

Libros de **Cátedra**

Micología en Medicina Veterinaria

Guía de laboratorio para el diagnóstico de las micosis

Susana Beatriz Córdoba, Francisco José Reynaldi
y Diana Esther Rosa (coordinadores)

FACULTAD DE
CIENCIAS VETERINARIAS

n
naturales


EDITORIAL DE LA UNLP



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

MICOLOGÍA EN MEDICINA VETERINARIA

GUÍA DE LABORATORIO PARA EL DIAGNÓSTICO DE LAS MICOSIS

Susana Beatriz Córdoba
Francisco José Reynaldi
Diana Esther Rosa
(coordinadores)

Facultad de Ciencias Veterinarias



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA


Eduulp
EDITORIAL DE LA UNLP

Dedicado a las y los estudiantes, fueron, son y serán nuestra motivación...

Agradecimientos

Agradecemos a nuestra Universidad Nacional de La Plata, gratuita, laica, inclusiva, por ser el canal de comunicación que nos permite llegar con este material de estudio, no solo a quienes transitan por nuestra casa, la Facultad de Ciencias Veterinarias, sino también, a quienes desean ampliar sus conocimientos en áreas poco exploradas de la Microbiología en Medicina Veterinaria.

Yo no enseño a mis alumnos, sólo les proporciono las condiciones en las que puedan aprender.

Albert Einstein

Índice

Introducción _____ 8

Capítulo 1

Características generales de los hongos _____ 9

Verónica A. Amor

Capítulo 2

Técnicas, bioseguridad, toma de muestras _____ 23

Diana E. Rosa, Verónica A. Amor, Marco A. Tizzano

Capítulo 3

Hongos miceliales y micosis oportunistas _____ 38

Francisco J. Reynaldi

Capítulo 4

Micosis oportunistas por levaduras _____ 63

Susana B. Córdoba, Romina Della Vedova

Capítulo 5

Micosis superficiales _____ 84

Romina Della Vedova, Diana E. Rosa

Capítulo 6

Micosis endémicas _____ 100

Romina Della Vedova

Capítulo 7

Micosis por implantación _____ 116

Diana E. Rosa, Susana B. Córdoba, Francisco J. Reynaldi

Capítulo 8

Antifúngicos. Pruebas de sensibilidad _____ 138

Susana B. Córdoba

Capítulo 9

Biología molecular y diagnóstico micológico _____ 165

Marco A. Tizzano, Francisco J. Reynaldi

Atlas _____ 176

Susana B. Córdoba, Romina Della Vedova, Diana E. Rosa

Anexo _____ 181

Verónica A. Amor, Francisco J. Reynaldi, Marco A. Tizzano

Los autores _____ 193

Introducción

En Medicina Veterinaria el diagnóstico clínico y de laboratorio de las infecciones causadas por hongos presenta dificultades aún sin resolver.

En general, en nuestro país el médico veterinario clínico y los laboratorios dedicados al diagnóstico veterinario solo están familiarizados con la ocurrencia de micosis superficiales en pequeños animales, pero no lo están con las infecciones fúngicas sistémicas, o las zoonóticas, la mayoría de curso letal y en franca expansión.

Las infecciones fúngicas no diagnosticadas llevan al deterioro en la salud o la muerte de un animal, lo que ocasiona pérdidas, no solo en lo económico, sino también en lo emocional para las personas. Además, se suma la frustración y el descrédito profesional.

Como educadores tenemos el compromiso de proporcionar las herramientas que le permitan al educando alcanzar niveles de conocimientos acordes con el continuo avance tecnológico.

Esperamos que este material de estudio constituya un aporte significativo para consolidar los procesos de formación de grado/pregrado, con un impacto positivo en el desempeño profesional de los educandos.

CAPÍTULO 1

Características generales de los hongos

Verónica Andrea Amor

El aprendizaje es experiencia, todo lo demás es información

ALBERT EINSTEIN, 1879-1955

Citología, metabolismo, micelio y reproducción

Los hongos integran un complejo y numeroso grupo de organismos ampliamente distribuidos en el suelo, las plantas, el agua y el aire. Están clasificados dentro del reino *Fungi* y se conocen aproximadamente 600000 especies, de las cuales solo unas 400 son patógenas para mamíferos.

La Micología, es la rama de la microbiología que se encarga del estudio de los hongos.

El término micología, proviene del latín moderno *mycologia* que está formado por las voces griegas *mykes* (hongo) y *logos* (estudio, tratado, discurso) y el sufijo de calidad *-ia*, que puede traducirse como “el estudio (*logos*) o la ciencia que trata sobre los hongos (*mykes*).”

Las características distintivas de los hongos son las siguientes:

- Están formados por células de tipo eucariota, es decir, células que poseen un núcleo organizado, rodeado por una doble membrana nuclear que lo delimita del citoplasma, en el que hay una gran cantidad de organelas que cumplen diferentes funciones.
- Contienen esteroides en su membrana celular y poseen una pared celular formada por quitina, glucanos y glicoproteínas. Estos componentes celulares, los diferencian del resto de los seres vivos.
- Según su tipo de nutrición, son heterótrofos, dado que carecen de clorofila y obtienen nutrientes por absorción de materia orgánica sintetizada por otros organismos, que usan como fuente de energía y de carbono; pueden descomponer organismos muertos (saprófitos) o pueden obtener los nutrientes de organismos vivos (parásitos). Debido a la presencia de la pared celular rígida, los hongos son incapaces de englobar microorganismos o alimento por fagocitosis, en cambio, secretan enzimas digestivas, llamadas polimerasas, sobre la fuente de alimento y luego absorben nutrientes simples y solubles, que se originan producto de esta degradación.

- Su cuerpo, llamado talo o micelio, está constituido por múltiples filamentos o hifas (mohos) conformados por una sucesión de células interconectadas o por estructuras unicelulares (levaduras).
- Son euritérmicos, es decir, crecen en un amplio rango de temperatura, pero su desarrollo óptimo se da entre los 25 °C y 30 °C.
- Toleran un amplio rango de pH (2,5 - 7,5) aunque, en general soportan mejor el medio ácido que el alcalino.
- Se reproducen de manera sexual y asexual, mediante esporas.
- Son inmóviles.
- En cuanto a su origen y evolución, se los considera un grupo polifilético. Esto significa que no descienden todos de un antepasado común, sino que sus semejanzas estructurales y/o fisiológicas se deben a fenómenos de convergencia evolutiva y derivan independientemente de varios linajes eucarióticos no emparentados entre sí.
- Junto con las bacterias, los hongos son responsables de la degradación de grandes cantidades de materia orgánica compleja (biodegradación), esta actividad es fundamental para el buen funcionamiento equilibrado de los ecosistemas, permitiendo así completar el ciclo de la materia y de la energía.

Dada la gran diversidad de las reacciones metabólicas que se producen en los hongos, es posible obtener muchos beneficios a nivel industrial y ambiental.

Las levaduras son un eslabón importante en la industria alimenticia, numerosas especies están involucradas en procesos de fermentación industrial tales como la producción de pan y bebidas alcohólicas (*Saccharomyces cerevisiae* cerveza, vinos, sidra). Además, las levaduras, son usadas con frecuencia en estudios de biología molecular e ingeniería genética tanto como modelos para investigar diversos fenómenos en organismos eucariotas, así como para producir proteínas que luego se usan en la producción de equipos para la detección de patógenos (por ejemplo, ELISA, inmunoserología, etc.).

Por su parte, algunas especies de hongos miceliales son usados en la elaboración de diferentes tipos de quesos (*Penicillium roqueforti*, *Penicillium camemberti*); antibióticos como la penicilina (*Penicillium chrysogenum*) o las cefalosporinas (*Cephalosporium acremonium*), elaboración de enzimas (pectinasas, amilasas, proteasas) y ácidos orgánicos (cítrico, láctico, málico, *Aspergillus niger*), que son de importancia en la industria alimenticia, farmacéutica, etc.

A nivel ambiental, los hongos son responsables, junto a las bacterias, del reciclado de la materia en los ecosistemas, por lo tanto, conocer estos mecanismos puede ser de importancia fundamental para ser aplicados en la descontaminación y recuperación de ambientes naturales (biorremediación) o en el tratamiento de afluentes industriales.

Por otra parte, los hongos también generan muchos perjuicios. Producen el biodeterioro de alimentos, papel, cuero, maderas, obras de arte, medicamentos, edificios, etc., así como diversos daños en cultivos y plantas con valor comercial; pueden actuar como patógenos de animales y de las personas, ocasionando diversas enfermedades (micosis) y pueden producir enve-

nenamiento por ingestión de hongos (micetismo) o por ingestión de alimentos contaminados con metabolitos o sustancias precursoras de toxinas producidas por los hongos, como las aflatoxinas (*Aspergillus sp.*), fusarinas (*Fusarium sp.*), y ergotoxinas (*Claviceps purpurea*) o su esclerocio (comezuelo del centeno), que produce alcaloides como el ácido lisérgico (precursor del LSD) y la ergotamina (utilizada en obstetricia y como antimigrañoso), etc.

Citología

Estructura de la célula fúngica

Los hongos, por su citología son eucariotas, poseen núcleo organizado, citoplasma con vacuolas, organelas, mitocondrias, retículo endoplásmico, etc.

En la figura 1 se muestra un esquema de las principales estructuras que conforman una célula fúngica.

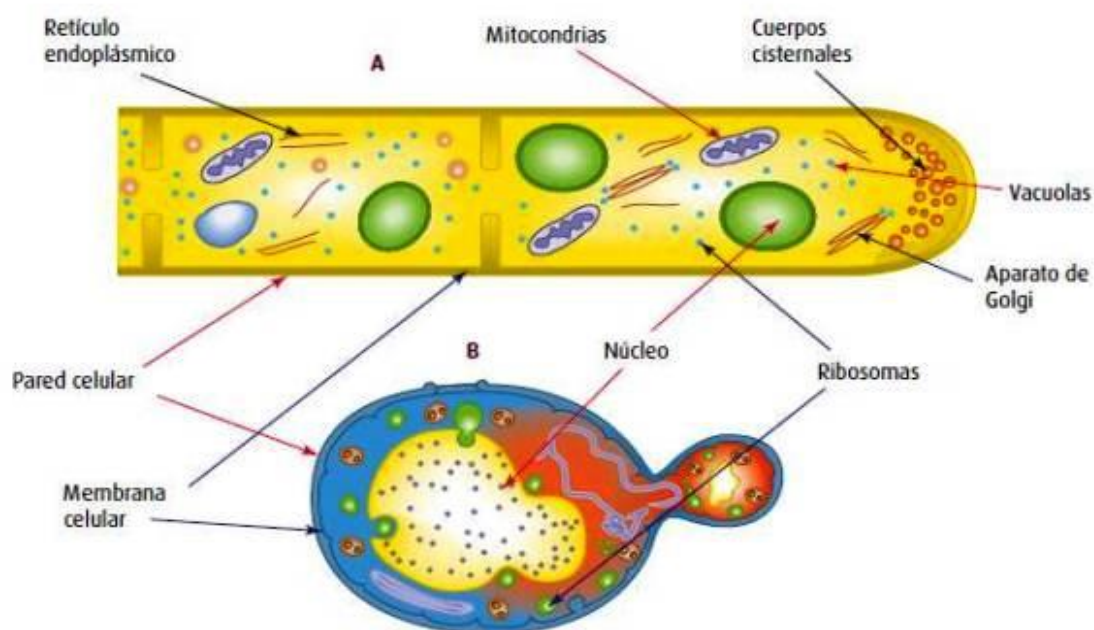


Figura 1: Representación esquemática de células fúngicas.

<http://tiposdecélulas.com/célula-fúngica>

Pared celular

La pared celular de los hongos es una estructura que le da forma a la célula, controla la permeabilidad y la protege de diferentes tipos de estrés ambiental, por ejemplo, los cambios osmóticos. Permite la interacción con el medio externo ya que algunas de sus proteínas son

adhesinas y receptores, que desencadenan cascadas de señales en el interior de la célula. Esta interacción juega un rol muy importante en el desarrollo de la acción patógena fúngica y constituye una diana de gran importancia en la terapia antifúngica, ya que sus componentes no están presentes en las células animales.

La pared celular fúngica está compuesta básicamente de polisacáridos y proteínas. Entre los polisacáridos se destacan la quitina, el glucano y el manano o el galactomanano. Las proteínas generalmente están asociadas a polisacáridos, formando glicoproteínas. Todos estos componentes están relacionados entre sí dando lugar a una estructura rígida que se esquematiza en la figura 2.

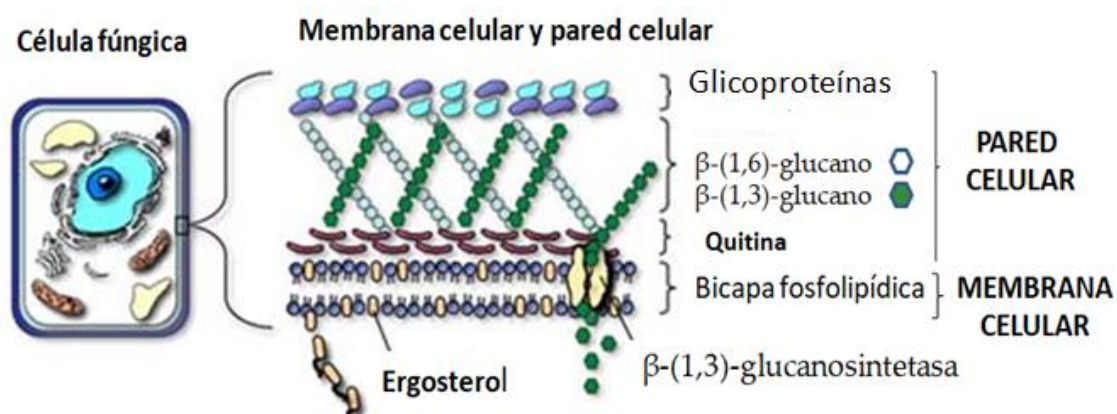


Figura 2: Representación esquemática de la membrana celular y la pared celular

Se pueden diferenciar dos componentes principales: un retículo interno más o menos organizado de microfibrillas de quitina que le confiere rigidez a la célula, y una matriz polimérica geliforme, rica en β -(1,3) y β -(1,6) glucanos y glicoproteínas.

La pared fúngica puede ser incolora o hialina, o puede presentar distintas coloraciones oscuras por la presencia de pigmentos pardos en aquellos grupos de hongos que poseen melanina.

Componentes de la pared celular

- **Glicoproteínas.** Forman parte importante del peso seco de la pared celular de las levaduras (30-50 %) y de la pared de los hongos miceliales (20-30 %). Las proteínas tienen diversas funciones: participan en el mantenimiento de la forma celular, intervienen en los procesos de adhesión, protegen a la célula de sustancias extrañas, participan en la absorción de moléculas, transmiten señales al citoplasma y sintetizan y remodelan los componentes de la pared.
- **Quitina.** La pared celular de los hongos miceliales tiene un contenido mayor de quitina en la pared celular (10-20 %) que el que presentan las levaduras (1-2 %).

- **Glucano.** Es el mayor componente de la pared (50-60% del peso seco). La composición de las uniones de los polímeros de glucano varía de acuerdo a si se encuentran en Ascomycetes, p. ej. en *Candida* sp., y en *Aspergillus* sp. con predominio de uniones α -1,3 (65-90 %), mientras que en los hongos Basidiomycetes, p. ej. *Cryptococcus* sp., *Rhodotorula* sp. hay predominio de uniones con enlaces α -1,6. Las uniones α -1,3(D-glucano) son blanco de acción de drogas antifúngicas.

Membrana celular

La membrana celular es una barrera entre la célula y el ambiente que cumple importantes funciones: debido a su permeabilidad selectiva regula la entrada y salida de agua, iones y metabolitos, mantiene el medio interno separado del externo, percibe y reacciona ante estímulos provocados por sustancias externas, posee receptores químicos que se combinan con moléculas específicas que permiten a la membrana recibir señales y responder de manera específica.

Se compone de una bicapa de glicerofosfolípidos en la que se anclan otros lípidos y proteínas, y difiere de las membranas subcelulares porque contiene una alta proporción de esteroides y esfingolípidos. (Figura 3).

Los esteroides son el tercer grupo de lípidos más importante en las membranas biológicas. Las membranas celulares de los animales contienen colesterol, las vegetales fitoesterol, mientras que las membranas fúngicas contienen ergosterol.

El ergosterol da fluidez e integridad a la membrana, permite la función apropiada de muchas enzimas unidas a ella y, al favorecer la función de la quitina sintetasa, permite el crecimiento y la división celular. El ergosterol es el sitio blanco de la membrana sobre el cual actúa la mayoría de los fármacos antifúngicos.

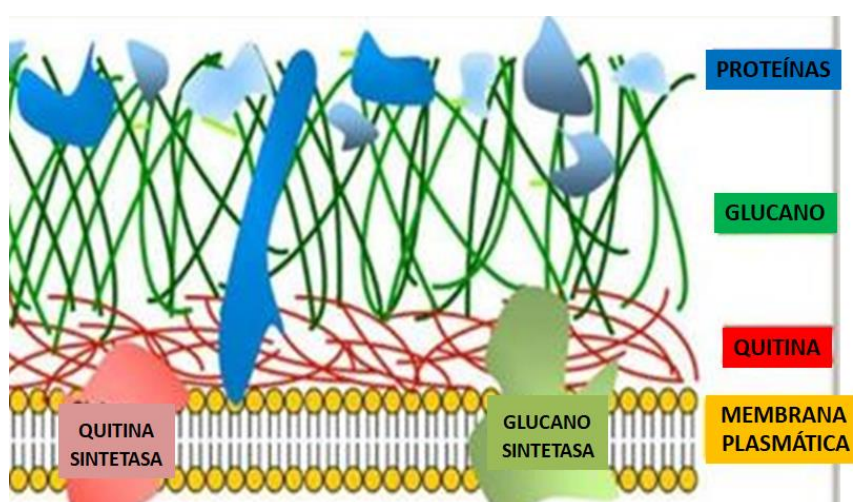


Figura 3: Representación esquemática de la membrana celular y la pared celular.

Cápsula

Algunos hongos poseen una cápsula que recubre a la pared celular, está constituida por un complejo de polisacáridos y es un factor de virulencia que protege a la célula fúngica frente a las defensas del hospedador. (Foto 1).

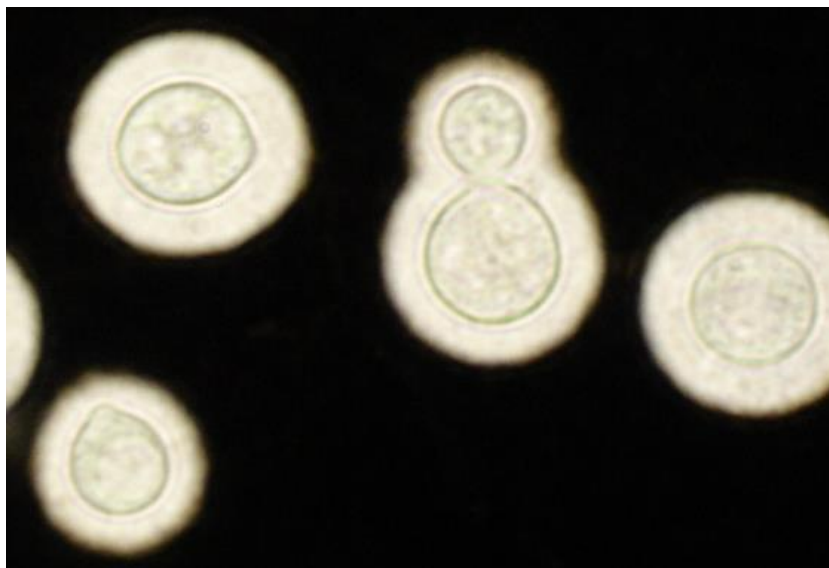


Foto 1. Levadura rodeada por cápsula de mucopolisacárido, observada al microscopio óptico, contraste con tinta china.

