Incubar a 25°C durante cuatro a cinco días.

Observar al microscopio óptico en x400 en busca de micelio, pseudomicelio y clamidosporas. Se debe hacer una descripción completa de toda característica de interés.

Interpretación

La formación de clamidosporas es característica de *C. albicans*, pasados los cinco días el ensayo no es apto ya que otras levaduras pueden formar clamidosporas (*T. cutaneum*). Las clamidosporas se observan como estructuras terminales o intercalares redondas, refringentes y de pared engrosada.



d) Siembra en CHROMagar Candida

El CHROMagar es un medio de cultivo cromogénico de identificación presuntiva de *Candida albicans*. Puede identificar presuntivamente también *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* en 72 hs de incubación a 30°C.

Interpretación

Colonias color verde: *Candida albicans*

Colonias color azul: *Candida tropicalis*

Colonias color rosado: *Candida krusei*

Colonias color rosa a blancuzco: Otras *Candidas*

e) Crecimiento en medios sólidos: colonias gigantes

Se emplea para lograr el desarrollo de una macrocolonia a partir de la cual se pueda describir la velocidad de crecimiento y sus características macroscópicas.

Para este estudio se puede utilizar agar extracto de malta o agar de peptona - extracto de levadura 2%.

Procedimiento

Colocar el medio de cultivo en cajas de Petri y dejar solidificar.

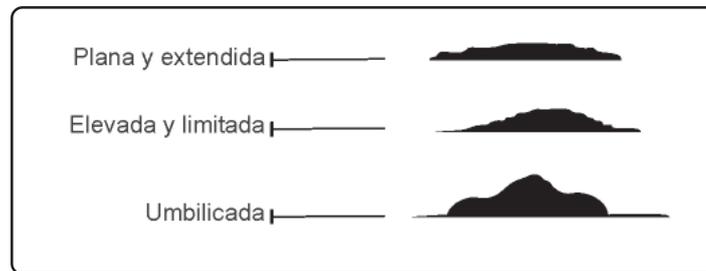
Inocular esterilmente, con un fragmento de cultivo de la cepa en crecimiento activo, el centro de la superficie del agar tratando de que quede bien adherida.

Sellar los bordes de la placa con cinta adhesiva para evitar la entrada de esporas del aire.

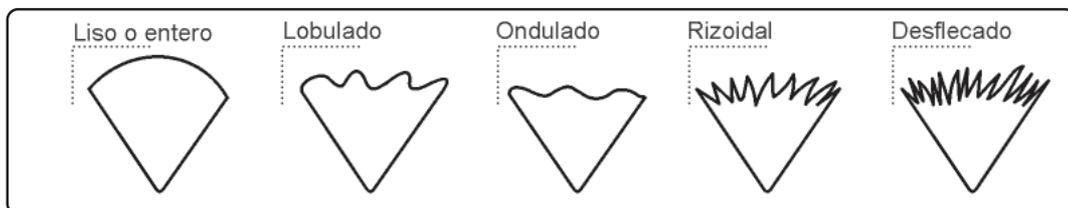
Incubar la placa en posición invertida durante siete a diez días hasta cuatro semanas, luego de la cual se observan las características culturales.

Las características culturales a observar son las siguientes:

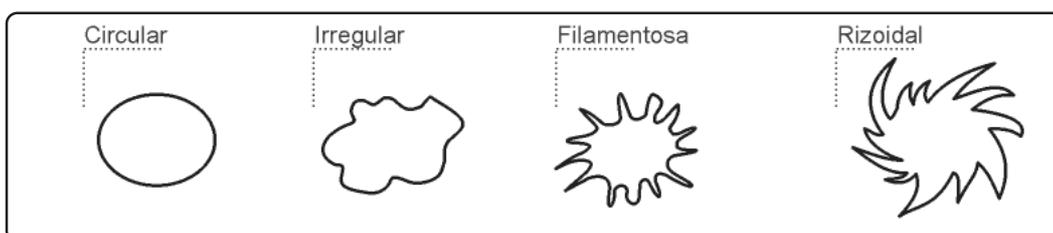
- **Textura:** mucoide, coherente y firme (opaca), butirosa (brillante y húmeda).
- **Color:** blanco, crema, salmón.
- **Superficie:** brillante o mate, sectorizada, estriada, cerebriforme, rugosa, vellosa.
- **Elevación:** plana y extendida, elevada y limitada, umbilicada.



- **Margen o borde:** liso o entero, lobulado, ondulado, rizoidal, desflecado.



- **Forma:** circular, irregular, filamentosa, rizoidal.



MARCHA IDENTIFICATORIA II

A) Estudio de las características de la reproducción vegetativa. Micromorfología

a) Crecimiento en medio líquido: extracto de malta o Sabouraud 4% líquido

Permite la observación rutinaria de las características micromorfológicas de las levaduras.

Procedimiento

Inocular un cultivo joven y en crecimiento activo (48 hs) de la cepa a estudiar en el medio líquido.

Incubar de dos a tres días a 25-28°C, luego examinar los cultivos y anotar las siguientes características:

- Forma y tamaño de las células: redondas, ovaladas, alargadas, etc.
- Modo de reproducción vegetativa: fisión, brotación, monopolar, dipolar o multipolar.
- Disposición de las células: aisladas, impares, cadenas.
- Formación de anillos, sedimentos o películas.

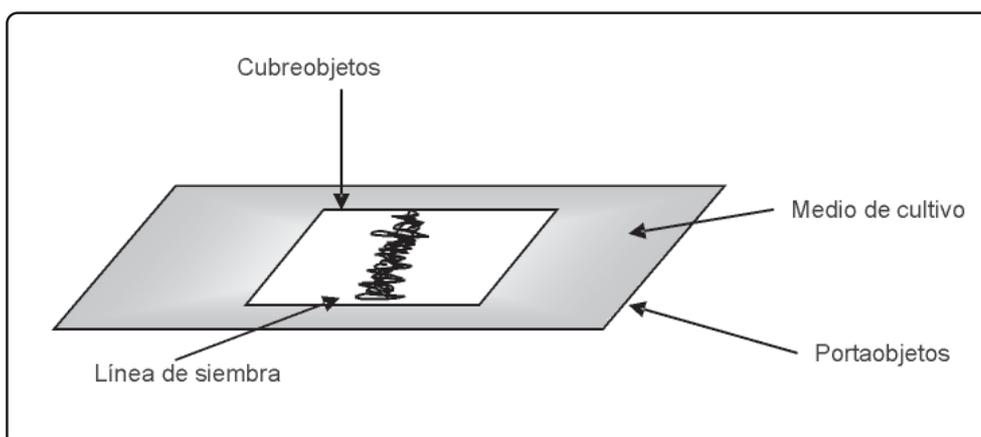
b) Microcultivo en medio sólido

Es el mejor método para observar la morfología microscópica de las distintas estructuras fúngicas.

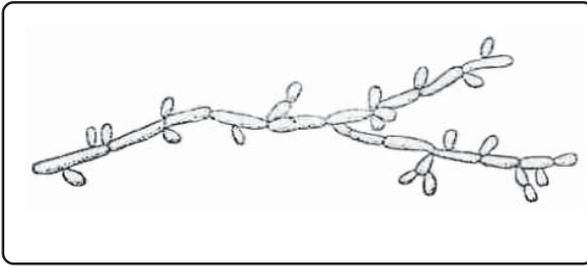
Procedimiento

- a-Preparar y esterilizar un esquema como se observa en la Figura.
- b-Agregar sobre el portaobjetos 3 ml de medio de cultivo. Por ejemplo, Sabouraud.
- c-Sembrar en línea transversal al portaobjetos.
- d-Cubrir con cubreobjetos previamente flameado.
- e-Humedecer la base de la placa, para formar una cámara húmeda.
- f-Incubar a 28°C, 1-2 semanas

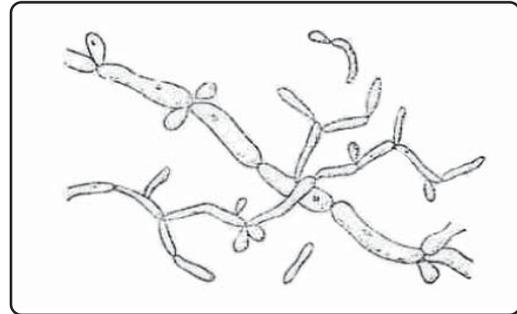
Esquema de microcultivo en láminas



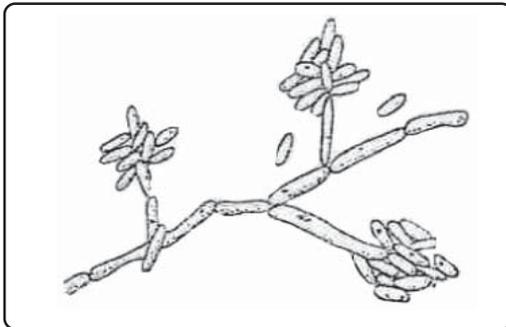
Imágenes micromorfológicas de *Candidas*



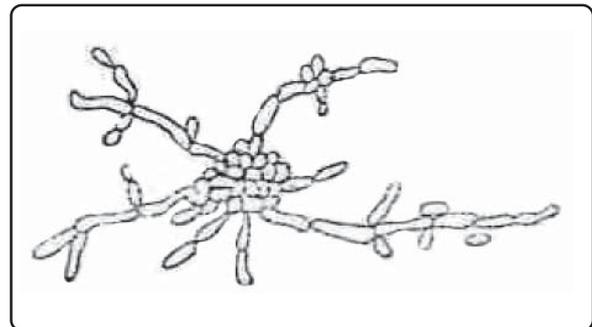
Esquema de *Candida tropicalis*



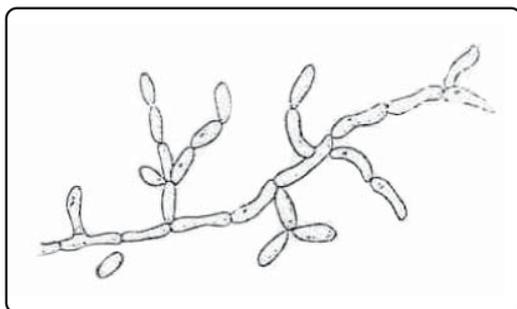
Esquema de *Candida parapsilosis*



Esquema de *Candida krusei*



Esquema de *Candida guilliermondii*



Esquema de *Candida lusitanae*

B) Estudio de las características sexuales

1- Formación de ascos y ascosporas

La formación de ascos y ascosporas se estudia en una gran variedad de medios especiales tales como: agar Gorodkova, agar acetato, agar extracto de malta, agar harina de maíz, cuñas de zanahorias, papa, etc.