Organelas

Las organelas presentes en la célula son:

- Núcleo y membrana nuclear.
- Mitocondrias, en las que se produce la respiración celular.
- Retículo endoplasmático liso, donde se produce el metabolismo de lípidos.
- Cuerpos cisternales o dictiosomas que liberan dos tipos de vesículas:
 - a) macrovesículas con capacidad para atravesar la membrana celular y enzimas líticas
 - b) microvesículas que contienen la enzima quitina sintetasa

El crecimiento de la célula fúngica ocurre según la cantidad y disposición de las macrovesículas y microvesículas.

- Lomasomas, son estructuras formadas por membrana celular, situadas entre la pared celular y la membrana plasmática. Se encuentra más frecuentemente en los hongos que en otros organismos. No tienen función conocida.

- Aparato de Golgi: en los hongos no presenta las características estructurales que se observan en las células de animales. Más bien, se considera que el aparato de Golgi está conformado por un sistema de cisternas lisas, lomasomas y pequeñas vacuolas con membranas. (Figuras 4 y 5).

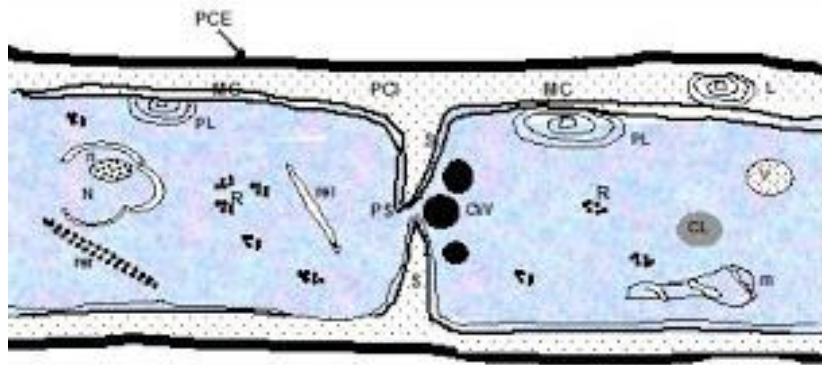


Figura 4: Representación esquemática de una hifa septada. Se muestra la pared celular interna (PCI) y externa (PCE), septo (S), poro septal (PS), membrana citoplasmática (MC), lomasomas (L), retículo endoplasmático liso (rel) y rugoso (rer), núcleo (n), ribosomas (r), mitocondrias (m), vacuolas (V).

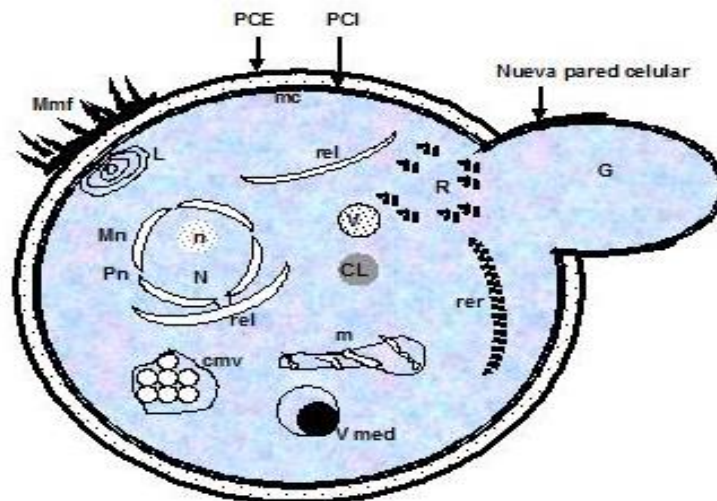


Figura 5: Representación esquemática de una célula levaduriforme. Se observa pared celular externa (PCE) y pared celular interna (PCI), membrana citoplasmática (mc), lomasomas (L), retículo endoplasmático liso (rel) y rugoso (rer), núcleo (N) con membrana nuclear (Mn), ribosomas (r), mitocondrias (m), vacuolas (V).

Fuente: <http://atlasdemicologia.blogspot.com/2008/11/estructura-subcelular-los-hongos-al-ser.html>

Fisiología y metabolismo fúngico

Los hongos necesitan para su crecimiento y desarrollo los siguientes compuestos:

- Sustancias nitrogenadas: aminoácidos o proteínas, como la peptona.
- Hidratos de carbono, como la glucosa, manosa o fructosa. La glucosa es el hidrato de carbono más utilizado y es considerada una fuente de carbono universal.

- Minerales como el fósforo, magnesio, azufre, cobre, hierro, zinc, potasio y calcio.
- Si bien desarrollan en un amplio rango de pH, desarrollan mejor a pH ácido, (5 a 6,5).
- Una temperatura adecuada. De acuerdo con los rangos de temperatura a la que se desarrollan las diferentes especies de hongos, pueden dividirse en termófilos (resisten hasta 55 °C), mesófilos (crecen los 10 a 50 °C) y psicrófilos (crecen mejor de 0 a 20 °C). La temperatura ambiente de 20 a 30 °C permite el desarrollo de casi todos los hongos.
- Un soporte sólido, como el agar, que permita a los hongos miceliales desarrollar micelio aéreo.

Metabolismo primario

En las células fúngicas ocurren procesos metabólicos que tienen como finalidad el crecimiento y la multiplicación celular y que incluyen la síntesis de componentes estructurales celulares (como proteínas, ácidos nucleicos, componentes de la pared y membrana celular, entre otros), reproducción celular y viabilidad. Estos productos, son sintetizados en la etapa activa o fase exponencial de crecimiento celular.

Metabolismo secundario

Son los procesos metabólicos que realiza la célula fúngica cuyo producto final son compuestos que son excretados al medio, pero no tienen importancia vital para la misma. Estos compuestos son sintetizados a partir de la energía, a partir de productos intermediarios o productos finales del metabolismo primario en etapas del ciclo celular donde el crecimiento es lento y sostenido. La biosíntesis de metabolitos secundarios se produce en condiciones adversas para el desarrollo como las que se producen por agotamiento de nutrientes en el medio, la diferenciación y la esporulación.

Algunos metabolitos secundarios conocidos por su importancia, son los antibióticos penicilina, griseofulvina y cefalosporina, las micotoxinas (aflatoxinas), los alcaloides ergotamina o ácido lisérgico, entre otros.

Importancia de los minerales utilizados por los hongos

Fósforo: es el elemento más abundante presente en las cenizas de hongos. Tiene un papel importante en el desarrollo de la célula fúngica como parte integrante de compuestos vitales. El mayor contenido en fósforo se encuentra en el micelio joven y en los conidios.

Azufre: el contenido de azufre de las células es variable. Forma parte de enzimas, proteínas, aminoácidos (cistina y metionina) y vitaminas (tiamina y biotina).

Potasio: influye en el metabolismo de los hidratos de carbono y la absorción de los fosfatos.

Magnesio: es un elemento esencial para todos los hongos. Es un activador de numerosas enzimas, por ej.: fosfato transferasa. El contenido de magnesio en el micelio depende de la edad del cultivo y de la presencia de nitrato.

Hierro: es un constituyente esencial de varias enzimas como citocromo oxidasa, catalasa y otras.

Zinc: constituyente o activador de enzimas como alcohol deshidrogenasa y citocromo C.

Cobre: forma parte de varias enzimas como la tirosinasa y participa en la biosíntesis de las enzimas nitrito e hiponitrito reductasas.

Nitrógeno: los hongos lo obtienen a partir tanto del nitrógeno inorgánico como del orgánico presentes en la naturaleza y son incorporados a la célula fúngica durante el crecimiento activo. La mayoría de los hongos utilizan nitratos, aunque algunas levaduras no lo necesitan para su metabolismo y esta característica es utilizada con fines taxonómicos.

En los hongos el nitrato actúa como un aceptor de electrones alternativo en algunos hongos cuando el suministro de oxígeno es bajo. El amonio, un electrolito débil, ingresa a la célula por la difusión pasiva de su molécula disociada. Las levaduras son muy permeables a la molécula de amonio y todas son capaces de crecer en presencia de sulfato de amonio. Por otra parte, el nitrito es utilizado por los hongos, aunque resulta tóxico en concentraciones elevadas.

Crecimiento fúngico

Los hongos por su conformación pueden ser unicelulares (levaduras) o pluricelulares (mice-liales), originan talos simples, sin tejidos mayormente diferenciados. En este proceso, la hifa se va extendiendo y el citoplasma fluye hacia la nueva parte. Al crecer se van ramificando y cada ramificación continúa el crecimiento apical hasta que se forma un conjunto visible de filamentos. Los micelios reproductivos crecen hacia la superficie externa del medio y son los encargados de formar los orgánulos reproductores para la formación de nuevos micelios.

El crecimiento implica una sucesión de procesos ordenados de división nuclear y de duplicación o replicación de las demás estructuras celulares, lo que conduce al aumento de todos los constituyentes de una célula. En los hongos tabicados el crecimiento también incluye la división celular, mientras que en los hongos no tabicados o cenocíticos se encuentran muchos núcleos en el mismo citoplasma.

En la práctica, en el laboratorio, el crecimiento de un hongo se manifiesta como el incremento en la masa o en el número de células de un inóculo después de un tiempo de incubación en un medio de cultivo adecuado.

Tipos de micelio

El cuerpo de los hongos se denomina talo o micelio. De acuerdo con su función se diferencian distintos tipos de micelio:

- **Micelio vegetativo**, desarrolla actividades vinculadas a la adherencia, sostén, resistencia, desarrollo, nutrición (metabolismo), disseminación y producción del micelio de fructificación.

De acuerdo al número de células que lo compongan, el micelio vegetativo puede ser:

- Unicelular**, constituido por células simples y aisladas, con forma esférica, ovoide, cilíndrica, triangular, etc., que se multiplican por brotación, escisión (bipartición) o proceso intermedio, conformando el micelio tipo “levadura” o levaduriforme. En algunos hongos de micelio unicelular, se producen a partir de una sola célula y por brotación sucesiva, cadenas lineales o ramificadas de células semejanado hifas verdaderas, pero sin los septos característicos, originando un micelio pseudotabicado (seudohifas), como se observa en las siguientes fotos:

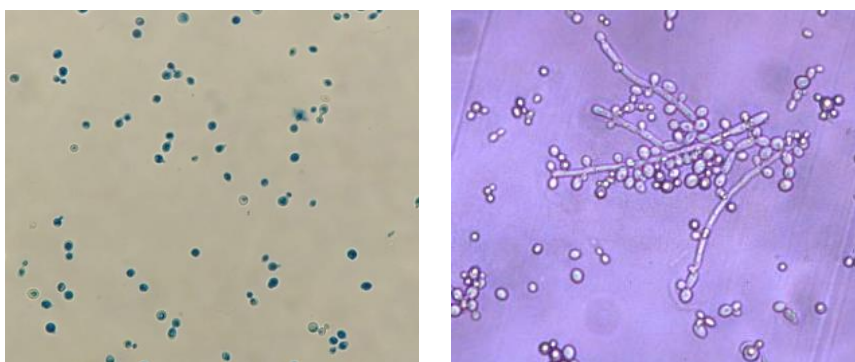


Foto 2: a-Micelio unicelular, 2 b-Micelio pseudotabicado (seudohifas)

- Multicelular**, cuando está representado por filamentos con ramas dispuestas en todas direcciones (hifas), se trata del **micelio filamentoso (hongos miceliales)**.
- **Micelio de fructificación**, que es responsable de la reproducción; esto es, la formación de nuevos individuos que poseen y mantienen todas las características de la especie. (Foto 3).

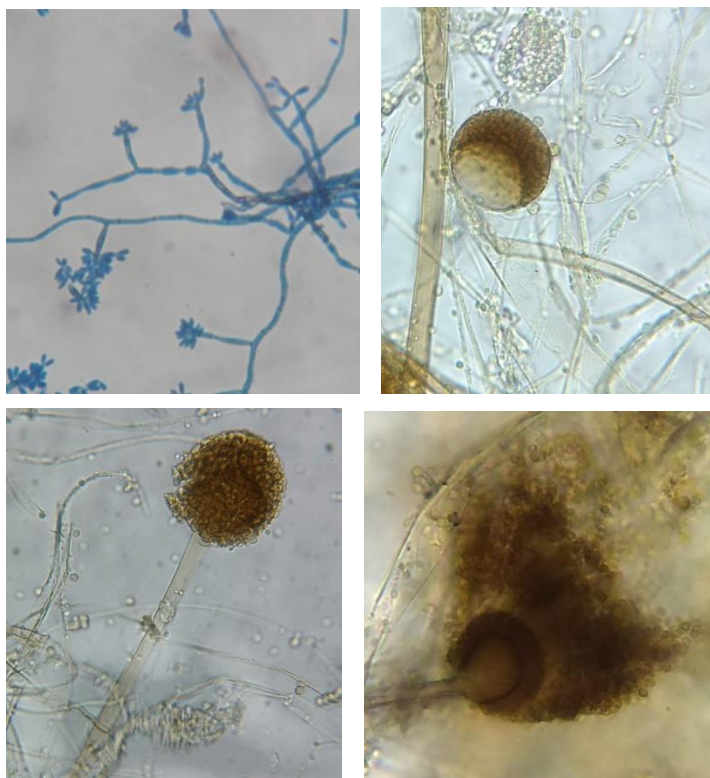


Foto 3: *Micelio de fructificación*

Reproducción

Los hongos durante la fase vegetativa de nutrición y crecimiento, son haploides (n), esto es así en la mayor parte de su ciclo de vida. Se reproducen sexualmente a través de esporas, células reproductoras no móviles que mantienen las características de la herencia/especie. Las esporas pueden ser de origen sexual o asexual, siendo éstas últimas, las de mayor importancia en la diseminación y multiplicación de las especies. La reproducción asexual se repite varias veces al año en la naturaleza y en el laboratorio ocurre cada vez que se realiza un nuevo repique en los medios de cultivo adecuados.

Las esporas (conidios) de origen asexual pueden ser internas y desarrollarse dentro de estructuras llamadas esporangios (esporangiosporas), o pueden ser externas y desarrollarse sobre las hifas o en el ápice de los conidióforos (hifas modificadas para la función reproductiva) llamadas conidios (del griego “*konis*”: polvo).

La reproducción sexual, consta de los siguientes procesos:

Plasmogamia: fusión de membranas plasmáticas.

Cariogamia: fusión de núcleos haploides y formación del cigoto diploide.

Meiosis: producción de gametas, se restablece la condición haploide.

Las esporas de origen sexual reciben distintos nombres según la estructura de la que devienen (el ascocisto genera ascosporas; las basides generan basidiosporas y el cigote genera cigosporas) y se originan en ascomas o estructuras de fructificación de morfología diversa. (Figura 6).

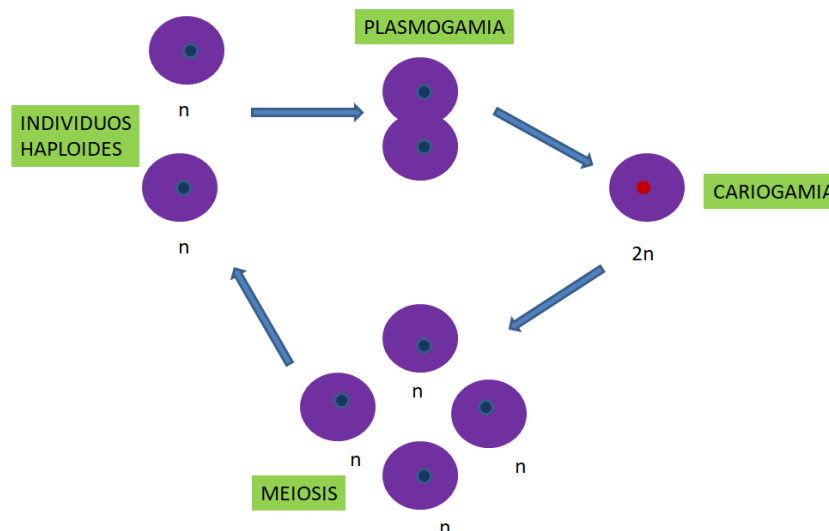


Figura 6: Etapas de la reproducción sexual.

Glosario

Asco/asca: estructura como un saco que contiene (habitualmente ocho) ascosporas desarrolladas durante la reproducción sexual.

Ascoma: estructuras que contienen esporas sexuales

Ascomycota: gran división de hongos superiores que se distinguen por hifas tabicadas y por esporos sexuales formados en ascos o sacos de esporos.

Ascospora: esporas resultantes de la reproducción sexual que se producen dentro de una estructura en forma de saco llamada asco. Los ascos pueden estar contenidos dentro de cuerpos fructíferos (ascoma) que se diferencian en cinco tipos de acuerdo a su forma y tipo de pared.

Basidiomycota: gran división de hongos que se distinguen por hifas tabicadas, a menudo grandes, con estructuras de fructificación y esporos que nacen en un característico basidio de forma de clava (hongos de sombrero).

Basidiospora: esporas resultantes de la reproducción sexual que se producen externamente sobre una estructura denominada basidio, que se forma a partir de un micelio dicariótico con fíbulas. Los basidios por su parte también pueden estar contenidos dentro de cuerpos fructíferos denominados basidiocarpos.

Blastospora (blastoconidios): célula fúngica que se forma como consecuencia de un proceso de gemación, por ej. células de levadura.

Cigosporas/Zygospora: esporas resultantes de la reproducción sexual que se producen dentro de un cigosporangio, que permanece unido a las dos hifas que se fusionaron para darle origen (gametangios).

Conidia/Conidio: espora formada como consecuencia de un proceso de reproducción asexual. Son generados en forma exógena, aisladamente o en grupos, ya sea directamente sobre células independientes (levaduras), sobre el ápice y/o los lados de las hifas o sobre estructuras especializadas denominados conidióforos (miceliales),

Los conidios se separan del punto de unión por pinzamiento o compresión. Pueden clasificarse por forma, tamaño, anatomía, etc.

Conidióforo: hifa aérea especializada que sostiene y da origen a las conidias. Algunos conidióforos se dilatan en su extremo, y sobre esta superficie se forman numerosos pedúnculos en forma de frasco, de donde salen los conidios en cadenas (catenoide). La porción dilatada del conidióforo se denomina vesícula, las estructuras en forma de frasco son los esterigmas o fiálides. Los conidióforos pueden estar libres sobre el micelio, ya sea aislados o en grupos, o encontrarse agrupados o encerrados en estructuras especiales, que de acuerdo a su forma reciben el nombre de picnidios (piriformes) o acérvulos (almohadillas), esporodoquios (agrupaciones de conidióforos).

Espora: célula formada como consecuencia de un proceso de reproducción sexual.

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

Gemación/brotación: proceso reproductivo asexual característico de hongos unicelulares o esporos que involucra la formación de crecimientos externos laterales desde la célula madre para formar nuevas células.

Hifas: filamentos que forman el tallo o cuerpo de un hongo.

Mesófilo: que desarrolla a temperatura corporal o temperatura ambiente.

Micelio: conjunto de hifas o filamentos de un hongo.

Micototoxicosis: proceso no infeccioso debido a la ingesta de toxinas producidas por ciertos hongos.

Moho: se refiere a los hongos de micelio filamentosos.

No tabicado: que carece de tabiques.

Organela/orgánulo/organelo: estructuras contenidas en el citoplasma de las células, principalmente las eucariotas, que tienen una forma determinada.

Psicrófilos: microorganismos que tienen afinidad por temperaturas frías.

Saprófito: cualquier microorganismo vegetal que obtiene su nutrición de materia orgánica muerta.

Seudohifas: hifa no verdadera; habitualmente se refiere a blastoconidias elongadas. Formado por determinadas levaduras, que se diferencia de una hifa, por la presencia de estrangulamientos, en lugar de verdaderos septos.

Tabicado: dividido por paredes transversales.

Talo: cuerpo del hongo.

Termófilo: microorganismos que desarrollan en temperaturas altas.

Vegetativo: referido a hifas que se extienden hacia el sustrato que constituyen la porción que absorbe alimentos de un hongo.

Referencias

- Arenas R. (2014). *Micología médica ilustrada*. Quinta edición. McGraw Hill Education.
- Castillo-Urueta, P; Durán-de-Bazúa C. (2006) *Las micotoxinas: metabolitos secundarios de los hongos filamentosos*. Educación química. 17(2):122-128.
- Cortés-Sánchez, AJ; Mosqueda-Olivares T. *Una mirada a los organismos fúngicos: Fábricas versátiles de diversos metabolitos secundarios de interés biotecnológico*. (2013) Química Viva, 12(2):64-90 Universidad de Buenos Aires Buenos Aires, Argentina.
- Curtis H; Barnes SN, Schnek A; Flores G. (2006) *Biología*. Sexta edición. Ed Médica Panamericana.
- Guía de T.P. Cátedra de Micología Médica e Industrial “Prof. Dr. Pablo Negroni”. Año 2019. Carrera de Microbiología. F.C.V., UNLP.
- Hogg S (2005). *Essential Microbiology*. University of Glamorgan, UK. John Wiley & Sons Ltd. The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, England.
- Kurtzman CP, Fell JW. (2011). *The yeast, a taxonomic study*. 5th ed. Amsterdam: Elsevier.
- Mueller GM, Bills GF, Foster MS. (2004) *Biodiversity of fungi: Inventory and Monitoring Methods*. Elsevier Academic Press, Burlington, MA.
- Pontón J. (2008) *La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina*. Revista Iberoamericana de Micología. Vol: 25, pp 78-82.

Webgrafía

- Etimología de Micología. Accedido de: <http://etimologias.dechile.net/?micologi.a>
- Figuras: <http://atlasdemicologia.blogspot.com/2008/11/estructura-subcelular-los-hongos-al-ser.html>.

CAPÍTULO 2

Técnicas, bioseguridad, toma de muestras

Diana E. Rosa, Verónica A. Amor, Marco A. Tizzano

El laboratorio no debe ser el refugio de los huérfanos de diagnóstico.

Thomas Wheeler

Las técnicas utilizadas en el Laboratorio de Micología están destinadas a mostrar el desarrollo de los hongos y las características de la macromorfología y la micromorfología.

Es necesario contar con algunos materiales como: ansas en anillo, en gancho, espátulas, agujas de disección, portaobjetos, cubreobjetos, líquidos de montar, escala micrométrica graduada, etc.

En general los preparados se hacen en fresco entre porta y cubreobjetos adicionando una gota de líquido de montar como: Gueguén, Patterson, Lactofenol o inclusive una gota de solución salina estéril.

Los medios de cultivo utilizados comúnmente para el aislamiento y crecimiento de hongos son: agar Sabouraud, Czapeck-Dox y agar papa glucosa.

Las temperaturas de incubación son de 28 °C y 37 °C según se trate de muestras o cepas vinculadas a micosis superficiales o profundas. Los hongos oportunistas y patógenos primitivos productores de micosis profundas crecen en ambas temperaturas.

En cambio, los hongos ambientales y los que solo producen micosis superficiales, deben ser incubados a temperaturas de 25-28 °C.

Los hongos, a diferencia de las bacterias comunes tienen crecimiento lento, por eso los tiempos de incubación van desde 7 a 60 días.

Materiales de uso en la rutina

- **Ansa en anillo:** para trabajar con hongos levaduriformes.
- **Ansa en gancho:** para trabajar con hongos miceliales o “mohos”.
- **Espátulas:** para cortar el medio de cultivo, o para sembrar por estría en profundidad.
- **Agujas de disección:** para disgregar o separar el material depositado sobre el portaobjetos.

Escala micrométrica graduada: para medir células y otras estructuras fúngicas.



Figura 1 a- Ansa en anillo



b- Agujas de disección



c- Espátulas

Líquidos de montar

Los líquidos de montar se utilizan para dar contraste a las estructuras fúngicas, o bien para clarificar el material al realizar observación microscópica en directo.

- **Azul de lactofenol:** compuesto por ácido láctico 20 mL, cristales de fenol 20 g, azul de anilina 0,05 g, glicerol 40 mL, agua destilada 20 mL. Se usa para ablandar y decolorar materiales queratínicos y/o esclerosados.
- **Gueguén:** está compuesto por Azul de algodón 200 mg, Sudan III 200 mg, solución yodo alcohólica 3 mL, y ácido láctico 300 mg. El micelio y las estructuras de fructificación se observan con un tinte azul claro o celeste, las vacuolas de lípidos en color rosa, y los elementos de reserva hidrocarbonados en color caoba-marrón claro.
- **Hidróxido de potasio al 20-40% (OKH),** se usa para ablandar y decolorar escamas de piel, escamas de uña, pelo, material purulento. Se deposita la muestra sobre el portaobjetos, se agrega una gota del OKH y se recomienda entibiar a la llama del mechero para facilitar el ablande del material queratínico.
- **Líquido de Amman** (Lactofenol Azul de Algodón). Se utiliza para observar preparados en fresco a partir de cultivos.
- **Patterson:** está compuesto por acetato de potasio, alcohol metílico, glicerina y agua destilada. Se observan los hongos por refringencia o contraste ya que el reactivo es incoloro.
- **PHOL:** es una solución de formol (4 %), glicerol y azul de metileno (3 %).
- **Tinta china:** se utiliza la tinta Parker para observar la cápsula de *Cryptococcus* sp.

Tinciones

Las tinciones se utilizan en materiales obtenidos a partir de biopsias y en general las realizan en el laboratorio de histopatología.

Las tinciones comúnmente utilizadas en micología son:

- **Giemsa:** de elección para la visualización de las levaduras de *Histoplasma* sp., intracelular.
- **Gram:** todos los hongos son Gram +.

- **Grocott:** se usa para la visualización de estructuras fúngicas en los tejidos, en secreciones bronquiales, principalmente en pacientes con infecciones respiratorias y neumonías. Ej: infección por *Pneumocystis* spp. Los hongos se tiñen de color negro, las partes internas del micelio rosa oro; el fondo aparece de color verde claro.

Medios de cultivo

La recuperación de los hongos en los cultivos es un paso necesario en el algoritmo de diagnóstico micológico de laboratorio.

Los medios de cultivo pueden adquirirse en el comercio de calidad reconocida y confiable, o bien pueden ser elaborados artesanalmente en los laboratorios. Independiente del origen, se debe asegurar la provisión de:

- Minerales.
- Azúcares simples (hidratos de carbono).
- Compuestos nitrogenados orgánicos o inorgánicos.

Medios de cultivo para aislamiento primario

En estos medios de cultivo se realiza el primer aislamiento a partir de la muestra.

Si la muestra es recuperada a partir de sitios no estériles (piel lesionada, abscesos abiertos, trayectos fistulosos) se recomienda el agregado de antibióticos para frenar el desarrollo de biota bacteriana agregada.

Agar miel de Sabouraud	Peptona	20 g
	Miel de abejas	80 g
Para cultivo y aislamiento de mohos y levaduras	Agar	20 g
	Agua csp.	1000 mL

Agar Sabouraud glucosa	Peptona	10 g
	Glucosa	40 g
Mohos y levaduras	Agar	20 g
	Agua csp.	1000 mL

Agar YM (yeast mold)	Peptona	5 g
	Extracto de levadura	3 g
	Extracto de malta	3 g
Mohos y levaduras	Glucosa	10 g
	Agar	20 g
	Agua csp.	1000 mL

Medio de Staib	Semillas de <i>Guizotia abyssinica</i>	50 g
Identificación presuntiva de <i>Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii</i> .	Glucosa	1 g
	Creatinina	1 g
	PO ₄ H ₂ K	1 g
	Agar	15 g
	Agua destilada	1000 mL

Medios de cultivo para estudios sistemáticos

La composición de estos medios de cultivo permite el desarrollo de determinados grupos de hongos, por tanto, se los utiliza para realizar estudios de micromorfología y macromorfología, principalmente para especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*.

Czapeck-Dox	NO ₃ Na	3 g
Para estudios sistemáticos de <i>Aspergillus</i> y <i>Penicillium</i>	PO ₄ HK ₂	1 g
	ClK	0,5 g
	SO ₄ Mg.7 H ₂ O	0,5 g
	SO ₄ Fe.7 H ₂ O	0,01 g
	Sacarosa	30 g
	Agar	15 g
	Agua destilada csp.	1000 mL

Agar papa glucosa	Solución I:	
Para cultivo de dermatofitos	Papa rallada	100 g
	Agua corriente	250 mL
	Solución II:	
	PO ₄ H ₂ K	0.27 g
	PO ₄ HNa ₂	1.66 g
	Glucosa	5 g
	Agar	10 g
	Agua destilada	250 mL

Algunos de estos medios son selectivos para la mayoría de los hongos patógenos cuando se les agrega antibacterianos como estreptomina, cloranfenicol, penicilina, etc.

Medios de cultivo para favorecer la esporulación

Medio de Borelli	Harina	14 g
Favorecen la esporulación y producción de pigmento.	Leche en polvo	14 g
	Miel	7 g
	Agar.	14 g
	Agua destilada	1000 mL

Medio de granos de arroz	Arroz blanco sin cáscara	8 g
Favorecen la esporulación de dermatofitos	Agua destilada	25 mL

Aislamiento unicelular

Consiste en obtener un cultivo del hongo en estudio a partir de una sola célula o conidio, garantizando así, la pureza de la cepa.

Se realiza una suspensión de las células fúngicas en agua estéril, suficientemente diluida como para encontrar un solo elemento por campo microscópico.

Se toma una alícuota de 0,1 mL (100 µL) de la suspensión y se esparce con espátula de Drigalsky sobre una placa de Petri que contiene una delgada capa de medio de cultivo apropiado para el desarrollo del hongo en estudio.

Se observa a través del fondo de la caja, con objetivos de poco aumento, hasta enfocar una célula; se reemplaza la lente del microscopio por un objetivo marcador (Punta de diamante) marcando el vidrio en la zona elegida. Luego se toma el trocito de agar que contiene el hongo y se siembra en un tubo o placa de Petri con medio de cultivo.

Si los elementos fúngicos son muy pequeños, se incuba el material unas horas hasta que germine y adquiera un tamaño mayor, luego se continúa en las condiciones indicadas.

Medición de estructuras fúngicas

Se usan dos tipos de escalas.

- **Escala tipo**, que consiste en un portaobjetos gravado: 1 mm lineal dividido en 100 partes iguales, así cada división posee 10 micras de longitud.
- **Escala arbitraria grabada** en un pequeño disco de vidrio que se coloca en el diafragma del ocular.

Se coloca en la platina el micrómetro objetivo (escala tipo) y se hacen coincidir las líneas de ambas escalas, para determinar el valor en micras de cada división del micrómetro ocular.

Debe establecerse para cada aumento del ocular el valor correspondiente (10X, 12.5X, 15X). Para medir la estructura en estudio se reemplaza el micrómetro objetivo (platina) por el preparado en cuestión y se observa a cuántas divisiones del ocular equivale.

Se multiplica el número de líneas por el valor en micras de cada una, y se obtienen las medidas o tamaños de los materiales en estudio.

Existen otras escalas para medición de objetos, por ejemplo, algunas escalas cuadrículas, donde es posible determinar con mayor facilidad y en el mismo tiempo el largo y ancho de los elementos.

Conteo total de microorganismos en cámara de Newbauer

El recuento en cámara de Newbauer nos permite expresar el número de células en organismos unicelulares o conidios que existen en 1 mL de muestra (suspensión).

Área de la cámara: 9 mm²

Profundidad de la cámara: 0,1 mm

Carga y montaje de la cámara

1. Montar la laminilla de vidrio en la cámara para recuento presionándola cuidadosamente para colocarla en su sitio. Cuando la laminilla se ha montado adecuadamente entre las dos superficies de vidrio se observan unas bandas de color llamadas “anillos de Newton”.
2. Homogeneizar la suspensión de células. Con pipeta Pasteur tomar 15 µL de la suspensión de células y llenar la cámara para recuento por capilaridad. No llenar más allá del área cuadrículada.

IMPORTANTE: si el líquido se derrama en el canal que se encuentra entre las dos cámaras, la operación se deberá repetir: quitar y limpiar la laminilla de vidrio; limpiar la cámara para recuento y llenarla con otra gota.

3. Dejar reposar la cámara para recuento sobre la mesa de trabajo durante 3 minutos para que las células o conidios se asienten.
4. Colocar la cámara en la platina del microscopio. Utilizar el objetivo de 10X (con oculares 6X y 10X). Reducir la cantidad de luz que entra en el condensador ajustando el diafragma iris. Enfocar la cuadrícula de la cámara y las células o conidios que vaya a contar.

Explicación del cálculo

Cada uno de los 4 cuadros en los que se cuentan las células tiene un área de 1 mm²; por tanto, toda el área contada mide 4 mm.

La profundidad de la cámara es de 0,1 mm; en consecuencia, el volumen en el que se cuentan las células es de $4 \times 0,1 = 0.4 \text{ mm}^3$. De este modo la división entre 4 y la multiplicación por 10 dará el número de células que haya en 1 mm³ de la suspensión.

Si se realizó una dilución previa al conteo, se deberá tener en cuenta al realizar los cálculos. Ejemplo: si la dilución fue de 1:20 se deberá multiplicar por 20 para dar el número de células en 1 mm³.

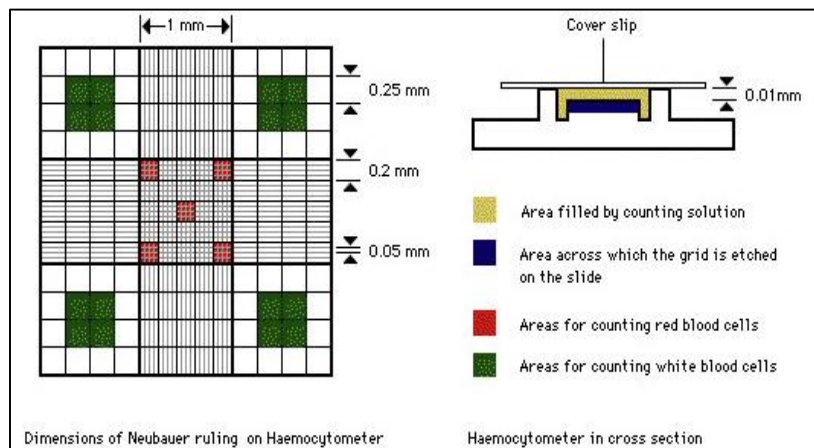
Multiplicar por 10³ para expresar la cantidad de células en 1 cm³ = 1 mL.

$$\text{Células/mL} = \frac{\text{total de células} \times 10 \times 20 \text{ (dilución)}}{4} \times 10^3$$

Ejemplo:

En los 4 cuadros se cuentan 188 células, así el número de células/mm³ de suspensión es:

$$\frac{188 \times 10 \times 20 \text{ (dilución)} \times 10^3}{4} = 188 \times 50 \times 10^3 = 9,4 \times 10^6 \text{ cél/mL}$$



Esquema de cámara de Newbauer

Microcultivos

Se realizan para observar la disposición del micelio de fructificación en un soporte sólido, o para estudiar el avance de la conidiación y formación de estructuras que permitan la identificación del hongo en estudio.

Se utilizan algunos materiales y métodos simples, como:

<p>1-Gota pendiente</p> <p>Portaobjetos excavado de Koch</p>	<p>2-Celda de Boettcher</p>
<p>3-Celda de Ranvier</p>	<p>4-Cultivo en lámina</p>

Procedimiento

- 1- **Gota pendiente:** se debe realizar una suspensión en solución salina estéril o agua destilada estéril a partir de una porción del cultivo del hongo en estudio. Se coloca una gota de la suspensión en el cubreobjetos y se deposita sobre el portaobjetos excavado de Koch. Se observa en microscopio.
- 2- **Celda de Boettcher:** se utiliza un pequeño trozo de medio de cultivo sólido en la celda de Boettcher, luego se inocula la cepa del hongo en estudio y finalmente se coloca el cubreobjetos y se incuba a 28 °C dentro de un recipiente con glicerina estéril al 20 % en agua, para mantener la humedad. Se observa en microscopio.
- 3- **Celda de Ranvier:** el portaobjetos cuenta con un hoyuelo en el que se colocar medio de cultivo, luego se inocula la cepa del hongo en estudio, se coloca el cubreobjetos y se incuba a 28 °C dentro de un recipiente con glicerina estéril al 20 % en agua, para mantener la humedad. Se observa en microscopio cada 24 h hasta visualizar el desarrollo del micelio.
- 4- **Cultivo en lámina:** se utiliza medio de cultivo sólido contenido en Placa de Petri. Puede utilizarse una caja de Petri con una pequeña varilla de vidrio en “U” como soporte y un papel secante humedecido. Se cortan pequeños cuadrados que se depositan sobre el portaobjetos estéril, se inocula la cepa del hongo en estudio, se cubre con el cubreobjetos y se incuba a 28 °C dentro de un recipiente con glicerina estéril al 20 % en agua, para mantener la humedad. Se observa en microscopio cada 24 h hasta visualizar el desarrollo del micelio.

Bioseguridad en el laboratorio de Microbiología

En un laboratorio de microbiología el procesamiento de muestras clínicas implica un riesgo sanitario tanto para el personal que las manipula, como para la comunidad.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) proponen aceptar y aplicar conceptos básicos en materia de seguridad biológica y elaboran los protocolos para la manipulación sin riesgo de microorganismos patógenos en los laboratorios.

Las últimas versiones de los manuales de Bioseguridad incluyen nuevos capítulos, que se ocupan de la evaluación de riesgos, el uso de las tecnologías del ADN recombinante en condiciones de seguridad y el transporte de material infeccioso.

En Bioseguridad existen tres conceptos básicos, diferentes pero interrelacionados:

Bioseguridad. Se refiere al conjunto de medidas, normas y procedimientos destinados a controlar y minimizar el riesgo biológico (Manual de Bioseguridad-CA.DI.ME, 1997).

Bioprotección. Consiste en la protección del material microbiológico contra el robo, la pérdida o la desviación con el fin de evitar que esos agentes se utilicen de forma indebida para atentar contra la salud pública (Manual de Bioseguridad en el laboratorio OMS, Tercera edición, 2005).

Contención. Son los procedimientos seguros para manejar materiales infecciosos en el laboratorio, donde son manipulados o conservados. El objetivo de la contención es reducir o eliminar la exposición de quienes trabajan en laboratorios u otras personas, y del medio ambiente externo a agentes potencialmente peligrosos (Bioseguridad en Laboratorios de Microbiología y Biomedicina-CDC, 4º Edición).

La contención incluye:

- **Prácticas y técnicas de laboratorio.** Las prácticas y técnicas microbiológicas estándar deben cumplirse estrictamente.
- **Equipos de seguridad** (Barrera de contención primaria).
- **Diseño de la instalación** (Barrera de contención secundaria).
- **Nivel de Bioseguridad (NBS):** representa las condiciones bajo las cuales el agente puede manipularse en forma segura.