Procedimiento

Llevar la cepa a un estado de crecimiento activo.

Sembrar varios medios de esporulación.

Incubar a 25°C durante tres días y observar al microscopio presencia de esporas.

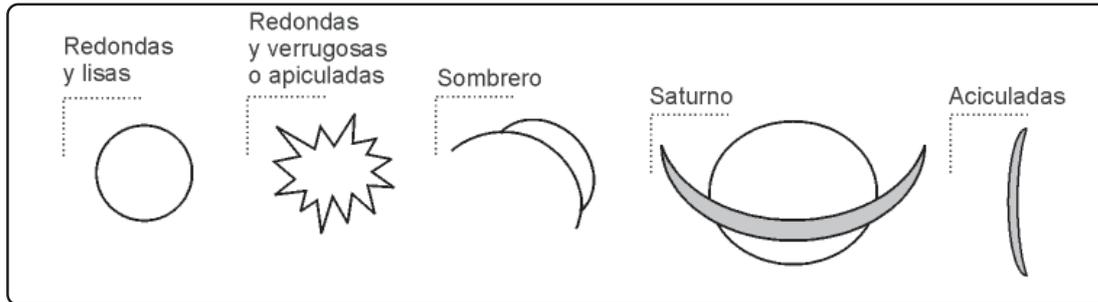
Si el material no ha esporulado se conserva cuatro a seis semanas.

La formación de ascosporas se puede verificar mediante coloraciones de Wirtz o de carbolfucsina modificada por Kufferath.

Observar las siguientes características:

Forma del asco: Asco dehiscente o persistente.

Forma de las ascosporas



C) Estudio de las características fisiológicas y bioquímicas

1) Fermentación de compuestos carbonados (zimograma o fermentación)

Las pruebas de fermentación se basan en la propiedad que tienen ciertas levaduras de utilizar azúcares en anaerobiosis, con producción de ácidos orgánicos y CO₂. Esta propiedad varía desde una fermentación vigorosa a ausencia de fermentación según los géneros de levaduras que se traten.

Generalmente es suficiente estudiar la fermentación de glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa y lactosa.

Procedimiento

Inocular cada tubo del medio de fermentación con los azúcares al 2% y una campanita de Durham, con 0,1ml de suspensión de levaduras.

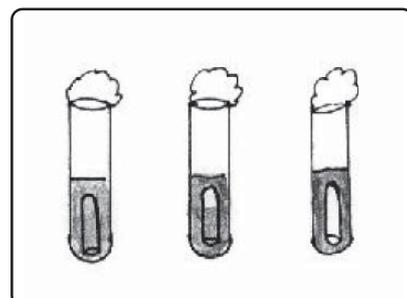
Incubar a 28°C y leer a los 3, 7,15 y 21 días.

Interpretación

Observar la acumulación de gas (CO₂, producto de la fermentación) en la campanita de Durham.

Dependiendo del tiempo requerido para la formación de gas visible, se anota la fermentación del azúcar como:

- Fuerte: campanita llena de gas a los tres días.
- Débil: campanita con 1/3 de gas a los tres días.
- Muy débil: campanita con una sola burbuja de gas en tres días.
- Negativo: no fermenta



2) Asimilación de compuestos carbonados (auxonograma o asimilación)

Este test se basa en la capacidad que tienen las levaduras de utilizar oxidativamente (asimilación) diferentes derivados hidrocarbonados y fuentes nitrogenadas orgánicas e inorgánicas.

Procedimiento

Fundir cinco tubos de medio base para fuentes de carbono en baño de María, enfriar a 45-50°C y mantener a esa temperatura.

Preparar una suspensión densa de la cepa en estudio agregando a un cultivo de 48 hs 4,5 ml de agua destilada estéril. Resuspender agitando en vortex.

Rotular cinco placas de Petri con el número de cepa, la fecha y el medio empleado, y agregar a cada una dos o tres gotas de solución de vitaminas.

Agregar a cada tubo de medio base (40-50°C) 0,5 ml. de suspensión de la cepa y agitar en el vortex.

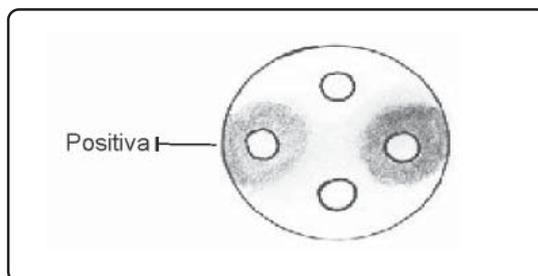
Volcar inmediatamente el contenido de cada tubo en cada una de las placas preparadas, rotar luego la placa para mezclar bien y luego dejar enfriar sobre una superficie plana.

Colocar los discos cargados con las fuentes de carbono, con pinza estéril; glucosa, galactosa, L-sorbose, sacarosa, maltosa, celobiosa, trehalosa, lactosa, melibiosa, rafinosa, melezitosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-ribose, D-manitol, inositol, almidón, L-ramnosa, eritritol, ácido cítrico.

Incubar a 25-28°C durante 48-72 hs con la tapa de la placa hacia abajo.

Interpretación

La asimilación es positiva cuando se observa un halo de desarrollo alrededor del disco.



3) Asimilación de compuestos nitrogenados (auxonograma)

Esta prueba se basa en la capacidad de asimilar diversas fuentes de nitrógenos que presentan los diversos géneros de levaduras.

Procedimiento

Fundir un tubo con medio base para fuentes de nitrógeno en BM, enfriar a 40°C o 50°C y mantener a esa temperatura.

Preparar una suspensión densa de la cepa en estudio agregando a un cultivo de 48 hs, 4,5 ml. de agua destilada estéril. Resuspender agitando en vortex.

Rotular una placa de Petri con el número de cepa, fecha, el medio empleado y agregar en cada uno dos o tres gotas de vitaminas.

Agregar a cada tubo de medio base (a 45-50°C) 0,5 ml. de solución de la cepa y agitar el vortex.

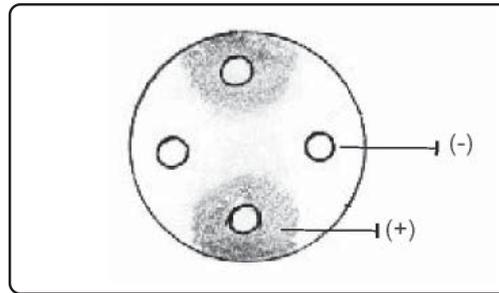
Volcar inmediatamente el contenido del tubo en la caja de Petri preparada, rotar luego la placa para mezclar bien, dejar enfriar sobre una superficie plana.

Colocar los discos cargados con las fuentes de nitrógeno con pinza estéril: nitrato de potasio y peptona.

Incubar a 25-28°C durante 48-72 hs con la tapa de la placa hacia abajo.

Interpretación

La asimilación es positiva cuando se observa halo de desarrollo alrededor del disco



Pruebas para la identificación de *Cryptococcus neoformans*

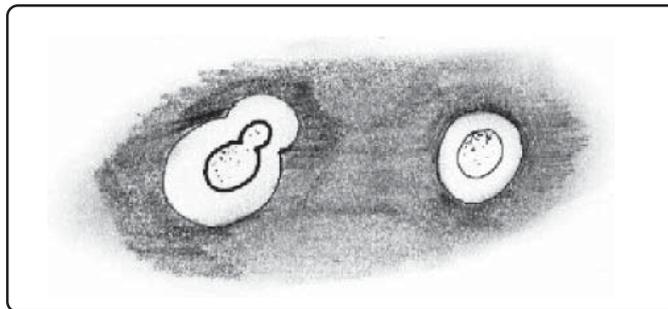
a) Observación de la cápsula: Test de la tinta china

Procedimiento

Se coloca una ansada de la cepa en estudio sobre un portaobjeto y se aproxima a ella una gota de tinta china, luego se deposita un cubreobjeto sobre los mismos y en la zona de interfase se observa al MO en 40X.

Interpretación

Se debe buscar la presencia de levaduras gemadas o no, de 4-20 micrones, con un halo claro alrededor que se produce por el desplazamiento de las partículas de tinta por la cápsula de 1-20 micrones de espesor, y que refringe contra el fondo negro del preparado.



b) Producción de ureasa

Se utiliza el medio agar urea de Christensen. Este contiene rojo de fenol que vira al rojo cuando se hidroliza la urea y se libera amonio alcanzando el medio.

Procedimiento

Estriar la cepa incógnita en el medio de cultivo y simultáneamente sembrar una cepa testigo.

Incubar a 25°-28°C durante tres días y observar el cambio de color del indicador.

Interpretación

La prueba se considera positiva cuando el medio vira al rojo magenta.

Si el color original no se modifica o se torna amarillo la prueba es negativa.

C. neoformans y otros *Cryptococcus spp.*, e incluso otras levaduras producen ureasa; sin embargo, *C. albicans* y otras especies del género *Candida* no la producen.

c) Prueba de la fenol oxidasa

Se basa en la detección de actividad de la enzima fenoloxidasasa presente en *C. neoformans* sobre el sustrato L-Dopa.

Procedimiento

Colocar tres tiras de papel previamente embebidas con L-Dopa dentro de una placa de Petri estéril.

Prehidratar las tiras con *buffer* fosfato.

Colocar sobre una de las tiras la cepa en estudio y en las otras una cepa de *C. albicans* (control negativo) y otra de *C. neoformans* (control positivo).

Incubar en cámara húmeda a 37°C.

Examinar a intervalos de 30 minutos hasta la aparición de pigmento marrón en el control positivo.

Interpretación

La producción de un pigmento pardo indica reacción positiva y permite identificar presuntivamente una cepa de *Cryptococcus neoformans*.

TRABAJO PRÁCTICO N° 9

MICOSIS SUBCUTÁNEAS

Se denomina micosis subcutáneas a aquellas micosis profundas localizadas que afectan mucosas, epidermis, tejido subcutáneo y ocasionalmente músculo y hueso.

Sus agentes etiológicos viven saprofiticamente en la naturaleza (suelo, restos de vegetales, espinas). Ingresan al organismo por microtraumatismos cutáneos. Se diseminan por contigüidad por vía linfática. No se conoce contagio interhumano ni de animales al hombre. La población susceptible es la residente en áreas tropicales y subtropicales que desempeñan tareas rurales. Se las puede considerar como “riesgo ocupacional”.

Clasificación de las micosis subcutáneas

- CROMOMICOSIS
- MICETOMAS
- ESPOROTRICOSIS
- FEOHIFOMICOSIS
- LOBOMICOSIS
- ENTOMOFTOROMICOSIS

CROMOMICOSIS

Definición: es una micosis de evolución crónica que afecta la piel y el tejido celular subcutáneo, de aspecto polimorfo, caracterizada por la formación de nódulos y lesiones verrugosas (aspecto de coliflor).

Localización: en las extremidades y otras zonas descubiertas del cuerpo.

Etiología: hongos de la flia *Dematiaceae* (*Fonsecae pedrosoi*, *Fonsecae compacta*, *Cladosporium carrionii*, *Phialophora verrucosa* y *Rinocladiella aquaspersa*).

Hábitat natural: suelo y restos vegetales en descomposición.

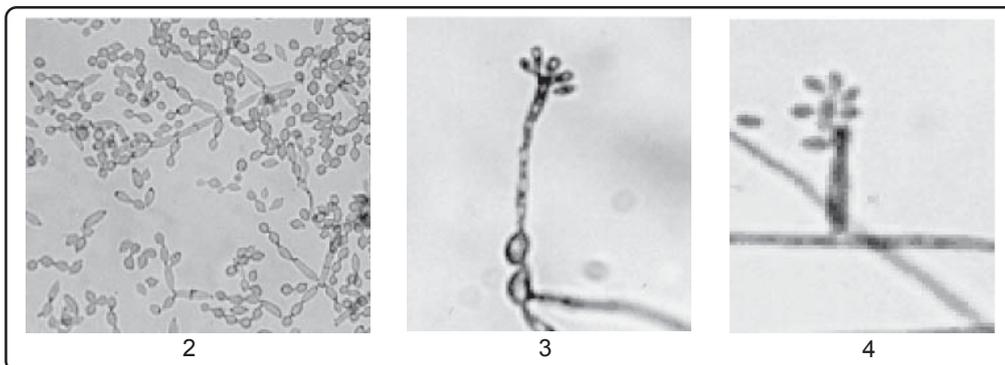
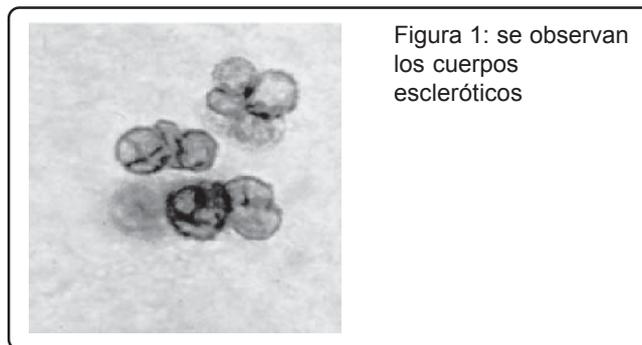
Puerta de entrada: traumatismo inoculante.

Población susceptible:

- Según área geográfica: aunque se encuentra en todo el mundo es más frecuente en áreas tropicales y subtropicales.
- Según edad: es más frecuente entre 30-50 años de edad; es raro en niños.
- Según ocupación: la actividad principal es la agricultura (si no usan zapatos).
- No hay transmisión interhumana.
- No ha sido observada en otras especies animales.

Diagnóstico micológico: se basa en la observación microscópica de los agentes etiológicos en la muestra clínica y aislamiento de los mismos en diferentes medios de cultivo.

Diagnóstico micológico		
MUESTRA CLÍNICA	EXAMEN DIRECTO	CULTIVOS
<ul style="list-style-type: none"> • Costras por raspado • Biopsia 	<ul style="list-style-type: none"> • Entre porta y cubreobjetos con KOH 20%: Se observan cuerpos esclerotales característicos (Figura 1) 	<ul style="list-style-type: none"> • Sab 4%, Cz, My incubados a 28°C durante 2-4 semanas <p>Desarrollo de hongo dematiáceo</p> <ul style="list-style-type: none"> • Identificación basándose en tipo de fructificación: Cladosporium, Phialophora y Rhinocladiella. (Figuras 2, 3 y 4)



Figuras 2, 3 y 4: se observan de izquierda a derecha fructificación tipo cladosporium, phialophora y rhinocladiella

FEOHIFOMICOSIS

Definición: es un padecimiento que incluye, fundamentalmente, lesiones quísticas abscedadas subcutáneas o abscesos cerebrales. La forma subcutánea es la más común, la invasiva es excepcional.

Etiología: varias especies de la flia *Dematiaceae*: *Exophiala jeanselmi*, *E. spinífera*, *Ph. richarsiae*, *Wangiella dermatitidis*, entre otros, son productores de micosis subcutáneas y *Cladosporium bantianun* de abscesos cerebrales.

Vía de infección: traumatismo en la piel en los casos subcutáneos e inhalación o diseminación hematogena en los sistémicos. La inmunosupresión favorece la infección; se han descrito casos asociados a TBC, sífilis, tratamiento con corticoides.

Área geográfica: cosmopolita, pero más frecuente en áreas templadas del Caribe, Centro y Sudamérica.

Predisposición s/ edad y ocupación: se ha observado más frecuentemente en adultos del área rural.

Diagnóstico Micológico		
MUESTRA CLÍNICA	EXAMEN DIRECTO	CULTIVOS
<p>En los subcutáneos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pus de abscesos • BIOPSIA <p>En los sistémicos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • LCR 	<ul style="list-style-type: none"> • Material entre porta y cubreobjetos con KOH (20%): Se observan hifas oscuras, tabicadas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Medios micológicos de rutina con y sin cicloheximida • Identificación: s/ características macro y microscópicas Interpretar con "cautela".

MICETOMAS

Definición: es una infección crónica de piel y tejido subyacente con tendencia a afectar los huesos. Se caracteriza por presentar un aspecto tumoral con múltiples trayectos fistulosos por los cuales drena secreción purulenta con granos (o gránulos).

Agentes etiológicos: actinomicetos aerobios geófilos (Actinomicetomas) y eumicetos que viven en la tierra o sobre restos de vegetales (Maduromicetoma o Eumicetoma). Cuadros idénticos pueden ser producidos por actinomicetos anaerobios como el *Actinomyces israelii* (Actinomicosis), y por bacterias no filamentosas como *Stafylococcus aureus*, *Pseudomonas spp*, *Escherichia coli*, etc, (Botriomicosis).

Localización: zonas expuestas del cuerpo, principalmente miembros inferiores.

Área geográfica: más frecuente en la zona intertropical de África, América del Norte (México), América central y América del sur (Venezuela, Brasil, Argentina).

Puerta de entrada: inoculación transcutánea.

Frecuencia según ocupación: es más frecuente en adultos que desempeñan actividades agrícolas.

Especies causales de actinomicetomas: *Nocardia brasiliensis*; *N. caviae*; *N.asteoides*, *Actinomadura madurae*, *A. pelletieri* y *Streptomyces somaliensis*.

Especies de hongos productores de maduromicetoma: el número es muy grande, pero los más frecuentes son: *Madurella mycetomatis*; *M. grisea*; *Pyrenochaeta romeroi*, *Scedosporium apiospermum*; *Leptosphaeria senegalensis*; *Acremonium recifei* y *A. falciforme*.

DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO	
<p>Muestra Clínica Material seropurulento y o biopsia.</p> <p>Examen Directo Los granos entre porta y cubreobjetos con KOH 20% y colorantes.</p> <p>Cultivos Los granos deben lavarse con SF. Los formados por Actinomycetales: en AS, ICC, aerobiosis, 37°C. Los formados por hongos: en Sab, Sab + cloranfenicol, aerobiosis, 25°C.</p>	<p>Los granos del género <i>Nocardia</i> son de color amarillento, coloreados se observa que están formados por filamentos Gram (+) de aproximadamente 1 μ.</p> <p>Los granos eumicéticos están constituidos por hifas anchas (3-5 μ) y pueden ser de colores claros u oscuros S/ el hongo sea hialino o pigmentados.</p>

LOBOMICOSIS

Definición: es una infección subepidérmica, crónica, caracterizada por lesiones de tipo queloidiano, nodulares y de aspecto verrugoso.

Agente etiológico: *Loboa lobo* o *Paracoccidioides lobo*.

Área geográfica: restringida, es muy frecuente en la región del Amazona (Brasil).

Fuente de infección: desconocido, se considera que es acuático, ya que la infección también se ha observado en delfines.

Puerta de entrada: traumatismo de la piel.

Clínica: *Loboa lobo* tiene un carácter dermatropo, las lesiones son de ubicación exclusivamente cutánea, ausencia de afectación ganglionar y visceral. Los pacientes consultan varios meses después de que hayan aparecido las primeras lesiones, que presentan ardor y prurito en las fases iniciales y sensación de anestesia en las más tardías.

DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO
Muestra Clínica Material de biopsia
Examen Microscópico Directo Con KOH 20% Se observan levaduras redondeadas de 7-10 micras, de pared gruesa, unidas unas a otras formando cadenas.
Cultivo: no ha sido posible el aislamiento <i>in vitro</i> .

DESARROLLO PRÁCTICO

- 1- Descripción macroscópica y microscópica de hongos dematiáceos.
- 2- Realización de microcultivos de distintas especies de hongos dematiáceos para su observación microscópica.
- 3- Observación microscópica de preparados permanentes.
- 4- Procesamiento de muestras clínicas.

TRABAJO PRÁCTICO N° 10 SEUDOMICOSIS PROFUNDAS

ACTINOMICOSIS

Definición: es una enfermedad tumoral producida por actinomicetos, de evolución crónica, granulomatosa y supurativas, donde se observan granos amarillentos. Se disemina por contigüidad y en ocasiones por vía hematógena.

Agentes etiológicos: *Actinomyces israelii*, es el causante de actinomicosis; sin embargo, en la actualidad aumentaron en frecuencia de aislamientos: *Arachnia propionica* y *A. viscosus*. Otros agentes etiológicos son: *A. naeslundii*, *A. odontolyticus*, *A. bovis* y *Bifidobacterium dentium (eriksonni)*. Son bacterias anaerobias o microaerofilicas, de forma bacilar, poco ramificadas y que se dividen por fragmentación, son Gram positivos y no ácido alcohol resistentes.

Distribución geográfica: cosmopolita.

Edad, Sexo, Ocupación: afecta a todos los grupos etarios, con más frecuencia entre los 30 y 40 años. Sexo y edad no influyen en su incidencia.

Factores predisponentes: asociada a factores de oportunismo, los más importantes son los traumatismos y la higiene bucal deficiente. Los actinomicetos forman parte de la biota anaerobia habitual del cuerpo humano y se lo aísla de la cavidad bucal.

Generalmente la infección está precedida por un traumatismo bucal. La enfermedad también se presenta en mamíferos: perros, gatos, ovejas.

Clasificación según localización

- **Cervicofacial.** Forma clínica más común, se presenta posterior a un traumatismo en la mucosa bucal (extracción dentaria, fractura de maxilar). Se caracteriza por: dolor leve, edema blando que posteriormente se torna duro, con masas nodulares, granulomatosas que se abscedan y drenan material purulento, granos amarillentos constituidos por las colonias del agente etiológico.

- **Pulmonar.** Los *Actinomyces* llegan al pulmón por extensión directa de una infección del cuello o por la aspiración de microorganismos provenientes de caries dentarias. Las lesiones se presentan principalmente en la región hilar y los síntomas son: febrícula, tos productiva, hemoptisis, pérdida de peso, dolor pleural. Se extiende a pleura, pared torácica hasta drenar un material seropurulento por fistulas a la piel.

- **Abdominal y pélvica.** Es como consecuencia de una perforación intestinal accidental por: espinas de pescados, huesos de pollo, heridas con armas. La causa más frecuente es debida a infecciones primarias a nivel de trompas de Falopio, vesícula biliar e hígado. Los síntomas iniciales son insidiosos y se relacionan con el órgano primario afectado. Se presenta invasión de la pared abdominal, formándose fistulas que drenan secreción purulenta con granos.

• **Otros sitios.** Vesícula, riñón, húmero, válvulas cardíacas, SNC, conducto lagrimal, útero, cervix, vagina (los 3 últimos se asocian por uso del DIU).

Productos biológicos: secreción purulenta, esputo, fragmentos de tejido.

Diagnóstico de laboratorio. Antes de iniciar los exámenes correspondientes es aconsejable lavar la secreción purulenta con solución salina isotónica tres veces.

• **Examen directo.** A partir de la secreción purulenta o esputo, se observan granos de color amarillo “granos de azufre”, que llegan a medir hasta 2,5 mm de diámetro, con finas prolongaciones periféricas llamadas “clavas”.

• **Frotis.** Coloración de Gram, se observan granos y masas de filamentos Gram positivos.

• **Cultivo.** Los productos se deben sembrar en medios anaeróbicos. Tioglicolato, medio de Garrod, medio de anaerobiosis o medio especial para crecimiento de *Actinomyces* o en caldo infusión cerebro corazón o agar sangre en anaerobiosis. Si los granos son muy grandes pueden macerarse en solución salina con un mortero estéril y posteriormente hacer frotis y cultivos.

El desarrollo de colonias suspendidas en medio líquido da la certeza de crecimiento; sin embargo, la morfología colonial es muy variable, por lo que es necesario recurrir a las pruebas bioquímicas para la correcta identificación.

Pruebas especiales. En el Cuadro N°1 se presentan las principales características bioquímicas y fisiológicas que ayudan a la clasificación taxonómica de las diferentes especies de agentes de actinomycosis.

Cuadro N°1: características fisiológicas y bioquímicas de los principales agentes causantes de actinomycosis.

Características	<i>Actinomyces bovis</i>	<i>Actinomyces israelii</i>	<i>Actinomyces naeslundii</i>	<i>Bifidobacterium eriksonii</i>	<i>Arachnia propionic</i>
Aerobio	var	var	var	0	var
Anaerobio	+	+	+	+	+
Catalasa	0	0	0	0	0
Leche tornasolada	red	red	red	red	red
Producción 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
Xylosa	A/var	A	0	A	0
Rafinosa	0	A	A	A	A

var= variable; red= reducida; A= producción de ácido

NOCARDIOSIS

Definición: es una enfermedad aguda o crónica, generalmente supurativa, causada por inhalación o el contacto traumático con *Actinomycetes*, aerobios que habitan en el suelo, y se asocia a pacientes con inmunodepresión en quienes el agente se desarrolla en forma de seudofilamentos.

Agentes etiológicos. *Nocardia asteroides*, *Nocardia brasiliensis*, *Nocardia otitidis*.

Distribución geográfica: cosmopolita.

Edad, Sexo, Ocupación: afecta a todos los grupos etarios, con más frecuencia entre los 30 y 50 años. No tiene predisposición racial ni ocupacional. Se observa mayor incidencia sobre el sexo masculino que sobre el femenino.

Localización. La localización inicial puede ser pulmonar primaria y cutánea primaria.

La infección **pulmonar primaria** constituye el 75% de los casos conocidos, se acompañan de sintomatología y signología respiratoria y general no características de la enfermedad, por lo que el diagnóstico es difícil y requiere de exámenes de laboratorio para confirmarlo. El SNC es el sitio más común de nocardiosis secundaria.

La forma **cutánea primaria** incluye edema, pústulas y un síndrome linfocutáneo que semeja a una esporotricosis.

La forma **diseminada** se presenta en pacientes con inmunosupresión severa y pueden presentarse en otros órganos como riñón.

Productos 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 la técnica de Gram y Kinyoun. Se observan filamentos largos sinuosos, ramificados y fragmentos bacilares Gram positivo, parcialmente ácido alcohol resistentes.

Cultivo. Se siembran en medios de Lowestein-Jensen y Sabouraud antibiótico.

Pruebas especiales. Se describen en el Cuadro N° 2.

Cuadro N° 2. Pruebas de laboratorio empleadas para la clasificación taxonómica de los actinomicetales

Actinomi- cetales	Creci- miento Gelatina	Hidró- lisis Gelatina	Ácido- resis- tencia	Descomposición Ácido a partir de:						
				Caseína	Tirosina	Xantina	Hipoxantina	Lactosa	Xilosa	Arabinosa
<i>N. brasiliensis</i>	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
<i>N. asteroides</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>N. caviae</i>	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-
<i>N. madurae</i>		+	-	+	+	-	+	+	+	+
<i>N. pelletieri</i>		+	-	+	+	-	+	-	-	-
<i>S. somaliensis</i>		+	-	+	+	-	-	-	-	-

TRABAJO PRÁCTICO N° 11

MICOSIS SISTÉMICAS

Las **micosis profundas** se pueden agrupar en dos categorías muy distintas. Esta agrupación se basa en dos factores: la virulencia inherente al hongo y el estado general del huésped. La primera categoría incluye las infecciones causadas por **hongos patógenos verdaderos**: *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paraccoccidioides brasiliensis*. El segundo grupo de infecciones se denomina **oportunistas** debido a que los microorganismos que se incluyen tienen una virulencia muy baja y la producción de enfermedad depende de la resistencia disminuida del huésped a la infección. Los agentes etiológicos más frecuentes de las infecciones oportunistas son *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus*, entre otros. Estas dos categorías son distintas en cuanto a la interacción huésped parásito.

Los **hongos patógenos verdaderos** son aquellas especies que tienen la capacidad de provocar la enfermedad en el huésped humano normal cuando el inóculo es lo suficientemente grande. La mayor parte de estas infecciones son asintomáticas o de muy breve duración y se resuelven con rapidez. La resolución de la infección se acompaña de una resistencia específica a la reinfección. En los individuos que se presenta una infección residual o crónica, la respuesta tisular es de tipo granulomatosa. Tienen una distribución geográfica restringida. Los hongos patógenos muestran transición morfológica, de la forma micélica o saprofitica a la forma levaduriforme parasitaria que se encuentra en los tejidos infectados cuyo aislamiento e identificación son importantes para un diagnóstico correcto.

Los hongos considerados **oportunistas** poseen virulencia inherente muy baja, por lo que las defensas del huésped tienen que estar muy disminuidas para que se establezca una infección. Antes estas enfermedades eran raras pero en los últimos años han aumentado en forma considerable. El establecimiento de las infecciones oportunistas depende primero de que se haya alterado la resistencia del huésped, más que del tamaño del inóculo. No tienen un área geográfica restringida. El aumento de la frecuencia de estas infecciones ha ido en paralelo con el uso de antibióticos, citostáticos, inmunosupresores, esteroides y procedimientos invasivos, quemaduras extensas, traumatismos, heridas graves y enfermedades mortales. La respuesta celular usual es necrótica supurante que a menudo está pobremente organizada en una reacción granulomatosa.