Los niveles están designados en orden ascendente, de acuerdo al grado de protección brindado al personal, el medio ambiente y la comunidad.

Tanto el CDC como la OMS clasifican los microorganismos en NBS 1, 2, 3 y 4.

Dentro del NBS 2 están contenidos los laboratorios educativos, de diagnóstico o clínicos donde se trabaja con un amplio espectro de agentes de riesgo moderado, se encuentran presentes en la comunidad, y están asociados con enfermedad humana/animal de variada gravedad. Mientras que en el NBS 3 se trabaja con agentes exóticos con potencial de transmisión respiratoria, y que pueden provocar una infección grave y potencialmente letal.

Requisitos por Nivel de Bioseguridad

	NBS 2	NBS 3
Aislamiento del laboratorio	No	Si
Sala que puede ser precintada	No	Si
Entrada de doble puerta	No	Si
Sistema de ventilación con filtros HEPA	No	Si
Antesala	No	Si
Tratamiento de efluentes	No	Si

Autoclave:

-en laboratorio	Conveniente	Si
-en sala de trabajo	No	Si
-de doble puerta	No	Si
Cabina de seguridad biológica	Conveniente	Si
Uso de guardapolvo/protección personal	Si	Si
Uso de camisolín	Conveniente	Si

NBS: nivel de bioseguridad.

Limpieza de superficies

Para la limpieza y desinfección de superficies (mesadas, equipos, ambientes) existen distintos recursos:

- **Desinfectante:** es un agente físico o químico que mata o inactiva microorganismos, en los de uso diario encontramos: **Alcohol 70°:** para limpieza de la mesada de trabajo.
 - **Hipoclorito:** para descartar todo material que estuvo en contacto con suero y/o sangre.
 - **Fenol 2 % - Alcohol 70°:** para desinfectar la mesada cuando hubo derrame (hongos).
 - **Formol** (pastillas o solución): para descontaminar ambientes en el caso de accidentes, descontaminar los equipos de bioseguridad previo a la certificación y/o reparación.

Precauciones de bioseguridad

La manipulación inapropiada de materiales o muestras clínicas puede convertirse en una fuente de riesgo biológico no solo para las personas que están en contacto o están encargadas de procesarlas, sino también para el medio ambiente.

Siempre se deben utilizar los elementos de protección personal necesarios para evitar exposición con riesgo biológico, de acuerdo con la fuente de la muestra.

Se deben tener en cuenta las siguientes recomendaciones:

- Disponer de contenedores para especímenes, a prueba de fugas y de fácil sellamiento.
- Cumplir con las recomendaciones de manejo de elementos corto punzantes:
 - No re-enfundar agujas.
 - Disponer y utilizar adecuadamente el contenedor para corto punzantes.
 - No transportar jeringas con agujas. Se recomienda transferir el aspirado a un tubo estéril.

- En caso de accidente con riesgo biológico, avisar inmediatamente según el protocolo de accidente de trabajo con riesgo biológico institucional.

Criterios de bioseguridad para envío de muestras con riesgo biológico

Uno de los aspectos más importantes es que el transporte de la muestra implica una potencial fuente de contaminación y riesgo para todas las personas durante el proceso.

Transporte de muestras con riesgo biológico:

- El recipiente que contiene la muestra o cultivo (recipiente primario) debe estar bien cerrado y rotulado.
- El envase primario debe estar dentro del contenedor secundario.
- El contenedor secundario se debe colocar en una caja de transporte (recipiente terciario). Este contenedor debe ser identificado “infeccioso” e indicar el destinatario y el remitente.
- En caso de enviar varios contenedores secundarios puede empacarlos en un mismo recipiente terciario, que puede ser un termo, hielera, caja u otro que lo proteja del calor excesivo.
- Verificar y controlar la temperatura a que debe enviar las muestras para guardar la cadena de frío cuando lo amerite, utilizando refrigerantes. Es importante asegurar la integridad de la muestra. Para lograr un transporte seguro de las muestras es necesario establecer una relación entre los involucrados en el manejo y transporte seguro de materiales peligrosos.

Toma de muestra

La calidad de la muestra es un punto crucial en el éxito del diagnóstico micológico.

A continuación, se enumeran algunas recomendaciones a tener en cuenta:

- Tomar las muestras asépticamente, utilizando contenedores estériles, remitirlas al laboratorio antes de las 2 horas y sembrarlas lo antes posible.
- La muestra debe recogerse antes de iniciar el tratamiento y siempre de la parte activa de la lesión cuando se sospechan dermatofitias.
- Los hisopos deben ser evitados siempre que la lesión lo permita. Pero hay muestras (conducto auditivo, boca, faringe, vagina ó cérvix) que no pueden ser recogidas de otra manera.
- En el caso de heridas, drenajes o lesiones superficiales, debe limpiarse la zona previamente con solución salina estéril o con etanol 70° para evitar contaminaciones.

- Las muestras de lesiones cerradas y abscesos suelen ser de gran rendimiento. Deben ser aspiradas con jeringa y aguja y transferidas a un tubo o frasco estéril, prestando atención a la presencia de gránulos, si los hubiere en la muestra.
- En situaciones que requieran un estudio epidemiológico, debe establecerse la necesidad de toma de muestra ambiental, familiar o en animales.

Toma de muestra para diagnóstico de micosis superficiales

- Limpieza del área afectada: antes de realizar la toma de muestra, la piel, pelos o uñas deben limpiarse con etanol (70 %) para eliminar la biota bacteriana asociada.
- Recolección

Escamas. Las escamas de las zonas afectadas deben recogerse por raspado del borde activo con una hoja de bisturí estéril, ya que el borde posiblemente contiene elementos fúngicos viables. El contenido de la muestra se puede recoger en una placa de Petri estéril, o bien en una hoja de papel limpia, sin uso. Los dermatofitos pueden permanecer viables durante meses en las muestras de piel.

Intertrigos candidiásicos. Las lesiones no suelen ser descamativas sino exudativas, en cuyo caso el material se toma con hisopo estéril seco o húmedo. Si el espécimen no va a ser procesado inmediatamente, se prefiere el empleo de un hisopo con medio de transporte (Ej. medio de Stuart) ya que las levaduras pierden rápidamente la viabilidad en los hisopos secos.

Pelos. Dependiendo del tipo de lesión observada, los pelos se recogen mediante diversas técnicas.

- En las tiñas microspóricas causadas por *Microsporum canis*, *Nannizzia gypsea*, frecuentes en perros y gatos, las lesiones cutáneas se reconocen por presentar una placa escamosa blanquecina con escasa o nula inflamación, la placa puede alcanzar varios centímetros de diámetro, y se observan pelos rotos a 5-10 mm de la superficie cutánea, estos pelos parasitados se arrancan con facilidad al raspar con el bisturí.
- En las tiñas tricofíticas causadas por *Trichophyton mentagrophytes* común en conejos, *Trichophyton verrucosum* común en ganado vacuno y *Trichophyton equinum* común en equinos, forman placas escamosas con pelos de poca longitud, situados en el espesor de la escama, o bien, rotos a nivel de la superficie dando un aspecto de “puntos negros”, casi siempre en ausencia de inflamación. Estos “puntos negros” son los que deben extraerse con la punta del bisturí o con pinzas estériles.

Toma de muestras de origen respiratorio

Exudado y lavado nasofaríngeo. Mediante hisopo de algodón o catéter, aspirar el moco por vía per o retronasal. Hay que tener presente que la muestra obtenida pertenece al tracto

respiratorio superior, por lo que en caso de ser positiva, tan sólo será indicadora de colonización de las vías aéreas superiores.

Aspirado traqueal. Se introduce una sonda de aspiración a través del tubo endotraqueal o de la traqueotomía y se succionan las secreciones respiratorias. La instilación de una pequeña cantidad de solución salina estéril (\pm 5 mL) puede facilitar la obtención de las muestras muy viscosas.

Lavado bronquial. Mediante fibrobroncoscopía se realiza una aspiración de las secreciones del árbol bronquial, generalmente tras la instilación de 5 mL de solución salina estéril (el volumen a instilar dependerá del tamaño del paciente). La muestra procede del árbol bronquial superior y no es representativa del territorio alveolar ni bronquiolar.

Lavado broncoalveolar. Para la toma de muestra, el fibrobroncoscopio debe enclavarse en el árbol bronquial e instilar \pm 10 mL de solución salina estéril (el volumen a instilar dependerá del tamaño del paciente), y posteriormente será recuperada. El fluido recuperado se considera la muestra más adecuada y sensible para el diagnóstico de las infecciones respiratorias causadas por hongos dimorfos patógenos primarios, y para el diagnóstico de la neumonía por *Pneumocystis*.

Punción pulmonar percutánea o transtorácica. Se usan agujas ultrafinas y control radiológico o ecográfico, se punza la cavidad torácica y se recoge el exudado de las lesiones pulmonares por aspiración. Aunque es una muestra con alta especificidad, tiene baja sensibilidad, y la técnica no está libre de contraindicaciones (neumotórax, hemorragia), por lo que su empleo se limita al estudio de infiltrados pulmonares densos de localización periférica, con gran componente cavitario y / o consolidación, como puede ser el caso de algunas neumonías fúngicas.

Líquido pleural. A través de una punción transparietal mediante aguja de punción pleural, se extraen varios mililitros de líquido pleural.

Transporte y conservación de muestras respiratorias. Las muestras de esputo, lavado bronquial y lavado bronquio alveolar deben enviarse al laboratorio en frascos estériles, con tapa a rosca, cerrados, y en un plazo máximo (preferentemente) de 2 horas desde su recogida o conservarla a 4°C (heladera) especialmente en muestras muy contaminadas. Los productos de aspiración se depositan en un tubo cónico estéril con tapa a rosca. Las secreciones que se obtienen por cepillado se transportan, en tubos cónicos estériles con tapa a rosca, diluidas en 1 mL de solución salina estéril. Las piezas de biopsias se ubican en tubo o frasco estéril con 1 mL de solución salina estéril y se envían al Laboratorio de Micología.

Toma de muestras de líquidos estériles y tejidos

Líquido cefalorraquídeo (LCR). El LCR es una de las muestras biológicas estériles más valiosas en un laboratorio de Microbiología. Extraer un volumen mínimo de 1-3 mL/tubo

estéril (el volumen dependerá del tamaño del paciente), enviar de inmediato al laboratorio de Micología.

Líquido pleural, peritoneal, pericárdico, sinovial y otros líquidos de punción. Desinfectar la piel con yodo-povidona 2 %, obtener la muestra por aspiración con aguja percutánea o por cirugía. Extraer un volumen mínimo de 5 mL (el volumen dependerá del tamaño del paciente) y depositarlo en un tubo cónico estéril con tapa a rosca (o inocular un frasco de hemocultivo)

Médula ósea. El aspirado de médula ósea, por punción esternal o de cresta ilíaca, es una de las mejores muestras para el diagnóstico de histoplasmosis diseminada. El estadio levaduriforme de este microorganismo es intracelular. Aplicar máximas condiciones de asepsia. Realizar en el momento de la toma de muestra un extendido en un portaobjeto para realizar la tinción de Giemsa.

Tejidos. Las muestras de tejidos se obtienen mediante cirugía, biopsia percutánea o necropsia. Introducir el material de biopsia en un recipiente estéril con tapa a rosca, que contenga solución salina estéril y enviar al laboratorio de inmediato.

Transporte de líquidos de punción de cavidades estériles y tejidos

Si la muestra fue inoculada a un frasco de hemocultivo deberá enviarse de inmediato al laboratorio para su pronta incubación a 37 °C. Si la muestra se recolectó en un frasco estéril, de no procesarse en el día puede ser almacenada en la heladera 4 °C durante 24- 48 h con unas gotas de solución salina estéril.

Toma de muestras genitourinarias

Exudado vaginal. Debe indicarse que no debe realizar tratamiento local o general previo. Abstinencia sexual (24 horas previas). En general debe realizarse la toma de muestra ayudándose con un espéculo, sin utilizar lubricantes. Se toma la secreción mucosa de la pared posterior del canal vaginal, mediante un hisopo humedecido con solución salina estéril haciendo rotar el hisopo por la zona de mayor secreción. Para el examen directo puede tomarse material con espátula.

Exudado vulvar/anal. Es conveniente lavar la superficie cutánea con solución salina estéril, antes de arrastrar el exudado con un hisopo. La obtención del exudado anal se realiza de la misma forma que el vulvar.

Surco balanoprepucial. Se realiza hisopado de los bordes de las lesiones y del surco balanoprepucial sin higiene previa

Descarte del material contaminado

Para el descarte de material, cada recipiente debe estar correctamente identificado. Debemos contar con:

- Recipientes herméticos de pared rígida para el descarte de material corto-punzante.
- Recipiente de residuos biológicos para reciclar: tubos, portaobjetos, placas.
- Recipiente de residuos biológicos descartables: guantes, algodón, gasa, material descartable.

Referencias

CDC-NIH. *Bioseguridad en Laboratorios de Microbiología y Biomedicina*. 2015.

Guía de T.P. Cátedra de Micología Médica e Industrial “*Prof. Dr. Pablo Negroni*”. Año 2019.
Carrera de Microbiología. F.C.V., UNLP.

Organización Mundial de la Salud. *Manual de bioseguridad en el laboratorio* Tercera edición.
2005. <https://www.who.int/>

CAPÍTULO 3

Hongos miceliales y micosis oportunistas

Francisco José Reynaldi

Un hongo no florece ni se mueve, pero hay algo imponente y monstruoso en él, parece un pulmón que vive desnudo, sin cuerpo.

Knut Hamsun. (1917). LA BENDICIÓN DE LA TIERRA

Históricamente las especies del género *Aspergillus* eran reconocidas por su participación como agentes de distintas patologías, tanto en las personas como en los animales.

En las últimas décadas, a nivel global se observa un aumento en la frecuencia de aparición de infecciones causadas por hongos miceliales distintos de *Aspergillus*. Así emergieron otras especies, entre las que se destacan los hongos hialinos (hialohifomicetes), los hongos con pigmentos oscuros (feohifomicetes) y los agentes de la mucormicosis. Estos hongos tienen amplia distribución en la naturaleza, son cosmopolitas y tienen la capacidad de producir infecciones de pronóstico reservado en paciente con inmunodepresión leve o severa.

En general, estas infecciones comparten un patrón de signos clínicos y síntomas inespecíficos dificultando así el diagnóstico etiológico, y por tanto se complica la elección del tratamiento más adecuado. La mortalidad alcanza porcentajes elevados (30-100 %).

En este Capítulo se abordará el estudio de la aspergilosis, la fusariosis y la mucormicosis por ser las patologías más frecuentes causadas hongos miceliales oportunistas.

Aspergilosis

Se define como aspergilosis al grupo de enfermedades causadas por miembros del género *Aspergillus* capaces de afectar a personas y animales. No son enfermedades zoonóticas, y no ha sido demostrada la transmisión entre animales.

Distribución

Los hongos del género *Aspergillus* son saprófitos, se encuentran ampliamente diseminados en el medio ambiente y son de distribución universal.

Estos hongos desarrollan produciendo colonias de color azul, verde, negro, canela, blanco, etc., sobre granos almacenados, heno, vegetales en descomposición, alimentos, suelo, estiércol, hojarasca, etc.

Se conocen alrededor de 600 especies, aunque solo 8 o 10 están vinculados a procesos patológicos en personas y animales. La nomenclatura de las especies cambia en forma dinámica gracias al avance tecnológico que permitió un mejor conocimiento de los microorganismos. En la tabla 1 se muestra la clasificación taxonómica actual basada en estudios del ADN de las principales especies del género *Aspergillus* de importancia clínica.

Tabla 1. Especies de *Aspergillus* de importancia médica

Subgénero	Sección	Teleomorfo	Especies más relevantes
Aspergillus	<i>Aspergillus</i>	<i>Eurotium</i>	<i>Eur. amstelodami</i> , <i>Eur. chevalieri</i> , <i>Eur. herbariorum</i>
	<i>Restricti</i>	<i>Eurotium</i>	<i>A. restrictus</i> , <i>A. penicillioides</i>
Fumigati	<i>Fumigati</i>	<i>Neosartorya</i>	<i>A. fumigatus</i> , <i>A. lentulus</i> , <i>A. fumigatiaffinis</i> , <i>Neo. udagawae</i>
	<i>Clavati</i>	<i>Neocarpenteles</i> , <i>Dichotomomyces</i>	<i>A. clavatus</i>
	<i>Cervini</i>	-	<i>A. cervinus</i>
Circumdati	<i>Circumdati</i>	<i>Neopetromyces</i>	<i>A. sclerotium</i> , <i>A. ochraceus</i>
	<i>Nigri</i>	-	<i>A. niger</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>A. foetidus</i> , <i>A. brasiliensis</i>
	<i>Flavi</i>	<i>Pretomyces</i>	<i>A. flavus</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. sojae</i> , <i>A. arachidicola</i>
	<i>Cremeri</i>	<i>Chaetosartorya</i>	<i>A. wentii</i>
Candidi	<i>Candidi</i>	-	<i>A. candidus</i> , <i>A. tritici</i>
Terrei	<i>Terrei</i>	-	<i>A. terreus</i> , <i>A. alabamensis</i> , <i>A. carneus</i> , <i>A. pseudoterreus</i>
	<i>Flavipedes</i>	<i>Fennellia</i>	<i>A. flavipes</i>
Nidulantes	<i>Nidulantes</i>	<i>Emericella</i>	<i>A. sydowii</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>Em. nidulans</i>
	<i>Usti</i>	<i>Emericella</i>	<i>A. ustus</i> , <i>A. calidoustus</i>
	<i>Sparsi</i>	-	<i>A. sparsus</i>
Warcupi	<i>Warcupi</i>	<i>Warcupiella</i>	<i>War. spinulosa</i>
	<i>Zonati</i>	<i>Penicillioopsis</i>	<i>A. zonatus</i>

Patogenia

En general, el ingreso al hospedero es vía aerógena a través de las vías aéreas superiores. Según el estado inmunológico del paciente puede diseminarse a los órganos blanco o quedar limitado al sitio de ingreso.

Manifestaciones clínicas

- **Aspergilosis nasal**, se caracteriza por la presencia de conidios o por el crecimiento transitorio del organismo en las fosas nasales. Los pacientes presentan aumento del reflejo tusígeno, estornudos, secreción sero-sanguinolenta por fosas nasales (uni o bilateral), febrículas intermitentes, etc. Los perros dolicocefalos (collie, setter, border collie, etc.) de cualquier edad son más susceptibles de presentar esta forma clínica. El agente etiológico más frecuente es *A. fumigatus*.
- **Enfermedad diseminada sistémica**, en pacientes con inmunocompromiso severo o enfermedades crónicas y de difícil resolución. Esta micosis cursa con la falla multiorgánica por la invasión fúngica y el desenlace suele ser fatal. El agente etiológico más frecuente es *A. fumigatus*.
- **Otomicosis**, es de presentación subaguda o crónica, afecta el conducto auditivo externo, se manifiesta con prurito, dolor, edema, eritema y lesiones escamo-costrosas. El agente etiológico más frecuente es *A. niger*.
- **Aspergilosis de bolsas guturales**, es poco frecuente y se asocia con fallas de manejo. El hongo se multiplica en la mucosa de la bolsa, en general es unilateral, aunque hay descripción de casos con afectación bilateral. La invasión de la submucosa produce lesiones en las terminaciones nerviosas, con trastornos circulatorios y neurológicos. Existe riesgo de lesión de la pared de la arteria carótida con posible hemorragia y desenlace fatal. Los agentes etiológicos más frecuentes son *A. fumigatus* y *A. flavus*.
- **Aspergilosis de sacos aéreos**, es una micosis que se presenta en aves, ocurre la invasión de las mucosas con formación de seudomembranas, se dificulta el ingreso de aire y la respiración. Es de pronóstico reservado, en la mayoría de las aves tiene desenlace fatal.
- **Micotoxicosis**, no es una manifestación infecciosa, es un proceso tóxico por el consumo de alimentos contaminados con aflatoxinas B1 y G. Estas toxinas producen en el paciente daño hepático agudo y crónico, disminución del crecimiento, alteraciones de los mecanismos inmunológicos y fundamentalmente cáncer primario de hígado y teratogenia.