Las alteraciones fisiológicas que suelen provocar los fármacos inmunosupresores y las de la flora normal que provocan los antibióticos pueden predisponer a los individuos frente a las infecciones invasivas por *Candida*. Estas infecciones también son frecuentes en los pacientes con inmunodeficiencias, lo que indica que el sistema inmunitario es uno de los mecanismos que mantiene confinados a los hongos en las zonas en que se alojan como organismos comensales.

En la Tabla 1 pueden verse algunos estados de inmunodeficiencia asociados a micosis.

Tabla 1: principales estados de inmunodeficiencia asociados con micosis oportunistas.

Géneros y especies	Procesos de inmunodeficiencia
<i>Candida albicans</i> , <i>Candida sp</i>	Leucosis, neutropenia severa, SIDA, disgammaglobulinemia, aplasia tímica
<i>Cryptococcus neoformans</i>	SIDA, linfomas, enfermedad de Hodgkin
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Leucosis, agranulocitos, trasplantes hepáticos y cardíacos
<i>Mucor</i> , <i>Absidia</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Histoplasma capsulatum</i> , <i>Trichosporun beigeli</i>	Diabetes grave SIDA Leucosis

Las **micosis sistémicas endémicas** son afecciones provocadas por hongos dimórficos que viven en el suelo de determinadas regiones geográficas (endémicas) e infectan al hombre por vía inhalatoria, ocasionándole procesos infecciosos, que en general curan espontáneamente. En ocasiones, dependiendo de la edad, sexo y/o deficiencias inmunitarias estas infecciones se transforman en enfermedades (con signos y o síntomas localizados), pudiendo diseminarse por vía hematogena y/o linfática y colonizar diversos órganos o sistemas. En nuestro país existen tres micosis sistémicas endémicas: **Histoplasmosis**, **Paracoccidioidomicosis** y **Coccidioidomicosis**. En el norte del continente americano es endémica la **Blastomicosis**. Las micosis sistémicas endémicas pueden presentarse en forma asintomática o sintomática con distinto grado de severidad.

Las infecciones **asintomáticas o micosis infección** pueden pasar desapercibidas, son reconocidas sólo a través de pruebas de intradermoreacción. Las **infecciones sintomáticas** pueden tener signos clínicos moderados o autolimitados, o la enfermedad puede ser progresiva y atacar casi todos los órganos del sistema. Las infecciones progresivas suelen ser fatales.

Micosis infección	Generalmente asintomática Diagnóstico: prueba cutánea positiva No se aísla el agente etiológico No se realiza tratamiento
Micosis enfermedad	Diagnóstico: 1º clínico 2º micológico 3º serológico Curación: 1º clínica 2º micológica 3º serológica

Los hongos que causan este tipo de micosis son en general géneros y especies no relacionadas taxonómicamente y que son morfológica y fisiológicamente diferentes. Todos ellos son **dimórficos** ya que en su vida saprofítica presentan una fase filamentosa y en su fase tisular parasitaria se presentan como hongos levaduriformes. Crecen en la naturaleza como saprófita, habitantes normales del suelo, sobre restos vegetales, etc.

Durante la infección ellos se adaptan a mayores temperaturas del tejido (termotolerancia) y a un menor potencial de óxido-reducción. Tratan de superar las defensas del huésped y adaptarse al mismo cambiando la morfología, pasando de la fase micelial a la fase levaduriforme o a esférulas (*Coccidioides immitis*); estas diferencias no solo son morfológicas sino de composición de pared celular y de metabolismo. En este grupo se incluyen los siguientes agentes etiológicos:

- *Paracoccidioides brasiliensis*
- *Histoplasma capsulatum*
- *Coccidioides immitis*
- *Blastomyces dermatitidis*
- *Sporothrix schenckii* (agente etiológico principalmente de micosis subcutáneas, incluyéndolo en este grupo por su dimorfismo).

Las micosis profundas se diagnostican por medio de técnicas directas de diagnóstico o por procedimientos llamados indirectos.

Los primeros tienen por finalidad cumplir con los postulados Koch, esto es: observar el agente etiológico en el examen microscópico de los tejidos lesionados, obtener un crecimiento en medios de cultivo, reproducir con el material original o con los cultivos una infección experimental en animales de laboratorio y, finalmente, volver a cultivar el agente causal a partir de órganos de estos animales inoculados.

Los procedimientos indirectos de diagnóstico están vinculados a la respuesta inmune específica e incluyen las pruebas serológicas para detectar anticuerpos y a las reacciones intradérmicas.

	HISTOPLASMOSIS	PARACOCCIDIOIDOMICOSIS	COCCIDIOIDOMICOSIS
Agentes etiológicos	<i>Histoplasma capsulatum</i>	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	<i>Coccidioides immitis</i>
Región endémica	Zonas fértiles de la Pampa húmeda, cuenca del Río de La Plata, Pcia. de Buenos Aires, sur de Santa Fe, Córdoba y Entre Ríos. Zona del noroeste de Tucumán y Salta.	Provincias de la Mesopotamia: Entre Ríos, Corrientes y Misiones; Chaco, Formosa, norte de Santa Fe, Santiago del Estero (este), Salta (nordeste región de Orán).	Región precordillerana. Bioclima: regiones con bajas precipitaciones, veranos calurosos y secos, suelos arcillosos, pH alcalino ricos en sales, vegetación xerófila (cactus).
Vía de penetración	Inhalatoria. No existe transmisión interhumana. Factores predisponentes: edad (40 años), sexo masculino, tabaquismo, etilismo, diabetes, leucemia, SIDA.	Inhalatoria. No existe transmisión interhumana. Factores predisponentes: edad (30-60 años), sexo masculino, tabaquismo, etilismo, desnutrición, tareas rurales.	Inhalatoria. Ocasionalmente cutánea. Factores predisponentes: edad (primera infancia y 50 años), diabetes, neoplasias, SIDA.
Micosis Infección	Asintomática. 7 millones en todo el país, 4 millones en la Pampa húmeda.	Es la micosis endémica más frecuente en América del Sur. El mayor índice de infectados es de Argentina, Brasil; Paraguay, Bolivia, Colombia.	Las obras de irrigación han reducido el índice de infección. Se observan infecciones sintomáticas en Catamarca, oeste de Santiago del Estero, La Rioja, norte de Córdoba. El 60% de la micosis infección cursa sin síntomas.
Micosis Enfermedad	Formas clínicas: -histoplasmosis pulmonar crónica. -histoplasmosis diseminada aguda (SIDA). -histoplasmosis diseminada crónica (más frecuente).	Formas clínicas: -Aguda, tipo juvenil -Crónica, tipo adulta -latencia post terapéutica	Formas clínicas: -Enfermedad pulmonar sintomática -Coccidioidomicosis progresiva -Coccidioidomicosis diseminada

PARACOCCIDIOIDOMICOSIS

Enfermedad granulomatosa crónica de la piel, mucosas, ganglios linfáticos y órganos internos cuyo agente etiológico es el *Paracoccidioides brasiliensis*.

Diagnóstico micológico

- **Toma de muestra:** las muestras clínicas se toman de acuerdo con los síntomas del paciente; si el paciente tiene síntomas pulmonares se pedirá esputo seriado o lavado bronqueoalveolar (BAL); si presenta lesiones en piel o mucosas se harán escarificaciones. Si existen adenopatías periféricas se realiza punción o extirpación de ganglios. Se sugiere hacer una extracción de sangre para estudios serológicos.

- **Examen microscópico directo:** al realizar un examen microscópico directo en fresco con OHK 20%, *Paracoccidioides brasiliensis* exhibe elementos esféricos de 10 a 20 μ de diámetro, de pared gruesa y refringente, con inclusiones lipídicas en el citoplasma, habitualmente con múltiples brotes periféricos con aspecto de “timón de barco”.

- **Cultivo:** se realizan cultivos en Sabouraud 40%, Agar selectivo para hongos patógenos, tripticasa soya, infusión cerebro corazón con el agregado de sangre. Son incubados a 28°C para la obtención de la fase micelial y 35-37°C para la fase levaduriforme. La **fase micelial** a 28°C crece lentamente (tres a cuatro semanas) y macroscópicamente se presenta como una colonia de micelio aéreo corto de aspecto vellosa y color blanquecino. Microscópicamente presenta micelio hialino, ramificado, tabicado, fino con escasas conideas y clamidosporas intercalares y terminales. En la **fase levaduriforme** a 37°C, macroscópicamente se observan colonias plegadas, cerebriformes, lisas de aspecto y consistencia pastosa. El examen microscópico exhibe elementos esféricos de 10 a 20 μ de diámetro, de pared gruesa y refringente, multibrotadas tal como aparecen en el tejido infectado.

- En los **cortes histológicos** de paracoccidioidomicosis teñidos con la técnica de PAS: se observan elementos fúngicos como formaciones esféricas, de 10 a 20 μ de diámetro y con múltiples brotes periféricos.

HISTOPLASMOSIS

Es una enfermedad aguda, subaguda o crónica que afecta principalmente al sistema reticuloendotelial producida por el *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, que afecta principalmente al hombre y animales, y es la micosis sistémica endémica más frecuente en la Argentina.