Diagnóstico de laboratorio

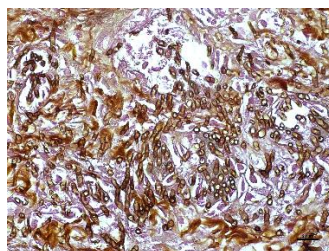
El algoritmo diagnóstico incluye la observación microscópica en fresco, coloraciones, cultivo, identificación de los especímenes, serología.

- **Observación microscópica directa en fresco:** en el material obtenido de las secreciones nasales, bronquiales, biopsias de tejidos, bolsas guturales, tratado con OHK 10-40 % puede observarse la presencia de hifas de 3 a 6 micras de ancho (65-70 % de los casos), con septos y ramificadas en ángulo agudo. (Foto 1a).

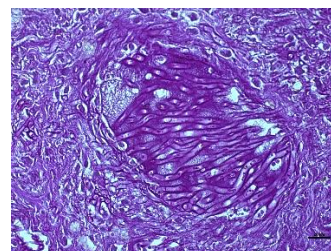
Coloraciones: las tinciones histopatológicas con Gomori-Grocott, PAS son útiles para el diagnóstico, aunque no siempre se pueden tomar biopsias por el estado crítico de los pacientes. (Fotos 1b y c).



Foto 1-a. OHK 20%.
Hifas hialinas tabicadas.



1-b. Grocott- Hifas tabicadas



1-c. PAS Hifas tabicadas

En los tejidos afectados pueden estar presentes los eosinófilos, los polimorfonucleares neutrófilos, en las secreciones pulmonares pueden encontrarse los cristales de Charcot-Leyden y estructuras mucoides cilíndricas llamadas espirales de Curschmann.

Cultivo

Para el primo aislamiento se usan medios de cultivo comunes, p ej. agar Sabouraud, con antibacterianos, sin cicloheximida. Los hongos desarrollan en 3-7 días colonias con diferente aspecto y color, dependiendo de la especie de *Aspergillus* en estudio.

Los medios de cultivo que se utilizan para arribar a la identificación a nivel de especie son el medio Czapek agar extracto de levadura, agar extracto de malta, Czapek agar levadura con 20 % de sacarosa. (Fotos 2 y 3).



Foto 2. Colonia de *Aspergillus* sec. *Fumigati*
en agar Czapek, 28 °C, 7 días.



Foto 3. Colonia de *Aspergillus* sec. *Nigri*
en agar Sabouraud, 28 °C, 7 días.

Micromorfología

Los conidióforos son erectos, pueden ser lisos o rugosos, no septados, únicos no ramificados, apoyan sobre la célula pie, presentan una dilatación apical llamada vesícula sobre la que se forman las fialides. Las fialides pueden estar apoyadas sobre células basales (métulas) y forman un sistema de fialides biseriado.

La estructura formada por la vesícula, las fialides y los conidios se denomina aspergilo o cabeza aspergilar. Los conidios son ameroconidios, de pared lisa, se disponen en cadenas formando columnas (disposición columnar) o bien en forma divergente (disposición radiada). (Figura 1, fotos 4, 5 y 6)

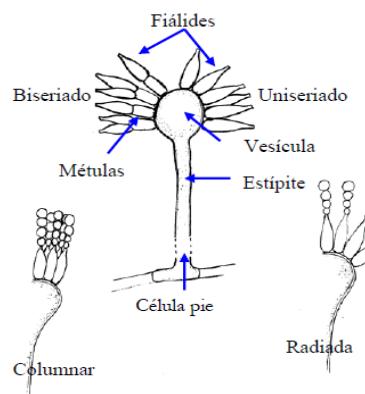


Figura 1. Esquema que muestra la estructura de *Aspergillus* sp.



Foto 4. Microfotografía de cabeza aspergilar uniseriada, radiada.



Foto 5. Cabeza aspergilar radiada, conidios oscuros.

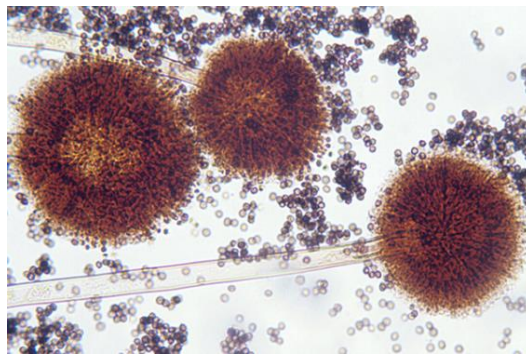


Foto 6. Microfotografía de *Aspergillus* sp., cabeza aspergilar columnar, conidióforo, célula pie.

Los estados teleomorfos pertenecen a la clase Ascomycete, y la reproducción sexual se caracteriza por la formación de ascomas llamados cleistotecios.

Los cleistotecios son globosos, cerrados y tienen una pared pseudoparenquimatosa sobre la que asientan los ascos con los ascosporos en su interior.

Claves para la identificación morfológica de *Aspergillus* spp.

En los últimos años ocurrieron numerosos cambios en la ubicación taxonómica y clasificación de las especies pertenecientes al género *Aspergillus*.

En la tabla 2 se muestran en forma simplificada las claves para acceder a las principales secciones de *Aspergillus*.

Tabla 2. Clave para la identificación de algunas especies de *Aspergillus* sp.

Descripción	Ubicación taxonómica
1-Colonias de color negro, conidióforos estrictamente biseriados, conidios ornamentados.	Sección <i>Nigri</i> (<i>Aspergillus niger</i>)
1'-Colonias de otro color	2
2-Colonias de color amarillo a marrón claro, conidióforos estrictamente biseriados.	Sección <i>Terrei</i> (<i>Aspergillus terrei</i>)
2'-Colonias en tonos de color verde	3
3-Colonias de color amarillo verdoso, vesícula globosa, conidióforos uni y biseriados. Estípote rugoso.	Sección <i>Flavi</i> (<i>Aspergillus flavus</i>)
3'-Colonias de color verde azul oscuro, vesícula no clavada, conidióforos estrictamente uniseriados. Estípote liso.	Sección <i>Fumigati</i> (<i>Aspergillus fumigatus</i>)

Clave adaptada del Manual de Micosis Oportunistas, Departamento Micología INEIA ANLIS "Dr. C. G. Malbrán", 2019.

Mucormicosis

Se define como mucormicosis a la infección fúngica causada por hongos miceliales oportunistas pertenecientes a la clase *Zigomycetes*. El nombre de *Zigomycetes* se refiere a la producción de una espora de origen sexual llamada zigospora (Gr.: *zygos* = yugo + *sporos* = semilla). Estas infecciones se caracterizan por el desenlace fatal en la mayoría de los casos.

A continuación, se describen los principales géneros con capacidad para causar patologías en animales y en personas, y que además pueden deteriorar alimentos.

Características generales de los *Zigomycetes*

La Clase *Zigomycetes* incluye a los subfilum *Mucoromycota* y *Entomophthoromycota*, ambos de importancia clínica por las severas infecciones que sus miembros pueden causar a las personas y a los animales

Dentro del subfilum *Mucoromycota*, el Orden *Mucorales* reúne a los principales géneros causantes de infecciones fúngicas.

Las principales características de los *Mucorales* son:

- Micelio filamentosos continuo o cenocítico (sin septos o tabiques).
- Reproducción sexual con formación de una zigospora.
- Reproducción asexual por medio de esporas no móviles, en forma de esporangiosporas.
- Desarrollo rápido *in vivo-in vitro* (24-48 h).

Distribución

Los mucorales son de distribución universal, están presentes en el ambiente, viven en forma saprófita en el suelo asociados a materia orgánica en descomposición, hojarasca, vegetales, estiércol, maderas, deterioran el alimento, son capaces de generar enfermedad en personas, animales y vegetales. Son potentes deteriorantes de vegetales frescos o almacenados.

Si las condiciones de humedad y temperatura son las adecuadas, los mucorales producen abundante micelio, liberan enzimas líticas, pectinasas que degradan al vegetal hasta convertirlo en una matriz amorfa, lo que lleva a la muerte de la planta. Luego los hongos utilizan el material en descomposición para su propio beneficio.

Algunas especies son utilizadas en industria en la producción de alcoholes, ácidos orgánicos, ácido fumárico, ácido láctico, amilasas, reninas, y otros metabolitos secundarios.

Patogenia

El ingreso de los elementos infectantes al organismo se produce por inhalación, por inoculación traumática, en algunos casos se describe la ruta de ingreso a través de picadura de jejenes, tábanos, avispas. Si el ingreso es vía inhalatoria, una vez superado el filtro nasal el hongo disemina gracias a la afinidad por los vasos sanguíneos y puede llegar a SNC, causando trombos, lesiones isquémicas con necrosis tisular en las zonas de impacto. Cuando las lesiones toman la región cráneo-facial, la evolución es en general aguda, con desenlace fatal.

Si las lesiones hacen foco en piel, la evolución puede ser más crónica, aunque el pronóstico es reservado, más aún cuando hay compromiso de miembros ya que requiere la amputación de la extremidad afectada.

Manifestaciones clínicas

Cutánea

Este tipo de infección primaria es rara. Las lesiones comienzan conformando una placa infiltrativa papular, eritematosa e indolora con tendencia a la necrosis y diseminación progresiva. En general se describe en pacientes sin condiciones predisponentes. Los agentes etiológicos más frecuentes son *Mucor racemosus* y *Rhizopus rhizopodiformis*.

Mucormicosis sistémica

Infección sistémica con o sin foco primario pulmonar. Las infecciones pulmonares son progresivas, no controladas, pueden diseminarse a otros órganos vitales. La mayoría de los pacientes presentan una inmunodeficiencia grave debida a la carencia absoluta de neutrófilos circulantes derivada de la quimioterapia antineoplásica, usualmente antileucémica y han sido tratados con antibióticos de amplio espectro por fiebre persistente. Usualmente no existen otros signos aparte de la fiebre y tal vez disnea.

Puede producirse hemoptisis debido a la necrosis tisular producida por la invasión de estos hongos. Los agentes etiológicos involucrados son *Rhizopus microsporus*, *R. arrhizus* y *Saksenaea vasiformis*, *Mucor hiemalis*, *M. dispersus*, *M. racemosus*, *Syncephalastrum racemosus*, *Cunninghamella elegans* y *Mortierella sp.*

Pronóstico

En general, las micosis causadas por *Mucorales* son de curso muy agresivo y llevan al desenlace fatal. Las complicaciones que se presentan con mayor frecuencia son debidas a la producción de trombos, con trombosis coronaria, aneurisma micótico de grandes vasos, hemorragia subaracnoidea, trombosis del seno cavernoso, trombosis de la vena central de la retina, embolias dérmicas y de médula ósea.

En caninos y en cetáceos se describen otras formas clínicas, como la gastrointestinal, cutánea, entre las más frecuentes.

Medidas de control

La mucormicosis tiene una alta tasa de mortalidad (70-90 %). No existen medidas profilácticas para evitar la aparición de la patología.

Los hongos *Mucorales* están presentes en la naturaleza, permanecen sobre el manto piloso de los animales, algunas especies son parte de la biota intestinal.

Diagnóstico de laboratorio

Las muestras se toman a partir de la periferia de las lesiones, a partir del tejido necrótico y de los vasos sanguíneos.

- Observación microscópica directa en fresco:

Con OHK al 10-40 % en caliente se observan hifas anchas, no septadas e irregularmente ramificadas, de 15-20 µm de ancho y hasta 200 µm de longitud. (Foto 7).



Foto 7. Observación en fresco.
Hifas anchas sin tabiques.

Histopatología

La respuesta inflamatoria es aguda, se observa necrosis, vasculitis, trombosis y zonas de infarto. Se observan los filamentos tortuosos, bifurcados, con un diámetro entre 6 y 25 μm .

En general, infiltran la pared de los vasos y causan vasculitis con formación de trombos en grandes y pequeños vasos e infartos; que pueden ser masivos, pequeños o múltiples. Los infartos hemorrágicos se necrosan formando abscesos.

Tinciones

Las muestras obtenidas de biopsias pueden ser teñidas con H&E, metenamina plata, permitiendo la visualización de las hifas anchas, sin tabiques en los tejidos infectados. (Fotos 8 y 9).

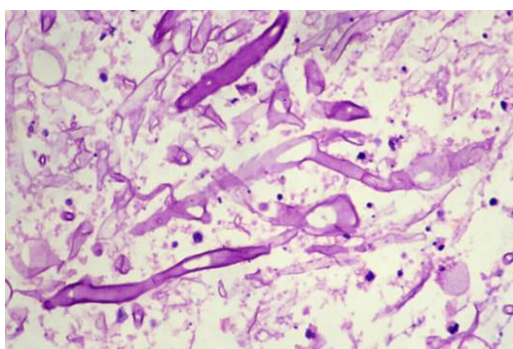


Foto 8. *Lichtheimia corymbifera*. Hematoxilina-Eosina, biopsia pulmonar, hifas anchas, pared delgada, sin septos.

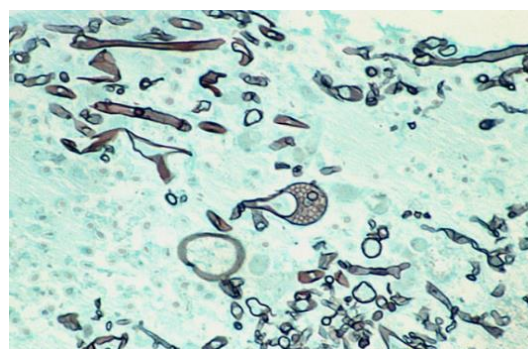


Foto 9. *Lichtheimia corymbifera*. Metenamina plata, biopsia pulmonar, hifas anchas, pared delgada, sin septos, esporangio típico.

- **Cultivo:** los hongos mucorales desarrollan en los medios de cultivo en 18 a 24 h. En general, el desarrollo de las colonias es rápido, invasivo, pueden alcanzar la tapa de las placas de Petri o bien la tapa de los tubos de ensayo. Las colonias tienen aspecto lanoso o algodón-

so, son blancas, grises con el tiempo, con puntos negros diseminados en toda la superficie de la colonia (esporangios). (Foto 10).



Foto 10. Aspecto de las colonias de *Mucorales* en agar Sabouraud, 24 h a 28 °C.

Las secreciones o trocitos de tejido picado se inoculan sobre la superficie de medio agar dextrosa de Sabouraud, con antibacterianos sin cicloheximida y se incuban a 25 °C y 37 °C durante 1 semana.

Observación: las muestras que no son procesadas en el momento deben ser transportadas y mantenidas en líquido de transporte (Stuart, o en solución salina estéril, o en agua destilada estéril) a temperatura ambiente (en muestras refrigeradas estos mohos pierden viabilidad en pocas horas). No debe usarse mortero para disgregar las muestras de tejido, sino cortarlas en pequeños trocitos.

Micromorfología

En general los *Mucorales* se caracterizan por presentar hifas anchas (10-15 μm), cenocíticas (micelio filamentoso continuo), de forma irregular. (Foto 11).

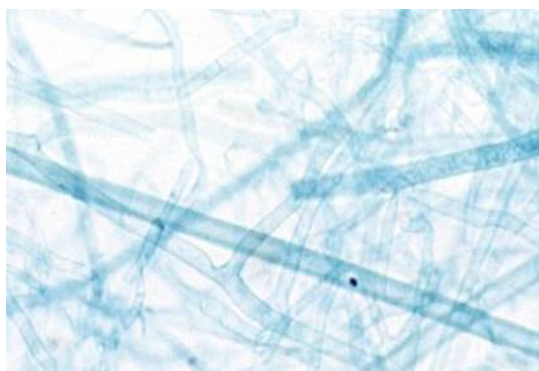


Foto 11. Hifas anchas no tabicadas

La reproducción asexual se caracteriza por la formación de esporas asexuales o esporangiosporas dentro de una estructura cerrada denominada esporangio.

La hifa que genera y sostiene al esporangio se denomina esporangióforo y tiene un ápice puede terminar en una estructura estéril denominada columela. Si el esporangióforo presenta una dilatación inmediatamente debajo de la columela, a esa dilatación se la denomina apófisis. Los esporangios pueden ser de distinta forma y tamaño.

Los esporangios alargados, con forma de dedo de guante y que llevan esporangiosporas en hilera se denominan merosporangios y los esporangios pequeños, que contienen sólo una o pocas esporangiosporas, se denominan esporangiolos.

En algunos géneros, el micelio vegetativo produce estructuras similares a raíces con funciones de nutrición y fijación, son los rizoides. La hifa que conecta dos grupos de rizoides se denomina estolón y el punto donde el estolón toca el sustrato se denomina nodo. (Figura 2).

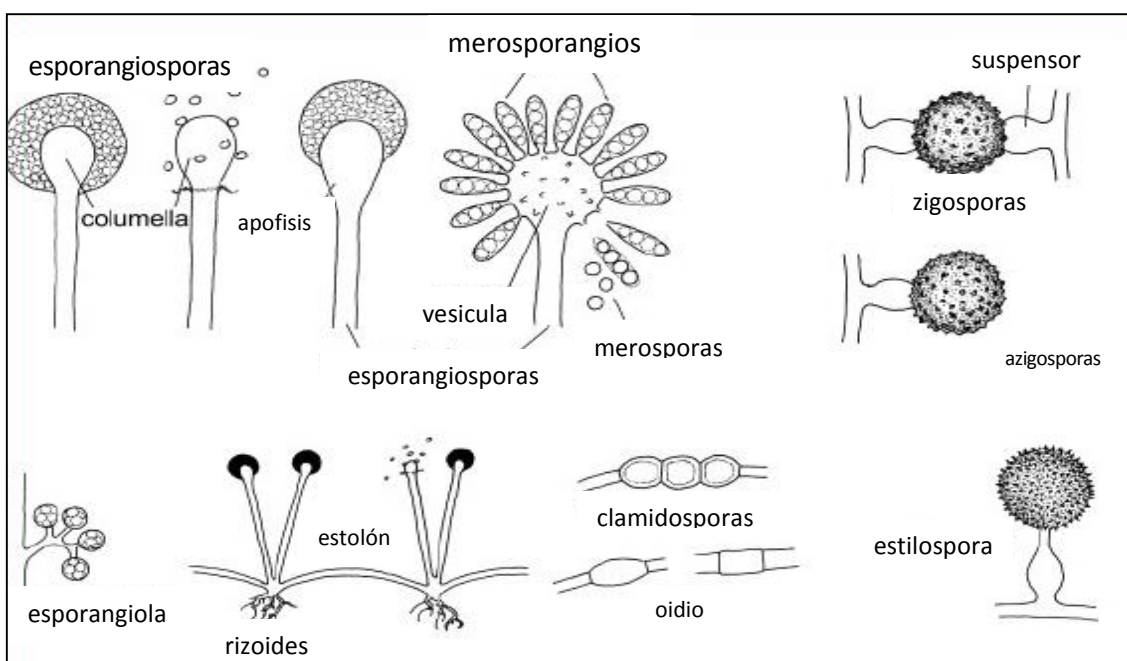


Figura 2. Esquema de las principales estructuras de Mucorales

El estudio de la micromorfología se realiza teniendo en cuenta los siguientes elementos que luego serán considerados para ingresar a las claves taxonómicas:

- a. Variaciones en el tipo de columela.
- b. Variaciones en la característica de la membrana peridial del esporangio.
- c. Variaciones en el número de esporas del esporangio.
- d. Variaciones en la disposición de los esporóforos.
- e. Variaciones en la formación de los esporóforos en nodos e internodos.
- f. Variaciones en la formación de zigosporas e hifas ornamentales (fulcras).