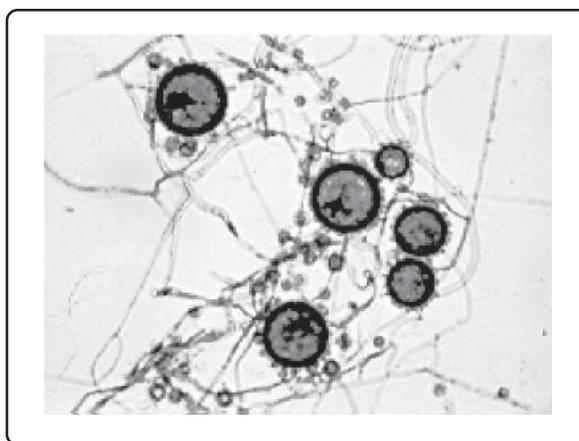
Diagnóstico micológico

- **Toma de muestra:** las muestras clínicas dependen del cuadro clínico del paciente. Las muestras habitualmente estudiadas son esputo, sangre periférica (lisis centrifugación), lavado broncoalveolar. Si presenta lesiones en piel o mucosas se harán escarificaciones. Se sugiere hacer estudios serológicos.

- **Exámen microscópico directo:** se realizará una coloración de Giemsa que permite ver elementos ovoides de 3 a 5 μ de diámetro mayor, a veces con un brote en uno de sus polos y con una masa cromática azul oscura (tinción en casquete), dentro de grandes mononucleares. La pared del parásito no se tiñe y como es moderadamente gruesa, aparece como una aureola clara alrededor del mismo, lo cual fue interpretado como una cápsula y le ha valido el nombre de *Histoplasma capsulatum* (por este último carácter y por multiplicarse dentro de los histiocitos). En los casos típicos, en que dentro de un mononuclear se encuentren varios elementos parasitarios brotantes, el diagnóstico no ofrece dificultades y queda confirmado por simple examen microscópico.

- **Cultivo:** se realizan cultivos en Sabouraud 40%, Agar selectivo para hongos patógenos, Tripticasa soya, Infusión cerebro corazón con el agregado de sangre y antibióticos. Son incubados a 28°C para la obtención de la fase micelial y 35-37°C para la fase levaduriforme. La **fase micelial** a 28°C crece lentamente (tres a cuatro semanas) y macroscópicamente se presenta como una colonia vellosa blanca. Microscópicamente presenta micelio hialino, ramificado, tabicado, que presentan conideas piriformes lisas de 2,5 a 3 μ de diámetro y de macroconideas de 7,5 a 15 μ de diámetro, verrugosas y de color parduzco en los cultivos viejos. La **fase levaduriforme** a 37°C macroscópicamente se observan colonias pastosas, cuyo examen microscópico exhibe elementos levaduriformes pequeños de 2,5 a 3 μ de diámetro, a veces con un solo brote.

- En los **cortes histológicos** de histoplasmosis teñidos con la técnica de PAS se observan las levaduras como pequeñas esferas rojas, con halo claro, dentro de macrófagos o células gigantes.



Macroconideas tuberculadas y microconideas de *H. capsulatum*.

COCCIDIOIDOMICOSIS

El agente etiológico es el *Coccidioides immitis*, es un hongo **muy infeccioso**. Presenta una gran variedad de manifestaciones clínicas. Existe una forma primaria respiratoria aguda pero benigna que cura espontáneamente. Y una micosis progresiva que puede diseminarse y afectar tejidos cutáneos, subcutáneos y óseos. La coccidioidomicosis es probablemente la más grave de las micosis profundas.

Diagnóstico micológico

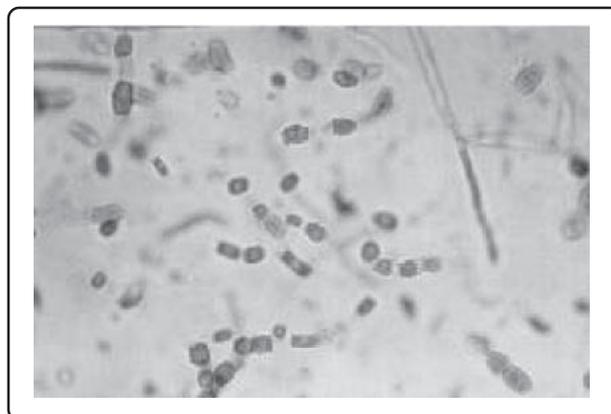
- **Toma de muestra:** en los casos de sospecha clínica de la enfermedad, se procede a examinar muestras de esputo, contenido gástrico, LCR, pus de abscesos subcutáneos y exudados provenientes de lesiones cutáneas.

- **Exámen microscópico directo:** se realiza entre porta y cubre con OHK 20%. El *Coccidioides immitis* aparece en los tejidos infectados como estructuras esféricas de paredes gruesas y refringentes de 20-80 μ de diámetro (esporangios), que están cargadas de endosporas. El diagnóstico de esta enfermedad queda confirmado con el examen microscópico que acabamos de describir.

- **Cultivo:** el material clínico se debe cultivar en Sabouraud 40%, agar selectivo para hongos patógenos. Las colonias a 28°C macroscópicamente son filamentosas algodonosas, blancas y con reverso incoloro. Microscópicamente se observa un micelio hialino, ramificado y tabicado, con dilataciones en raqueta a nivel de los tabiques y arthroconideas o clamidoarthroconideas pequeñas (de 2 por 4 μ) en forma de barril, que toman el azul-lactofenol, típicamente intercaladas entre sí con zonas vacías, que facilita la diseminación y liberación atmosférica. Es difícil manipular el *C. immitis* en el laboratorio sin exponerse a la contaminación. Para observar la forma quística deben inocularse animales de laboratorio.

Se han publicado varios casos de infecciones en los laboratorios. Al trabajar con este hongo conviene humedecer la colonia con solución fisiológica estéril mediante el uso de jeringa y aguja a través del tapón para disminuir el peligro.

- **Histopatología de la Coccidioidomicosis con Hematoxilina-eosina:** se observan esporangios 80 μ de diámetro con endosporos que ocupan totalmente su interior.



Arthroconidias de *C. immitis*

BLASTOMICOSIS

El agente etiológico es el *Blastomices dermatitidis*, es una infección crónica que se caracteriza por la formación de lesiones granulomatosas supuradas en cualquier parte del cuerpo, pero de preferencia en el pulmón, piel y huesos.

Diagnóstico micológico

- **Toma de muestra:** puede recogerse el material de lesiones cutáneas mediante raspados de pequeños fragmentos de tejidos o por la obtención de pus a partir del borde de la lesión. En los abscesos subcutáneos se procede a aspirar el pus con jeringa y aguja. Cuando se sospecha de infecciones generalizadas se debe aspirar el pus con jeringa y aguja y se deben examinar esputo, orina y LCR.

- **Examen microscópico directo:** con OHK 20% entre porta y cubre, el *Blastomices dermatitidis*, se observa en forma de células esféricas de 8 a 15 μ de diámetro y provista de una pared gruesa con un solo brote que se adhiere a la célula progenitora por un tabique ancho.

- **Cultivo:** el material clínico se siembra en agar glucosa Sabourau, incubados a 28-30°C para la obtención de la fase micelial, y en agar infusión cerebro corazón más sangre para la obtención de la fase levaduriforme. El cultivo a 37°C produce una colonia cerebriforme de color beige cuya observación microscópica muestra la misma levadura que aparece en el tejido infectado. La fase micelial (28°C) presenta una colonia algodonosa de color blanco con conideos ovals de 3-4 μ de diámetro, pero no acusa ninguna estructura característica que permita diferenciar a esta especie.

- **Histopatología:** produce una respuesta inflamatoria de tipo mixto, supurativa y granulomatosa. El *B. dermatitidis* aparece en los cortes histológicos, libre en las zonas supuradas, o fagocitado en el interior de células gigantes. En las primeras se muestra el aspecto típico: células esféricas de 10-15 μ de diámetro, con un solo brote adherido a la célula madre por un pedículo ancho. Toma el color rojo intenso con la técnica de PAS y el marrón oscuro o negro con las tinciones de plata de Grocott o Gomori.

ESPOROTRICOSIS

El agente etiológico es el *Sporothrix schenckii*, es una infección subaguda o crónica caracterizada por la aparición en tejido subcutáneo, piel o ganglios linfáticos de lesiones nodulares que se ablandan y desintegran para formar úlceras indoloras. El hongo ingresa -en la mayoría de los casos- por un traumatismo en la piel y ocasionalmente por vía inhalatoria para causar infección pulmonar.

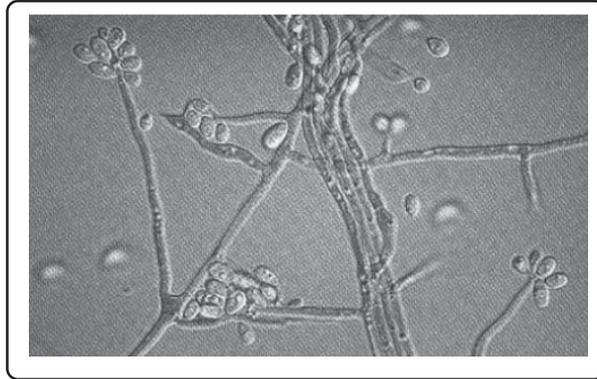
Diagnóstico micológico

- **Toma de muestra:** se recoge el pus o material gomoso obtenido de los nódulos subcutáneos no abiertos con jeringa y aguja; si las lesiones nodulares están abiertas se realiza un hisopado o un raspado profundo, o bien biopsias de piel y esputo.

- **Examen microscópico directo:** en fresco el *Sporothrix schenckii* se presenta con el aspecto de elementos levaduriformes brotantes globosos o fusiformes poco numerosos y difícilmente reconocibles por su escasa refringencia. Conviene colorearlos con PAS o HE para

visualizar así los “cuerpos asteroides“, que son los elementos levaduriformes de 4-6 μ con formaciones radiadas a su alrededor.

• **Cultivo:** se siembran las muestras en agar glucosa Sabouraud y agar selectivo para hongos patógenos a 28-30°C para la fase micelial; e infusión cerebro corazón más sangre a 37°C, para la obtención de la fase levaduriforme. Por examen microscópico del cultivo temperatura ambiente se aprecian hifas finas ramificadas, tabicadas, portadoras de conidióforos laterales que llevan conidios piriformes dispuestos de tal forma que le dan el aspecto de “una margarita”. Del cultivo a 37°C se observan levaduras ovales o en forma de cigarros algunas en gemación, similares a las observadas en los tejidos infectados.



Cultivo de la fase micelial de *Sporothrix schenckii*

DESARROLLO PRÁCTICO

- Observación macroscópica y microscópica de cepas de hongos dimórficos productores de micosis profundas.
- Observación microscópica de preparados permanentes de muestras clínicas y de cultivos provistos por la cátedra.
- Procesamiento de muestras clínicas.

TRABAJO PRÁCTICO N° 12 INMUNODIAGNÓSTICO DE MICOSIS SISTÉMICAS

Consideraciones meticulosas de síntomas y datos epidemiológicos pueden resultar en un diagnóstico presuntivo exacto de una enfermedad micótica, el que a su vez puede ser confirmado con cultivo y exámenes histológicos de laboratorio.

Pero una infección micótica no siempre puede ser probada por histología o por cultivo, en tales situaciones se recurre a procedimientos inmunológicos que pueden dar un primer indicio de la existencia de una infección fúngica.

MICOSIS SISTÉMICAS	Fijación de Complemento	Contrainmuno-electroforesis	Enzimoimmunoensayo	Anticuerpos Fluorescentes	Inmunodifusión	Aglutinación con Partículas de Látex	Radioimmunoensayo	Test de Sensibilidad Cutánea	Aglutinación en Tubo	Precipitación en Tubo
Aspergilosis	x	x	x	x	x		x	x		
Blastomocosis	x		x	x	x		x	x		
Candidiasis	x	x	x	x	x	x				
Coccidioidomicosis	x			x	x	x		x		x
Criptococosis			x	x		x			x	
Histoplasmosis	x	x		x	x	x	x	x	x	
Paracoccidioidomicosis	x	x	x	x	x			x		
Esporotricosis	x		x	x	x	x		x	x	

INMUNODIAGNÓSTICO DE HISTOPLASMOSIS

El suero de pacientes con *histoplasmosis* presenta anticuerpos circulantes a la segunda semana, precipitinas, aglutininas y anticuerpos fijadores del complemento. Son estos últimos los que habitualmente se investigan con fines diagnósticos. Los sujetos con infección actual suelen dar reacciones de fijación del complemento intensas con el suero diluido 1/20 y reacción de inmunodifusión en gel de agar positiva.

La **inyección intradérmica de histoplasmina** convenientemente diluida (generalmente 1/100) produce en los sujetos infectados, una respuesta positiva de tipo tuberculínico (área de induración de por lo menos 5mm) que se lee a las 24 a 48hr. Una reacción positiva es índice de infección actual o pasada, pues persiste durante años y se borra lentamente después de la curación clínica de la histoplasmosis. Tiene poco valor diagnóstico, pero gran valor diagnóstico 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.

La **prueba de fijación del complemento** posee gran valor para establecer el diagnóstico, así como para delinear el pronóstico de la enfermedad. Los anticuerpos fijadores del complemento se pueden presentar a las dos semanas después de la infección y casi todos los pacientes tienen un título demostrable en cuatro semanas. Después de la resolución de la enfermedad, el título disminuye en forma gradual y desaparece por lo general al noveno mes; en otros casos, pueden persistir títulos positivos hasta cuatro años después de la recuperación clínica de la enfermedad con el antígeno micélico, y hasta nueve años con el antígeno de células de levadura. Un título alto (1/32 o más) que persiste en ese nivel, o que aumenta, se considera como índice de enfermedad activa o progresiva.

La **prueba de inmunodifusión** es positiva aparentemente, a partir de la tercera o cuarta semana de la infección. En la placa de Ouchterlony se observaron dos líneas de precipitación significativas. Una línea **M** existía en todas las personas que se habían recuperado de la enfermedad o en los casos de infección temprana. Una línea **H** más cercana al pozo que contenía el suero corresponde a una infección activa, la misma desaparece con la resolución de la enfermedad, pero puede estar presente hasta dos años después de la remisión de la enfermedad. En ocasiones aparece la banda **C** que al parecer representa una fracción antigénica común con **B. dermatitidis**. Otras bandas **X** y **Z** aparecieron en el suero de algunos pacientes pero se desconoce su significado. La **inmunodifusión** suele diferenciar la enfermedad activa de la inactiva.

La **prueba de aglutinación de látex** es positiva en fase temprana de la enfermedad.

INMUNODIAGNÓSTICO DE COCCIDIOIDOMICOSIS

El suero de pacientes con coccidioidomicosis puede presentar precipitinas y anticuerpos fijadores del complemento. La persistencia y aumento del título de anticuerpos son índice de mal pronóstico, pues corresponde a la diseminación de la infección.

La **inyección intradérmica** de 0.1 ml de coccidioidina diluída al 1/100 produce, en sujetos infectados, una respuesta de tipo tuberculínico cuyo máximo de intensidad se aprecia a las 36 h. La lectura debe efectuarse dentro de las 24 a 62 h. La reacción es positiva cuando tiene rojez e infiltración de 5mm de diámetro o mayor, y significa infección actual o pasada. Como la primoinfección es generalmente asintomática o subclínica, se utiliza la intradermoreacción a la coccidioidina para establecer el índice de infectados en las zonas endémicas. Esta prueba no es absolutamente específica pues da reacciones cruzadas con histoplasmina. El resultado de las pruebas cutáneas y serológicas tiene el mismo valor pronóstico y diagnóstico que en la histoplasmosis.

La **reacción de inmunodifusión (ID)** es la más sencilla de realizar, positiva durante todo el proceso patológico.

La **prueba de precipitación en tubo (TP)** es positiva durante períodos variables en la mayoría de los pacientes con enfermedad sintomática. En las primeras semanas de la enfermedad clínica, el 90% de los pacientes sintomáticos tienen prueba positiva de precipitinas; pero al cuarto mes sólo el 10% la tendrán. Por lo tanto, una prueba de precipitinas positiva indica enfermedad temprana activa. Es bastante específica para coccidioidomicosis y las reacciones cruzadas son muy raras.

Los **anticuerpos fijadores del complemento** son los últimos en aparecer, pero son los de mayor importancia en el pronóstico de la enfermedad. Aparece en el 90% de los casos sintomáticos, pero sólo aparece en un 10% en los casos asintomáticos. Aunque suelen desaparecer después de seis a ocho meses de la resolución de la enfermedad, es posible que

persistan en títulos bajos por años. Un título de fijación de complemento que aumenta en forma gradual o persistente, combinado con síntomas clínicos, indica diseminación inminente o ya establecida.

La **prueba de fijación de complemento (FC)** para coccidioidomicosis es específica y son raras las reacciones cruzadas con otras infecciones micóticas. La TP y la FC son muy útiles en el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad de la coccidioidomicosis; pero por desgracia tienen muchas desventajas como pruebas de selección de empleo sistemático o en pequeños laboratorios de diagnóstico. Los principales inconvenientes son el tiempo, la necesidad de equipo especial, la destreza técnica y el costo. Por estas razones fueron sustituidos por dos procedimientos técnicos: **la prueba de inmunodifusión (ID) y la prueba de aglutinación de partículas de látex sensibilizadas con antígeno coccidioidina (LPA)**. Estas dos últimas pruebas son positivas en el 90% de los casos con síntomas clínicos. Las pruebas de FC y la de TP se utilizan para el diagnóstico, como así también para confirmarlo.

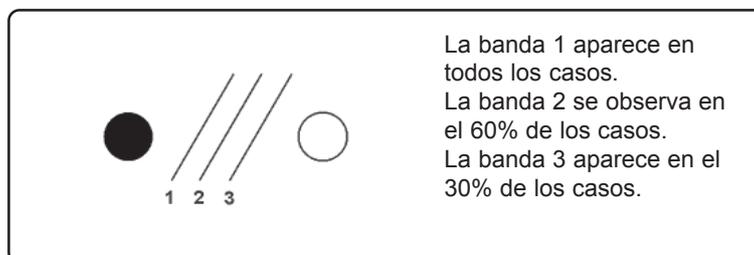
INMUNODIAGNÓSTICO DE PARACOCCIDIOIDOMICOSIS

En paracoccidioidomicosis, en el estudio de la inmunidad humoral se hacen las siguientes determinaciones: **prueba de fijación del complemento (FC), reacción de inmunodifusión (ID), Inmunoelectroforesis (IEF), Contrainmunoelectroforesis (CIEF), Inmunoelectroosmoforesis-inmunodifusión (IEOF-ID)**.

La **prueba cutánea (IDR)** con paracoccidioidina es útil en encuestas epidemiológicas, ya que ayuda a revelar el grado de endemicidad de la micosis. 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 dermoreacción positiva.

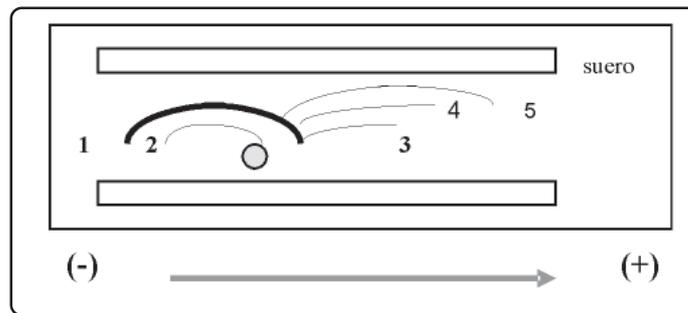
La prueba de **fijación del complemento** es positiva en el 80-90% de los casos con infección activa, con títulos de 1/8 o más. Se producen reacciones cruzadas con otros antígenos de hongos, pero los títulos son más bajos que los obtenidos con antígeno de *Paracoccidioides brasiliensis*.