Claves para la identificación presuntiva de Mucorales

En la Tabla 2. Se muestra una clave básica para identificar algunas especies de *Mucorales*.

Tabla 2. Clave para identificar a *Mucorales* de importancia médica

	Descripción	Ubicación
1	Esporangios uniesporados.	<i>Cunninghamella</i>
1'	Esporangios multiesporados.	2
2	Esporangios cilíndricos (merosporangios) dispuestos sobre una vesícula, esporangiosporas dispuestas siempre en una hilera.	<i>Syncephalastrum</i>
2'	Esporangios multiesporados de otra forma.	3
3	Esporangios en forma de botella o florero.	<i>Saksenaea</i>
3'	Esporangios globosos, esféricos o piriformes, esporangiosporas irregularmente ordenadas, nunca en una sola hilera.	4
4	Esporangios piriformes con apófisis en forma de embudo, esporangióforos conectados por estolones y rizoides que no nacen opuestos al esporangióforo.	<i>Absidia</i>
4'	Esporangios globosos.	5
5	Esporangios sin columela.	<i>Mortierella</i>
5'	Esporangios con columela.	6
6	Rizoides ausentes.	<i>Mucor</i>
6'	Rizoides presentes.	7
7	Esporangios con apófisis, esporangióforos conectados por estolones, rizoides bien desarrollados que nacen en la base de los esporangióforos.	<i>Rhizopus</i>
7'	Esporangios sin apófisis, rizoides que no nacen en la base de los esporangióforos.	8
8	Pequeños esporangios ramificados en verticilos por debajo de los esporangios terminales. No termofílicos (no crecen a 45 °C).	<i>Actinomucor</i>
8'	Sin verticilos por debajo de los esporangios terminales. Termofílicos (crecen a 45 °C).	<i>Rhizomucor</i>

Descripción de los principales géneros

Género *Absidia*

Macromorfología: las colonias son de crecimiento invasor, textura lanosa, color blanco, gris a marrón grisáceo, micelio abundante. (Foto 12).

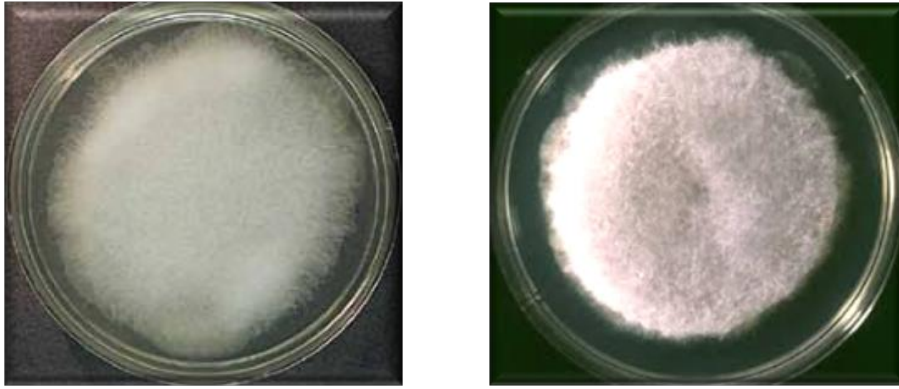


Foto 12. Colonia en agar Sabouraud, 28 °C, 3 días

Micromorfología: los esporangióforos surgen desde los estolones o desde el micelio aéreo. Los esporangios son terminales, multiesporados, esféricos a piriformes; la columela posee una apófisis cónica bien definida, puede presentar una o más proyecciones en el extremo. Las esporangiosporas son esféricas a ovoidales, de pared lisa o raramente equinuladas. (Figura 3)

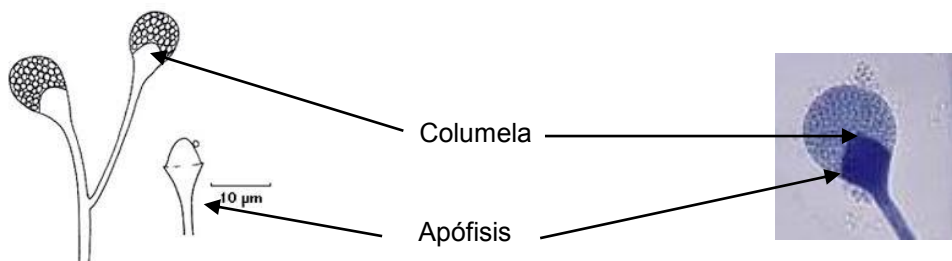


Figura 3. Esquema y microfotografía de apófisis y columela

Género *Cunninghamella*

Macromorfología: las colonias son invasivas con abundante micelio flocoso, de color gris tostado. (Foto 13).



Foto 13. Colonia en agar Sabouraud, 28 °C, 3 días

Micromorfología:

Esporangióforos erectos, en la región apical poseen un verticilo de ramificaciones laterales cortas las cuales terminan en una vesícula hinchada con una esporangióla uniesporada.

Las esporangiosporas son esféricas a ovoidales de pared lisa, algunas veces finamente equinulada.

Género *Mucor*

Macromorfología

Las colonias desarrollan rápidamente en 24-48 h, el color puede ser blancuzco a grisáceo, generalmente de varios centímetros de alto, forman una mata abundante por la producción de esporangióforos erectos. (Foto 14).



Foto 14. Colonia de *Mucor* sp., en agar Sabouraud, 28 °C, 3 días.

Micromorfología

Los esporangióforos no forman rizoides, no se originan de estolones, no presentan ramificaciones o están irregularmente ramificados y en su extremo llevan esporangios multiesporados. Los esporangios son esféricos, sin apófisis y con una gran columela; su pared es delicuescente, se rompe con el envejecimiento de los cultivos. (Foto 15).

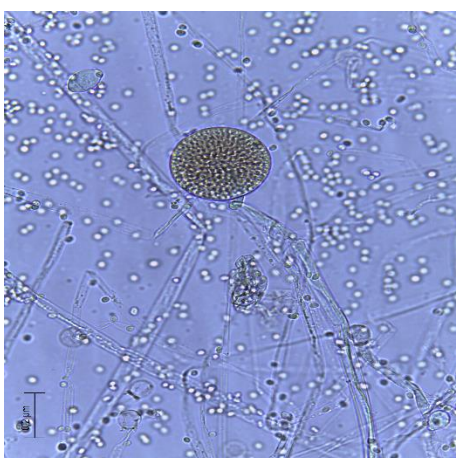


Foto 15. Esporangio de *Mucor* sp.

Género *Rhizopus*

Macromorfología

Las colonias son de rápido crecimiento, invasor y de textura vellosa, de color blanco, amarillo amarronado al gris amarronado, puede tornarse oscura cuando el cultivo envejece. (Foto 16).



Foto 16. Colonia en agar Sabouraud, 28 °C, 3 días.

Microscopía

Estolones y rizoides presentes. Los esporangióforos nacen por encima de los rizoides. Los esporangios son terminales, multiesporados, con apófisis y columela; la columela es esférica a ligeramente elipsoidal. Esporangiosporas angulares o (sub)esféricas, ornamentadas. (Figura 4).

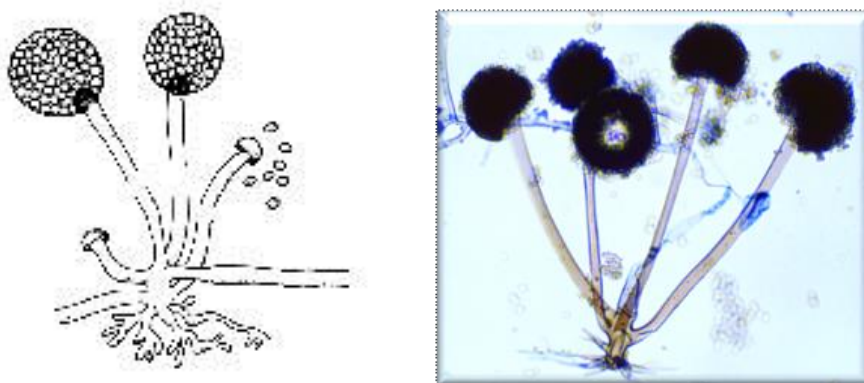


Figura 4. Esquema e imagen de *Rhizopus sp*

Género *Saksenaea*

Macromorfología

Las colonias son de rápido crecimiento (5-7 días), de textura vellosa, de color blanco, aunque el micelio no fructifica en medios comunes.

Microscopía

Saksenaea vasiformis presenta esporangióforos que terminan en un esporangio con forma característica de copa o vasija. Presentan rizoides. (Foto 17).

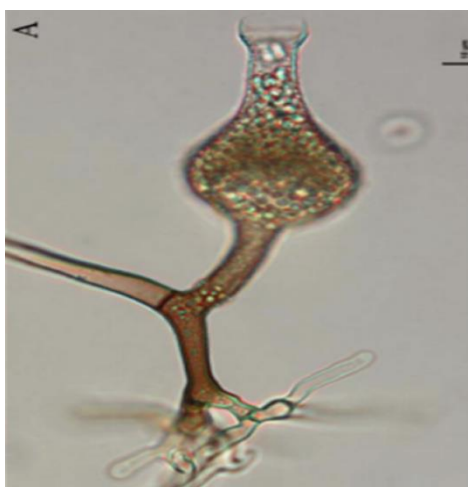


Foto 17. *Saksenaea vasiformis*. 40 X.

Tinciones

En cortes histológicos teñidos con H&E se pueden observar hifas anchas, con pocos o ningún tabique, de ramificación irregular y pueden estar rodeadas por reacción eosinofílica (Splendore-Hoeppli). (Foto 18).

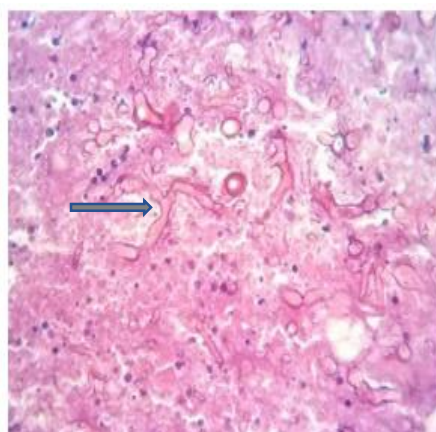


Foto 18. *Saksenaea vasiformis*. H&E 100 X
La flecha señala a la hifa ancha, sin tabiques.

Género *Syncephalastrum*

Macromorfología

Las colonias son invasivas, con abundante micelio aéreo, de color gris. (Foto 20).



Foto 20. Cultivo de *Syncephalastrum* sp., en agar Sabouraud, 28 °C, 72 h

Micromorfología

Los esporangióforos crecen opuestos a los rizoides, irregularmente ramificados, cada ramificación tiene una vesícula terminal que produce merosporangios sobre toda su superficie. Los merosporangios son grises y contienen de 3-18 merosporas de pared lisa, esféricas a ovoidales, color marrón pálido, dispuestas en una sola fila. (Figura 5).

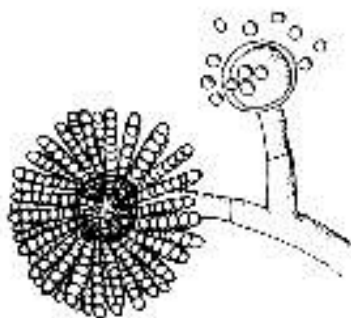


Figura 5. Esquema de un merosporangio de *Syncephalastrum* sp.

Fusariosis

La fusiariosis es una micosis severa, es causada por especies del género *Fusarium*, es de curso subagudo, y presenta distintas manifestaciones clínicas.

El género *Fusarium* comprende hongos de distribución universal, ubicuos en la naturaleza, son fitopatógenos y en determinadas ocasiones causan infecciones severas en personas y animales.

En las últimas décadas se describen con mayor frecuencia infecciones graves en los pacientes inmunodeprimidos, por tanto, su importancia ha crecido exponencialmente. Las infecciones por el género *Fusarium* se las clasifica como hialohifomicosis, es decir, causadas por hongos oportunistas que presentan hifas hialinas y septadas.

Características del género *Fusarium*

El género *Fusarium* se ubica en el clado *Gibberella*, está formado por aproximadamente 300 especies filogenéticamente distintas, distribuidas en un amplio rango de nichos naturales en todo el mundo.

Muchas de las especies son fitopatógenas, causan pérdidas económicas importantes.

Fusarium produce numerosas micotoxinas, tricotecenos, fumonisinas y zearalenona, las que contaminan los alimentos de consumo humano y animal y provocan severas micotoxicosis.

Presenta estructuras que contienen esporas sexuales llamados ascomas, son globosos o subglobosos a piriformes (peritecios), pueden presentarse solitarios o en grupos, blancos, amarillos, rojos, naranja, púrpura, ligeramente rugosos o tuberculados.

En la parte interior de los peritecios se encuentran dispuestos los ascos (sacas, bolsas) son clavados a cilíndricos, contienen 8 esporas, con o sin anillo apical. Cada ascospora puede presentar 1-3 septos, son elipsoidales, hialinas o amarillentas.

Distribución

Las especies de *Fusarium* tienen capacidad para crecer en numerosos y variados sustratos, el viento y la lluvia favorecen la dispersión de sus estados conidiales, llegando a trasladarse hasta 400 km de distancia del punto de origen.

Entre los pacientes de riesgo se mencionan los que padecen alteraciones de la respuesta inmune, diabéticos, quemados, con heridas contaminadas con tierra, con trastornos inmunológicos o con tratamiento inmunosupresor.

Patogenia

El hongo ingresa al organismo a través de lesiones por traumas y puede diseminarse si el estado inmunológico del paciente está severamente comprometido.

Además, se consideran otros factores de virulencia, como la producción de toxinas y enzimas, aunque el papel en el desarrollo de las infecciones aún no es claro.

Fusarium tiene capacidad para adherirse al material plástico, como catéteres, cánulas, sondas, aunque no invade la pared de los catéteres.

La participación de los macrófagos y los leucocitos polimorfonucleares es esencial en la eliminación de estos microorganismos. Por su parte, los polimorfonucleares inhiben el crecimiento de las hifas, mientras que los macrófagos son capaces de impedir la germinación de los conidios.

Manifestaciones clínicas

Queratitis. Los traumatismos con astillas, ramas de árboles o plantas, las heridas por arañazos entre felinos, mordedura durante las peleas entre los animales, son los principales factores de riesgo de padecer la infección.

Otros factores de riesgo son la presencia de patología previa en la córnea, cirugías, y los tratamientos tópicos con corticoides o antibióticos durante tiempos prolongados.

La infección puede avanzar hasta causar una endoftalmitis, con pronóstico reservado, en la mayoría de los casos se requiere la enucleación del globo ocular.

Piel. Las lesiones se generan por inoculación directa o por diseminación sanguínea. Los hongos colonizan la piel, la presencia de humedad excesiva, quemaduras, traumatismos o inmunodepresión, son factores predisponentes que pueden favorecer el desarrollo de la infección. Las lesiones incluyen la formación de granulomas, úlceras, necrosis, queratosis con eritema, nódulos subcutáneos indurados con zona de necrosis central, micetomas, paniculitis, etc.

Infección diseminada. Este tipo manifestación se presenta en animales colonizados con *Fusarium* antes de ingresar a la internación y luego, si padece neutropenia, desarrolle la infección. Estas infecciones ocurren principalmente en pacientes con enfermedades hematológicas o bien, en aquellos que reciben tratamiento con quimioterápicos.

Otros órganos

Con menor frecuencia se describen lesiones en oído, hueso, articulaciones, cavidad nasal, absceso cerebral, etc.

Diagnóstico microbiológico

El género *Fusarium* está formado por complejos de especies, por lo tanto, la información que aportan las técnicas de identificación fenotípica es limitada, sobre todo para identificar a nivel de la especie, y hay que recurrir a técnicas de biología molecular.

La toma de muestras se realiza a partir de cualquiera de los órganos que afecta: piel, córnea, esputo, hueso, sangre, etc. Son relativamente fáciles de recuperar de sangre, a diferencia de *Aspergillus* cuya tasa de aislamientos a partir de esta muestra es muy baja.

La biopsia para el estudio histológico debe incluir diferentes áreas de la lesión, y si es de piel hay que tomar muestras de zonas superficiales y profundas para intentar diferenciar entre colonización e infección.

Observación directa-coloraciones

Con H&E o con PAS se observan hifas septadas, de 3 a 8 μm de ancho, más o menos ramificadas, frecuentemente en ángulo de 45° y con una zona de constricción donde emerge la ramificación. Pueden observarse en la luz de vasos sanguíneos.

Cultivos

La morfología y la pigmentación de la colonia y la ausencia o presencia de esporodocios, esclerotes o estromas en diferentes medios de cultivo son de ayuda para ingresar a las claves taxonómicas. En medios comunes, como el agar papa, o el agar Sabouraud para el primo aislamiento las colonias son de crecimiento rápido, en 7-10 días pueden cubrir una placa de Petri de 9 cm de diámetro.

Los medios de cultivo agar clavel, agar tierra, agar extracto de malta, agar harina de avena, medio con KCl, agar arena, agar nutriente sintético, medio de Komada, Czapeck-Dox, etc, se usan para favorecer la expresión de alguna característica fenotípica de la especie en estudio. El color de la colonia depende de la especie y puede ser blanquecino, crema, anaranjado, rosa, rojizo, púrpura, etc. Estas coloraciones también pueden variar según los diferentes medios de cultivo. El micelio aéreo suele ser abundante y de aspecto algodonoso. La velocidad de crecimiento, la morfología y la pigmentación de la colonia son datos importantes para la identificación fenotípica.

La temperatura habitual de incubación de estos hongos es entre 25 y 28 °C. La formación de conidios puede estimularse incubando los diferentes medios bajo luz negra (300-400 nm) y también alternando luz y temperatura (25 °C día/20 °C noche).

Micromorfología: el estudio de las características microscópicas se realiza mediante el crecimiento del hongo en cultivo en lámina. Es posible observar las siguientes estructuras

- **Conidióforos:** son mono o polifialídicos o en esporodocio.
- **Microconidios:** pueden estar presentes o ausentes.
- **Macroconidios:** multiseptados, rectos o curvos, con o sin célula apical en gancho.
- **Clamidosporas:** ausentes o presentes, globosas, subglobosas, elipsoidales, terminales o intercalares, en cadenas o simples.

Identificación

Las técnicas fenotípicas son útiles para arribar a la identificación a nivel de complejo de especies y las características macroscópicas son útiles para la descripción de las especies, pero no para su diferenciación.

La identificación definitiva de las especies se realiza mediante PCR y secuenciación.

En la Tabla 3 se muestra una clave abreviada para identificar a las principales especies de *Fusarium*.

Tabla 3. Clave para la identificación de algunas especies de *Fusarium* sp.

	Descripción	Ubicación taxonómica
1	Microconidios agrupados en cadenas	2
1'	Microconidios agrupados en cabezas	3
2	Microconidios en cadenas (y cabezas) producidos a partir de monofiálides únicamente	<i>F. verticillioides</i>
2'	Microconidios en cadenas (y cabezas) producidos a partir de mono y polifiálides	<i>F. proliferatum</i>
3	Microconidios producidos a partir de monofiálides cortas	<i>F. oxysporum</i>
3'	Microconidios producidos a partir de monofiálides largas que generalmente presentan 1 o 2 septos transversales	<i>F. solani</i>

Fusarium sp.