La **inmunodifusión** con paracoccidioidina (**ID**) es positiva en aproximadamente el 94% en pacientes con infección activa. Pueden aparecer hasta tres bandas denominadas 1, 2 y 3; la que comúnmente se observa es la banda 1. La aparición de tres bandas indica que el estado del paciente es grave. Se preparan las placas con agar al 1.25% en solución fisiológica con el agregado de timerosal. Se practican los pocillos según esquema, una vez sembrados los antígenos y anticuerpos; se incuban por 24 a 48 h en cámara húmeda.



El empleo de la **inmunoelectroforesis** ha mejorado notablemente el diagnóstico inmunológico de diferentes micosis, especialmente en aquellos casos en que condujo a la identificación de fracciones antigénicas específicas del agente. Su aplicación al análisis inmunoelectroforético de extractos solubles de *Paracoccidioides brasiliensis* permitió detec-

tar que el agente de la paracoccidioidomycosis comparte fracciones antigénicas con *Histoplasma capsulatum* y *Blastomyces dermatitidis*. Ante tales evidencias y teniendo en cuenta que los antígenos pueden dar lugar a reacciones inmunológicas cruzadas, la identificación y el eventual aislamiento de fracciones específicas del *Paracoccidioides brasiliensis* adquiere particular interés. El análisis inmunoelectroforético de extractos con sueros hiperinmunes de conejo confirmó que el *Paracoccidioides brasiliensis* posee, como mínimo, 25 fracciones antigénicas. Una de dichas fracciones, de movilidad catódica y portadora de actividad fosfatasa alcalina, reaccionó con todos los sueros inmunes empleados, dando origen a un sistema antígeno-anticuerpo característico que configuró el arco mayor del diagrama. La información obtenida al estudiar extractos solubles de *Paracoccidioides brasiliensis* con sueros humanos puso en evidencia la existencia de cinco arcos de precipitación; uno de ellos es el sistema precipitante característico denominado “**arco 1**” de movilidad catódica.



El **arco 1** aparece en el 100% de los casos; es nítido de posición catódica con el extremo anterior rodeando el orificio del antígeno. Es delgado.

El **arco 2** es otro arco catódico, grueso, paralelo al arco 1 y por dentro de él, corto.

El **arco 3** es corto, delgado, de escasa proyección anódica y nítido.

El **arco 4** nítido con curvatura semejante al arco 1.

El **arco 5** anódico, delgado, aparece contra la canaleta del suero.

La **Inmunoelectroosmoforesis-Inmunodifusión** fue propuesta por Conti Díaz en 1973 y es una modificación de la contrainmunoelectroforesis; consiste en agregar a la fila de los pocillos para el suero y a la fila de pocillos para el antígeno, una tercera fila de pocillos igual a la primera, en el otro extremo de la lámina.

La técnica consiste en que se deposita el antígeno y el suero, el primero en el pocillo central, y el segundo en el pocillo cercano al ánodo. Se aplica la corriente eléctrica (2,5mA por portaobjeto) por 1h.

Las placas son preparadas con agarosa al 0.9% en *buffer* veronal Ph 8.6. Este *buffer* también se utiliza en la cuba electroforética.

Se retiran las placas de la cuba y se deposita nuevamente el suero, pero esta vez en los pocillos cercanos al cátodo. Se incuba el portaobjeto, en cámara húmeda por 24h.

Debido a que el antígeno de *Paracoccidioidomycosis brasiliensis* tiene bandas de movilidad catódica y anódica, por medio de esta técnica vamos a detectar bandas de precipitación a ambos lados del pocillo del antígeno. Los **arcos 1 y 2** se desdoblán a ambos lados del pocillo del antígeno. Los **arcos 3, 4 y 5** se observan entre el pocillo del antígeno y el pocillo anódico. Esta técnica es sensible y específica para *P. brasiliensis*.



La conrainmunolectroforesis (CIEF) en paracoccidioidomicosis presenta un 8.5% de reacción cruzada con histoplasmosis. Es una técnica más rápida, más sensible pero menos específica que la ID; sin embargo, su menor especificidad no le resta utilidad clínica.

INMUNODIAGNÓSTICO DE BLASTOMICOSIS

La **inyección intradérmica** de blastomicina, convenientemente diluida, da una respuesta de tipo tuberculínico en los pacientes y presenta reacciones cruzadas con la histoplasmina.

La **prueba de fijación de complemento (FC) y la doble inmunodifusión (ID)** son las pruebas que se suelen usar para el diagnóstico de la enfermedad. La ID tiene alta especificidad para la blastomicosis con una sensibilidad de 80%. La FC es altamente sensible, pero de un gran número de resultados falsos positivos.

INMUNODIAGNÓSTICO DE ESPOROTRICOSIS

El suero de pacientes contiene anticuerpos fijadores del complemento, aglutininas y precipitinas, pero son de poca utilidad para el diagnóstico de la esporotricosis subcutánea.

La **conrainmunolectroforesis (CIEF)** con antígeno citoplasmático de *S. schenckii* proporciona resultados positivos y específicos en la mayoría de los pacientes.

La **ID** junto con la **aglutinación con látex (AL)** son las más específicas. La ID no produce reacciones cruzadas con otras infecciones micóticas, bacterianas y parasitarias; resultando positiva en todos los casos de enfermedad extracutánea.

Con **Inmunolectroforesis** se detectaron hasta 30 bandas de precipitación, de las cuales una tiene movilidad anódica; se denomina arco "S", específico de *S. schenckii*.

INMUNODIAGNÓSTICO DE ASPERGILOSIS

Para el diagnóstico de la aspergilosis se utilizan la **ID** y la **CIEF**, que son excelentes técnicas indicativas de infección, colonización o alergia. La CIEF es más sensible que la ID. La ID permite el diagnóstico del 93% de los casos de aspergilloma, 88% de aspergillosis invasiva y el 50% de las alergias por *Aspergillus*. Pueden aparecer hasta cinco bandas de precipitación en los casos fulminantes.

DESARROLLO PRÁCTICO

Realización de las pruebas de:

- Inmunodifusión.
- Inmunolectroforesis.
- Conrainmunolectroforesis.
- Inmunolectroosmoforesis-inmunodifusión, con antígenos fúngicos, antisueros específicos y sueros de pacientes con sospecha clínica de micosis sistémica.

BIBLIOGRAFÍA

- Alexopoulos, C. (1979)
Introducción a la Micología. (3ª Edición) Editorial Universitaria de Buenos Aires.
- Conti Díaz, I. A.; Somma Moreira, R. E.; Gezuele, E.; Giménez, A. C. (1973)
Inmunoelectroosmoforesis-inmunodifusión in Paracoccidioidomycosis. Rev Sab 11: 39-41.
- Davel, G.; Rodero, L.; Cantero, C.; Córdoba, S.; Perrota, D. (2000)
Diagnóstico e identificación de levaduras de interés médico. Departamento de Micología. INEI. ANLIS. "Dr. Carlos Malbrán".
- Davel, G.; Canteros, C. (1995)
Micosis superficiales. Departamento de Micología. Instituto Nacional "Dr. Carlos Malbrán". Buenos Aires. Argentina.
- Davel, G.; Canteros C.; Rodero, L. (1995)
El Laboratorio y el Diagnóstico de las Micosis Sistémicas. Departamento de Micología. Instituto Nacional de Microbiología. "Dr. Carlos Malbrán". Buenos Aires. Argentina.
- Deacon, J. W. (1993)
Introducción a la Micología Moderna (2ª Edición). Limusa Noriega Editores.
- Koneman, E. W.; Roberts, G. D. (1987)
Micología. Práctica de laboratorio. (3ª Edición). Médica Panamericana, Buenos Aires. Argentina.
- Lopez Martínez, R.; Mendez Tovar, L. J.; Hernández, F.; Castañón Olivares, R. (1995)
Micología Médica, Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio. (1ª Edición) Ed. Trillas, México.
- MARGNI, R. (1996)
Inmunología e Inmunquímica. Fundamentos. (5ª Edición) Editorial Médica Panamericana.
- Medvedeff, Martha; Mereles, Beda; Vedoya, Celina; Chade, Miriam. (2003)
Micosis Superficiales y Cutáneas. Editorial Universitaria. Universidad Nacional de Misiones. (1ª Edición) Argentina.

- Negróni, R. (1997)
Lecciones de Clínica Micológica. (1ª Edición) Editorial La Agenda, Argentina.
- Negróni, P.; Negróni, R. (1989)
Micosis Cutáneas y Viscerales. (9ª Edición) López Libreros, Buenos Aires.
- Negróni, R.; Guelfand, L. (1999)
Manual de Procedimientos para laboratorios de Micología Médica. Editado por la Federación Bioquímica de la provincia de Buenos Aires.
- Neufeld Murillo, P. (1999)
Manual de Micología Médica. Técnicas Básicas de Diagnóstico. Programa Nacional de Controle de Qualidade. Rio de Janeiro. Brasil.
- Perman, Javier; Martín Mazuelos, Estrella; Rubio Calvo, M. Carmen.
Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica. Rev. Iberoamericana de Micología. (1ª Edición) España. 2001.
- Restrepo, A.; Drouchet, E. (1970)
Etude des Anticorps precipitants dans Blastomyose sud-Américaine Des Antigenes de Paracoccidioides brasiliensis. Extrait Des Annales de L' Institut Pasteur. 119.
- Restrepo, M. A.; MONCADA, L. A. (1985)
Characterization of the precipitin bands detected in the immunodifusión test of paracoccidioidomycosis. Appl Microbiol 28: 138-144.
- Restrepo, A. (1986)
La prueba de inmunodifusión en el diagnóstico de la paracoccidioidomycosis. Rev. Sab. 4: 223-230.
- Rippon, J. W. (1990)
Tratado de Micología Médica. (3ª Edición) Interamericana McGraw-Hill, México.
- Torres Rodríguez, J. M.; Del Palacio Hernanz, A; Guarro Artigas, J.; Negróni Bris, R.; Pereiro Míguas, M. (1993)
Micología Médica (1ª Edición). Editorial Masson, Barcelona .