En la foto 21 se muestra la estructura microscópica de *Fusarium* sp.

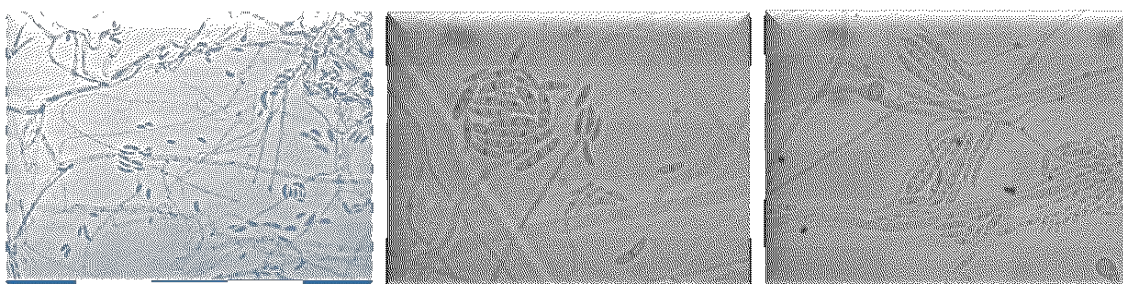
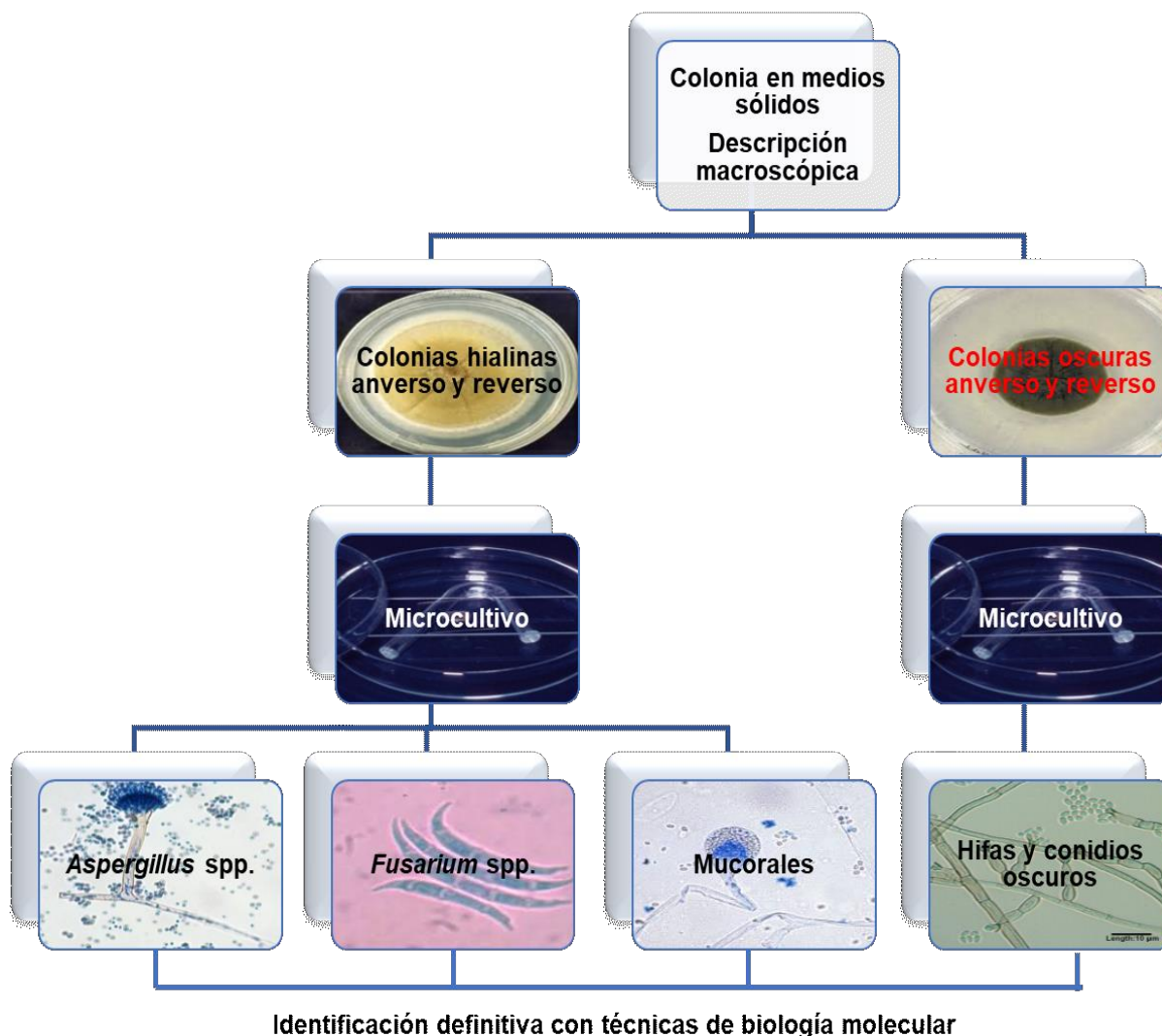


Foto 21. Cultivos de *Fusarium* sp. en agar Sabouraud, 28 °C, 7 días. Presencia de macroconidios fusi-formes, microconidios, micelio filamentoso tabicado hialino.

Algoritmo de identificación presuntiva de hongos miceliales



Glosario

Artrospora (artroconidio). Espora asexual formada directamente por división y transformación de una hifa.

Asco/asca: estructura como un saco que contiene (habitualmente ocho) ascosporas desarrolladas durante la reproducción sexual.

Ascoma: estructuras que contienen esporas sexuales llamados

Ascomycota: gran división de hongos superiores que se distinguen por hifas tabicadas y por esporos sexuales formados en ascos o sacos de esporos.

Ascospora: esporas resultantes de la reproducción sexual que se producen dentro de una estructura en forma de saco llamada asco. Los ascos pueden estar contenidos dentro

de cuerpos fructíferos (ascoma) que se diferencian en cinco tipos de acuerdo a su forma y tipo de pared.

Clamidospora: elemento de resistencia formada por la diferenciación directa del micelio, con pared celular gruesa y citoplasma concentrado. Su diámetro es mayor que el de los filamentos en los que se forma.

Cleistotecio: estructura sexual habitualmente esférica, en la cual están contenidos ascos con ascosporas en su interior.

Cigosporas/Zygospora: esporas resultantes de la reproducción sexual que se producen dentro de un cigosporangio, que permanece unido a las dos hifas que se fusionaron para darle origen (gametangios).

Columela: estructura estéril, no reproductiva, se extiende en el interior del esporangio de algunos hongos.

Conidia/Conidio: espora formada como consecuencia de un proceso de reproducción asexual. Son generados en forma exógena, aisladamente o en grupos, ya sea directamente sobre células independientes (levaduras), sobre el ápice y/o los lados de las hifas o sobre estructuras especializadas denominados conidióforos (miceliales). Los conidios se separan del punto de unión por pinzamiento o compresión. Pueden clasificarse por forma, tamaño, anatomía, etc..

Conidióforo: hifa aérea especializada que sostiene y da origen a las conidias. Algunos conidióforos se dilatan en su extremo, y sobre esta superficie se forman numerosos pedúnculos en forma de frasco, de donde salen los conidios en cadenas (catenoide). La porción dilatada del conidióforo se denomina vesícula, las estructuras en forma de frasco son los esterigmas o fiálides. Los conidióforos pueden estar libres sobre el micelio, ya sea aislados o en grupos, o encontrarse agrupados o encerrados en estructuras especiales, que de acuerdo a su forma reciben el nombre de picnidios (piriformes) o acérvulos (almohadillas), esporodoquios (agrupaciones de conidióforos).

Dematiáceo: oscuro, referido a hongos oscuros o negros.

Equinulado: espinoso.

Esclerote: masa compacta de micelio, contiene reservas de alimento, son estructuras de resistencia.

Espora: célula formada como consecuencia de un proceso de reproducción sexual.

Esporangio: estructura cerrada dentro de la cual se producen esporas asexuadas por clivaje.

Esporangióforo: rama micelial especializada que sostiene un esporangio.

Esporangiolos: esporangios pequeños, con o sin columela, con pocas o sólo una espora (monosporangios),

Esporangiosporas: se forman por fragmentación del citoplasma dentro de estructuras cerradas denominadas esporangios y por lo tanto son siempre endógenas (endosporas); son típicas de los hongos mucorales. Los esporangios pueden encontrarse sobre estructuras especializadas denominados esporangióforos.

Esporodoquio: conidióforos que surgen de un estroma central en forma de almohadilla, más empaquetados y cortos que el sinema.

Esterigma: proyecciones especializadas, cortas o elongadas, a partir de conidióforos en las cuales se desarrollan conidios.

Estolón: hifa que conecta dos grupos de rizoides.

Feohifomicetes: hongos miceliales que poseen pigmentos oscuros en sus micelios y estructuras de fructificación.

Fiálide: porción especializada de los conidióforos, habitualmente con forma de frasco o botella, de la cual se originan las conidias.

Hialino: transparente o translúcido como el vidrio. Se aplica en biología a los tejidos y órganos que muestran ese aspecto

Hialohifomicetes: hongos miceliales que presentan micelio hialino o con pigmentos claros, nunca negros o marrones.

Hifas: filamentos que forman el tallo o cuerpo de un hongo.

Macroconidia: la más grande de dos o más tipos de conidias dentro de la misma especie de hongos.

Micelio: conjunto de hifas o filamentos de un hongo.

Micotoxicosis: proceso no infeccioso debido a la ingesta de toxinas producidas por ciertos hongos.

Microconidia: la más pequeña de dos o más tipos de conidias dentro de la misma especie de hongos.

No tabicado: que carece de tabiques.

Peritecio: ascoma en forma de pera o subgloboso, contiene ascas y ascosporas en su interior.

Rizoides: estructura equivalente a la raíz de los vegetales, cumple con función de soporte y nutrición.

Saprofito: cualquier microorganismo vegetal que obtiene su nutrición de materia orgánica muerta.

Sésil: adherido directamente por la base, sin un pedículo.

Tabicado: dividido por paredes transversales.

Talo: cuerpo del hongo.

Vegetativo: referido a hifas que se extienden hacia el sustrato que constituyen la porción que absorbe alimentos de un hongo.

Referencias

Arenas, R.A. *Micología Médica Ilustrada*. 5º edición, Ed. McGraw Hill Interamericana (2014).

Barrs VR, van Doorn TM, Houbraken J, Kidd SE, Martin P, Pinheiro MD, Richardson M, Varga J, Samson RA. (2013). *Aspergillus felis* sp. nov., an emerging agent of invasive aspergillosis in humans, cats, and dogs. PLoS One.;8(6):e64871. doi:10.1371/journal.pone.0064871.

- Della Vedova R, Hevia A, Vivot W, Fernández J, Córdoba S, Reynaldi F. (2019). *Aspergillosis in domestic and wild birds from Argentina*. Braz J Vet Res Anim Sci.;56(2):e152460 <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2019.152460>
- Beneke Everett. S, Alvin L. Rogers. *Medical mycology and human mycoses*. STAR Publishing Company. P.O. Box 68. Belmont, California 94002. (1996).
- Refojo N, Abrantes R. *Identificación de Hongos Miceliales*. Departamento Micología. INEI AN-LIS “Dr. C. G. Malbrán”. Especialización en Diagnóstico Veterinario en Laboratorio. FCV-UNLP. 2019.
- de Hoog GS, Guarro J, Gené J, Ahmed S, Al-Hatmi AMS, Figueras MJ & Vitale RG. *Atlas of clinical fungi*. 3 rd ed. Utrecht / Reus, 2019.
- Guía de T.P. Cátedra de Micología Médica e Industrial “Prof. Dr. Pablo Negroni”. Año 2019. Carrera de Microbiología. F.C.V., UNLP.
- Frisvad JC, Hubka V, Ezekiel CN, Hong SB, Nováková A, Chen AJ, Arzanlou M, Larsen TO, Sklená F, Mahakarnchanakul W, Samson RA, Houbraken J. (2019). *Taxonomy of Aspergillus section Flavi and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins*. Stud Mycol.. 93:1-63. doi: 10.1016/j.simyco.2018.06.001.
- Padilla Peñuela, C; Galindo Z, V. (2014). *Aspergilosis nasal en un perro: reporte de un caso*. Rev. Med. Vet. ISSN 0122-9354. N° 28: 81-89.
- Reynaldi FJ, Giacoboni G, Córdoba SB, Romero J, Reinoso EH, Abrantes R. (2017). *Mucormycosis due to Saksenaea vasiformis in a dog*. Med Mycol Case Rep. 16:4-7. doi: 10.1016/j.mmcr.2017.03.001. eCollection 2017 Jun.
- Samson RA, Peterson SW, Frisvad JC, Varga J. (2011). *New species in Aspergillus section Terrei*. Stud Mycol30;69(1):39-55. doi: 10.3114/sim.2011.69.04.
- Waalwijk C, Taga M, Zheng SL, Proctor RH, Vaughan MM, O'Donnell K. (2018). *Karyotype evolution in Fusarium*. IMA Fungus. 9(1):13-26. doi: 10.5598/imafungus.2018.09.01.02.

CAPÍTULO 4

Micosis oportunistas por levaduras

Susana B. Córdoba, Romina Della Vedova

Tres cosas son buenas en pequeña medida y malas en grande: la levadura, la sal y la duda

EL TALMUD

Las levaduras son hongos unicelulares, de amplia distribución en la naturaleza, pueden ser aisladas a partir de la mayoría de los substratos orgánicos e inorgánicos: frutas, granos, miel, piel, intestino y mucosas de mamíferos, aire, suelo, ambientes acuáticos.

Históricamente las levaduras han sido utilizadas en la industria alimenticia y farmacéutica por sus numerosas propiedades en beneficio de animales y personas. Así, las levaduras fermentadoras son aprovechadas en la elaboración de bebidas alcohólicas, cerveza, vino, en la panificación, en la producción de fermentos lácteos.

Otras levaduras tienen efectos nocivos ya que se comportan como deteriorantes con impacto negativo y pérdidas económicas en distintas industrias: de alimentos, de cueros, textil. Además, son capaces de deteriorar obras de arte, cuadros, estatuas, sobre el papel de libros antiguos. En otros escenarios, las levaduras pueden comportarse como patógenos de animales, personas, incluso de vegetales.

El incremento en la frecuencia de patologías causadas por levaduras se debe a que forman parte de la biota de las mucosas y de la piel tanto de animales como de las personas, esto hace que puedan comportarse como patógenos oportunistas frente a las alteraciones en las defensas del hospedero (pacientes que reciben corticoterapia, uso indiscriminado de antibióticos de amplio espectro, terapia antitumoral, cateterización por tiempo prolongado, inmunosupresión por agentes infecciosos como *ViLef*, *VIF*).

En los animales la severidad de las lesiones puede variar desde formas benignas y localizadas (generalmente cutáneas o mucocutáneas), hasta fungemias o micosis sistémicas diseminadas con desenlace fatal.

En medicina veterinaria las especies de levaduras principalmente involucradas en procesos infecciosos se encuentran en los géneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Malassezia* y *Trichosporon*.

En este capítulo se hará una breve mención de las distintas patologías causadas por levaduras de interés clínico y se describirán los algoritmos de diagnóstico de laboratorio.

Infecciones causadas por especies del género *Candida*

Dentro del género *Candida* se describen alrededor de 314 especies, aunque no todas son patógenas. Algunas levaduras del género *Candida* se comportan como comensales formando parte de la biota habitual en mucosas, submucosas y sobre la piel de animales y personas.

Cuando se producen alteraciones en las defensas celulares, en la fisiología o se altera el equilibrio de la biota, las levaduras encuentran la oportunidad para colonizar, infectar y producir enfermedad. El potencial patógeno de las levaduras varía con su virulencia, pero deben producirse cambios en cualquiera de los tres factores mencionados anteriormente para que un individuo sea infectado. La intensidad de la enfermedad depende de la intensidad de la alteración del hospedador más que de la virulencia de la levadura. Las especies aisladas con mayor frecuencia como agentes causales de infecciones en animales y personas se encuentran en el complejo *Candida albicans*, seguido del complejo *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, y el complejo *Candida glabrata*.

Características generales de las especies de *Candida*

Las levaduras del género *Candida* presentan micelio unicelular, brotación multilateral, pueden formar pseudomicelio y micelio verdadero. Las células brotantes no son aciculares, ni en forma triangular ni de botella. No hay formación de esterigmas. No forman gran cantidad de ácido a partir de glucosa. Pueden o no ser fermentadoras. Pueden o no asimilar nitrato o inositol. La mayoría de las especies tienen estados perfectos o teleomorfos asignados al Orden *Saccharomycetales*.

Ecología y distribución geográfica

Están ampliamente distribuidas en la naturaleza, en ambientes acuosos, en el suelo, sobre materia orgánica e inorgánica, pueden vivir como saprófitos en el organismo de animales y de las personas, o bien actuar como patógenos oportunistas.

Patogenia

Cualquier alteración en el equilibrio de la biota cutánea y de las mucosas, puede resultar en un crecimiento anormal de las levaduras y generar procesos infecciosos leves o graves, dependiendo del estado de inmunocompetencia del hospedador.

Entre los principales factores que facilitan la aparición de infecciones por levaduras figuran:

- Variaciones del pH de piel o mucosas por el uso de soluciones jabonosas, desodorantes, perfumes o aromatizantes para la higiene diaria de los animales.
- Las alteraciones del equilibrio del medio interno, como cambios hormonales o fisiológicos.

- Los tratamientos prolongados con corticoides, antibióticos, quimioterapia.
- Pacientes con cáncer.

Con menor frecuencia, algunas levaduras ingresan al organismo con el alimento y si existen micro lesiones en la mucosa del tracto digestivo pueden entrar al torrente sanguíneo y generar septicemia.

Debido a la rapidez que tienen las levaduras para adaptarse a los cambios del hospedador y tomar ventaja de cualquier tipo de alteraciones que le permitan colonizarlo, las manifestaciones clínicas de las infecciones que producen son muy variadas. Pueden hacer blanco en piel, sistema digestivo, sistema respiratorio, sistema reproductor.

Manifestaciones clínicas

Las infecciones pueden ser cutáneas, mucocutáneas, subcutáneas o profundas (localizadas o generalizadas) y pueden afectar cualquier área del cuerpo, y en general se manifiestan como lesiones inflamatorias de acuerdo al órgano blanco. El cuadro clínico puede evolucionar de modo desfavorable a sepsis y candidemia con compromiso de vida si no se instaura el tratamiento adecuado en el menor tiempo posible.

Entre las afecciones más frecuentes se destacan:

- Candidiasis intertriginosa

Se presenta en zonas del cuerpo con pequeños o grandes pliegues cutáneos, con aposición de piel, retención de humedad, más frecuente en pacientes obesos o excedidos de peso. Toma pequeños pliegues en los espacios interdigitales de patas, en los grandes pliegues submama-rios, pliegues labiales, pre escapulares o en las ingles.

En caninos que transitan sobre pisos de cemento, pisos duros, o bien sobre material de construcción que les erosiona los tejidos del espacio interdigital. El animal suele presentar claudicación leve, la piel está erosionada, cubierta con secreción blanquecina, de aspecto cremoso sobre un lecho rojizo, eritematoso, puede manifestar prurito por contaminación bacteriana.

En los caninos que tienen grandes pliegues (basset hound, bull dog inglés, bull dog francés, shar pei, mastín napolitano) el intertrigo candidiásico puede presentarse cuando continuamente son higienizados con soluciones jabonosas o detergentes que eliminan a los ácidos grasos con C12-C14 los que se polimerizan a C16-C18 sin poder antiséptico.

- Candidiasis del buche

Esta forma clínica se presenta en aves, principalmente en palomas y gallináceas. Los factores predisponentes son la higiene deficiente, tratamiento prolongado con antibióticos, parasitosis, etc. Se manifiesta con lesiones ulcerosas, pequeñas, delimitadas, múltiples, localizadas en la mucosa del buche y se puede propagar al esófago.

- Candidiasis vulvovaginal:

En hembras caninas puede presentarse la candidiasis vulvovaginal pero en muy baja frecuencia. Se manifiesta con prurito, ardor, dolor, dispareunia. La secreción tiene aspecto de queso cottage, leche cortada, blanca, cremosa, inodora.

- Candidiasis diseminada (sistémica)

Las distintas especies de *Candida* pueden causar infección sistémica temporaria cuando se produce un fuerte inóculo de esas levaduras por ruptura de las barreras de defensa. Las vías comunes de ingreso para estos casos son: catéteres y sondas. Las levaduras colonizan estos elementos y diseminan por sangre causando candidemia, con hemocultivos (+). En ocasiones, al retirar el catéter o la sonda puede negativizarse el cultivo.

En pacientes con déficit inmunológico, la situación se complica. Hay invasión fúngica de los tejidos, producción de granulomas, trombos intravasculares, abscesos y/o masas obstructivas. El pronóstico es reservado. La diseminación puede abarcar SNC dando meningitis, puede afectar riñón, miocardio, endocardio, ojos, piel, digestivo.

La invasión primaria pulmonar es muy rara, pero puede ser blanco de una diseminación mostrando lesiones nodulares pequeñas distribuidas al azar en ambos pulmones. El cuadro clínico es el de una bronconeumonía confundible con una debida a bacterias, puede simular una tuberculosis miliar, o bien neoplasias diseminadas.

Diagnóstico Clínico

Es importante la anamnesis, la evaluación de los parámetros fisiológicos del paciente, y la valoración de las manifestaciones clínicas.

Diagnóstico de Laboratorio

- **Toma de muestras:** raspados de piel, de mucosas, biopsias, secreciones bronquiales, orina, líquido céfalo raquídeo (LCR), heces, sangre, etc.
- **Examen microscópico directo:** los raspados de piel se procesan con el agregado de OHK al 40 % en caliente para favorecer la visualización de las estructuras fúngicas. Para las muestras tomadas a partir de las mucosas, una vez realizado el extendido del material sobre el portaobjetos se agrega azul de metileno, o bien se agrega lacto fenol + azul de algodón. Si la muestra clínica es un material purulento denso, se debe agregar OHK 20-40 %. Se evidencia diámetro de las células, presencia o ausencia de pseudohifas, número de brotaciones, etc.

- **Biopsias:** coloraciones para improntas con Gram, coloraciones para tejidos con Giemsa, PAS, Grocott, Gomori. En los tejidos aparecen células esféricas u ovals brotantes, 3-6 μm , paredes finas, dispuestas en aglomerados y mezcladas, con o sin pseudohifas.
- **Cultivo:** se usan medios comunes como el Agar Sabouraud, adicionados con cloranfenicol 250 mg/L, o penicilina 20 U/mL + estreptomina 40 $\mu\text{g/mL}$. Las levaduras desarrollan tanto a 28 °C como a 37 °C dentro de las 24-72 h.
- **Aspecto macroscópico de la colonia:** colonias de morfología variable, blanca, color crema, lisas o anilladas, húmedas o secas, blandas o consistentes. Algunas colonias producen pseudohifas que las rodean dando el aspecto de deshilachado.
- **Aspecto microscópico:** las levaduras forman blastoconidias, algunas especies forman pseudohifas, otras forman micelio verdadero.

Estudio de la macromorfología, micromorfología y metabolismo de *Candida* sp.

Características de la reproducción vegetativa:

1. Examen del tipo de reproducción vegetativa.
2. Morfología celular.
3. Formación de hifas y pseudohifas (microcultivo).
4. Prueba de formación de tubo germinativo (en suero bovino).
5. Prueba de formación de clamidosporos (medio bilis de FEO).
6. Aspecto cultural en medios líquidos y sólidos (extracto de malta líquido, agar harina de maíz).

Características sexuales

Determinación de presencia o ausencia de ascos y ascosporas utilizando distintos medios de esporulación (zanahoria, block de yeso, Gorodkova, agar acetato).

Características fisiológicas y bioquímicas

1. Utilización de compuestos carbonados:
 - a- Fermentación de galactosa, glucosa, sacarosa, maltosa, lactosa, rafinosa. (Zimograma).
 - b- Asimilación: se realiza el auxanograma (diagrama nutritivo) para 18 compuestos básicos.
2. Asimilación de compuestos nitrogenados.
3. Crecimiento en medios libres de vitaminas.
4. Crecimiento a 37° C y otras temperaturas.

5. Producción de amonio por acción de la ureasa (test de la ureasa).
6. Sensibilidad a la cicloheximida.

Procedimientos para la identificación presuntiva de levaduras

- Características de la reproducción vegetativa:

En medio de cultivo extracto de malta líquido las levaduras pueden presentar brotación multipolar, unipolar, fisión, fisión-brotación, según el género y especie en estudio. La descripción de estas estructuras es útil para arribar a la identificación presuntiva de las levaduras. (Foto 1 a, b, c). (Foto 2 a, b, c).

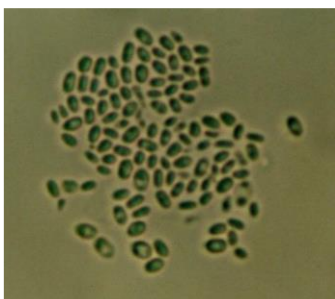


Foto 1.a. Blastoconidios



1. b. Pseudohifas



1. c. Arthroconidios

- Formas de reproducción asexual

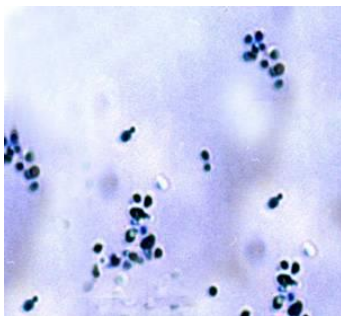
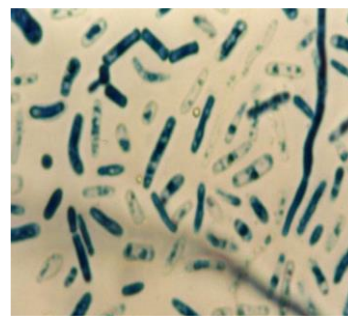


Foto 2. a. Brotación monopolar



2. b. Brotación multipolar



2. c. Fisión-brotación

Producción de tubo germinativo

Se utiliza para identificar presuntivamente a las levaduras del complejo *C. albicans*, tiene una exactitud del 95 %. Se observa una proyección digitiforme delgada, sin constricción en el punto de origen. (Foto 3. a)

Producción de clamidoconidios

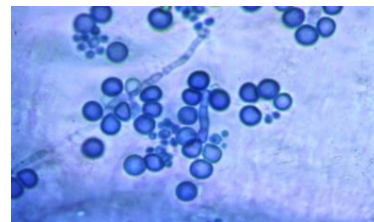


Foto 3. a- Tubo germinativo

3. b- *C. albicans*. Clamidoconidios únicos, terminales

3. c- *C. dubliniensis*. Clamidoconidios en racimo

La formación de clamidoconidios (sinónimo clamidosporas) es característica de las especies del complejo *C. albicans* aunque solo el 68 % de las cepas dan positivo. Son esporas de resistencia, redondas, refringentes, de pared engrosada y ricas en lípidos. La formación de clamidoconidios se produce en medio de bilis de Feo, en agar leche o en extracto de malta líquido. Los clamidoconidios son únicos y terminales en *C. albicans* y se presentan en racimos, agrupados en *C. dubliniensis*. (Foto 3. b y c).

Medio cromogénico comercial: CHROMagar Candida

El medio contiene en su composición un compuesto cromógeno que permite identificar presuntivamente aislados del complejo *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei*. La especificidad y la sensibilidad es mayor al 99 %. El cromógeno que forma parte del medio de cultivo permite observar si existe una infección mixta ya que las colonias desarrollan con distintos colores.

Procedimiento:

A partir de un cultivo de 24-48 h en agar Sabouraud de la cepa en estudio hacer un re aislamiento sobre CHROMagar. Se puede sembrar la muestra clínica al pie del paciente ya que el medio de cultivo tiene inhibidores de biota contaminante. Incubar 48 h a 30 °C y 37 °C.

Interpretación:

Las distintas especies pueden diferenciarse mediante el color y las características macroscópicas de las colonias.

Complejo *C. albicans*: colonias verdes.

C. tropicalis: colonias azul metálico.

C. krusei: colonias rosa seco o velloso.

Otras especies: colonias de blanco a malva. (Foto 4).



Foto 4. Desarrollo de *Candida* en placa con medio cromogénico, se observa el color de las colonias.

Identificación definitiva de levaduras por métodos comerciales

En los laboratorios clínicos se utilizan sistemas comerciales para identificar levaduras, los que cada vez son más eficaces, rápidos, y permiten identificar un elevado porcentaje de las levaduras de interés médico.

Los sistemas comerciales confiables que existen actualmente en el mercado son los siguientes:

- ID 32C (bioMérieux)
- API 20C Aux system (bioMérieux)
- VITEK YBC system (bioMérieux) y VITEK 2 System(bioMérieux)
- Espectrometría de Masas (MALDI-TOF)

ID 32C (bioMérieux)

El equipo consiste en una galería de plástico descartable con 32 pocillos, los cuales contienen 29 sustratos deshidratados para pruebas de asimilación (carbohidratos, ácidos orgánicos y aminoácidos), una prueba de sensibilidad a cicloheximida, una prueba colorimétrica para determinar hidrólisis de la esculina y un control negativo. Permite identificar el 92 % de los aislados comunes y el 85 % de los aislados menos frecuentes.

El procedimiento se realiza según indicaciones del fabricante, y los resultados se obtienen a las 48 h de incubación a 30 °C.

La lectura se realiza visualmente y el crecimiento se determina por presencia de turbidez en el pocillo correspondiente. Los resultados se traducen en un biocódigo numérico de 8 dígitos que permite la identificación al ingresar los datos en un manual de códigos. Es necesario realizar la observación de la micromorfología ya que algunas levaduras comparten los perfiles de asimilación, p. ej *Cryptococcus* y *Trichosporon*.

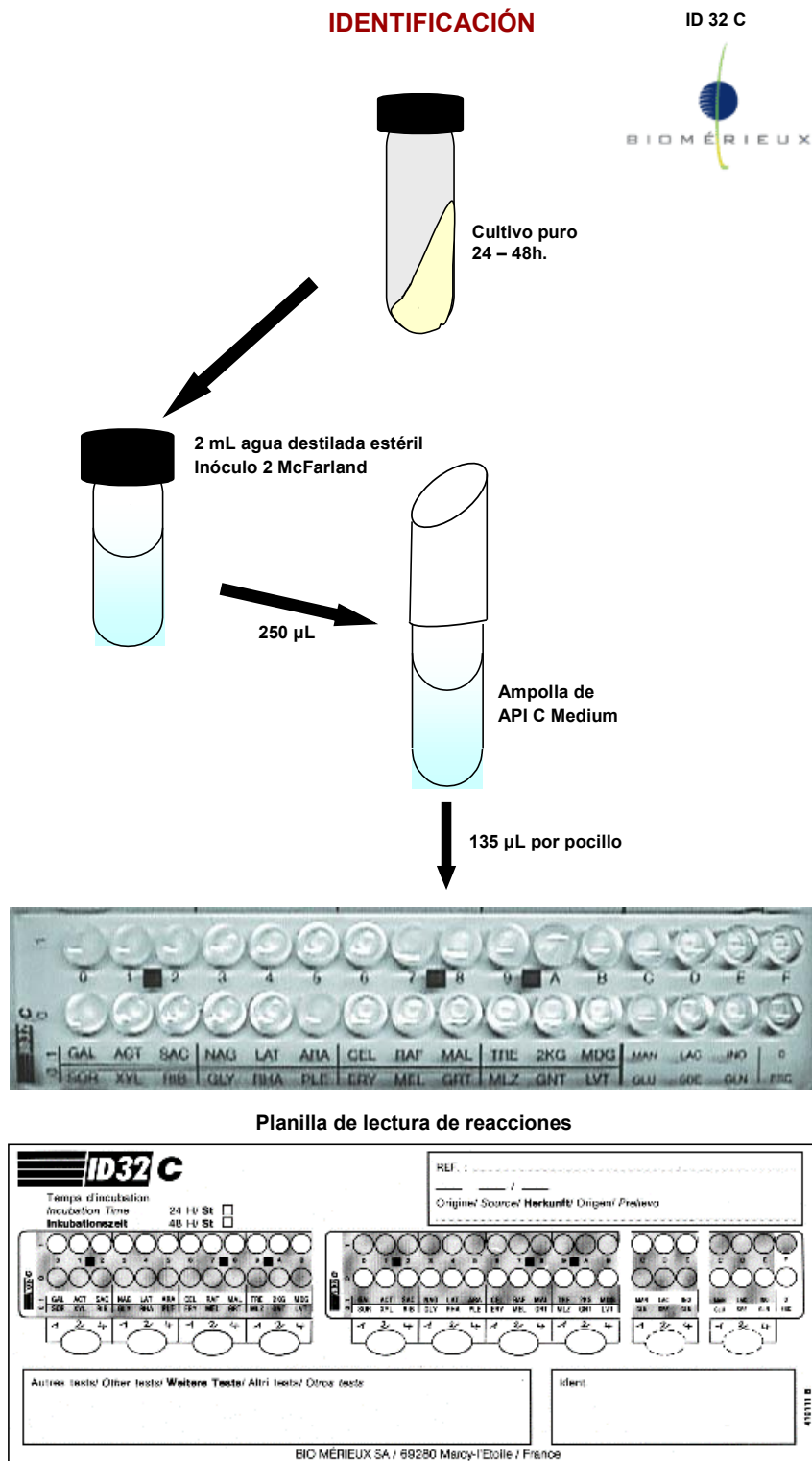


Figura 1. Procedimiento indicado por el fabricante de ID32C

ID 20C (bioMérieux)

Este sistema tiene menor cantidad de sustratos que el ID32C, el procedimiento es el mismo, así como la lectura e interpretación de los resultados.

VITEK YBC system (bioMérieux)

Es un sistema automatizado que se utiliza para identificar y determinar la sensibilidad a los antifúngicos a levaduras del género *Candida* y *Cryptococcus*.

Consiste en una tarjeta de plástico descartable que contiene los sustratos que utiliza la levadura para su desarrollo. La tarjeta se carga por capilaridad con el inóculo estandarizado de la levadura en estudio, se coloca en el equipo, se incuba, la lectura se realiza en el equipo, se mide la densidad óptica y queda registrado gracias a un programa. Los resultados se obtienen a las 13-24 h de incubación a 35 °C.

La identificación requiere la observación de la micromorfología. Este sistema permite identificar alrededor del 89 % de los aislados, sin embargo, este porcentaje varía según las especies estudiadas.

Espectrometría de Masas (MALDI-TOF MS)

La técnica de espectrometría de masas se la conoce como MALDI-TOF por sus siglas en inglés *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* (desorción/ionización láser asistida por matriz) y TOF (por sus siglas en inglés *Time-Of-Flight*) el detector de iones que se acopla al MALDI. Consiste una ionización suave del analito (cultivo o muestra clínica) que provoca la vaporización de moléculas termolábiles, no volátiles tales como proteínas y lípidos en un rango de peso molecular entre 2 a 20 kDa.

MALDI TOF MS, tiene un costo alto de inicio y con el uso pasa a un costo relativamente bajo, resultando en beneficio directo porque es posible obtener resultados inmediatos (30-60 min) en la identificación con certeza de hongos, bacterias, virus y parásitos.

Permite la diferenciación de especies cercanas genéticamente, así como la diferenciación de especies que poseen perfiles bioquímicos similares y que antes sólo podían ser diferenciadas correctamente por métodos basados en ADN.

Es posible identificar 96 muestras en cada ensayo. La posibilidad de contar con la identificación del agente etiológico en forma casi inmediata es de utilidad para elegir el tratamiento más adecuado en el menor tiempo posible a partir del diagnóstico.

El equipo puede utilizarse para procesar cultivos de microorganismos y muestras clínicas.

A la fecha, en el país existen dos equipos comerciales para la identificación de microorganismos en el laboratorio clínico: MALDI Biotyper® (Bruker Daltonics®, Germany) y VITEK® MS (bioMérieux, France). Ambos equipos han demostrado obtener resultados confiables para la mayoría de las especies de levaduras de importancia clínica.

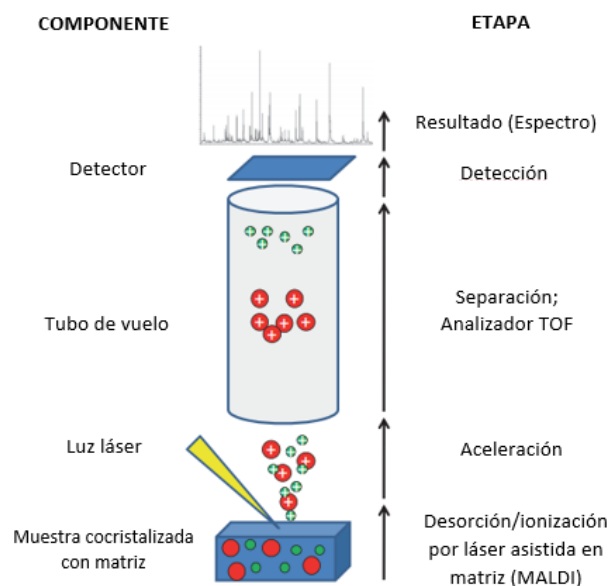
La muestra (cultivo de la levadura en estudio) se deposita sobre una placa metálica que contiene una matriz, tiene 96 pocillos, luego la placa metálica se ingresa al espectrómetro de masas donde es bombardeada por pulsos de luz láser para producir la desorción e ionización de las moléculas que son aceleradas por medio de un campo electrostático.

En el analizador TOF, los iones más pequeños viajan más rápido que los iones más grandes, son detectados, se produce un espectro que resulta específico para cada analito. Este resultado se compara con una base de datos para la identificación de género y especie.

Los resultados quedan registrados en la computadora asociada al equipo y una vez finalizada la prueba se imprime el informe con la identificación del microorganismo.



Equipo Maldí-TOF MS



Proceso de desorción/ionización

Enfermedades provocadas por levaduras del complejo *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii*

Criptococosis

La criptococosis es una micosis sistémica causada por las especies del complejo *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii*.

El agente etiológico aislado con mayor frecuencia es *C. neoformans*, aunque *C. gattii* también ha sido aislado en distintas especies de animales y en personas.

Estas dos especies tienen nichos ecológicos diferentes. *C. neoformans* presenta una distribución mundial, aislándose habitualmente del guano de palomas y aves; mientras que *C. gattii* se localiza en zonas con clima tropical/subtropical, aislándose principalmente de materia vegetal de algunas especies de árboles. El hongo ingresa al organismo tras la inhalación de los propágulos de las levaduras presentes en el medio ambiente.

Las razas caninas dóberman, pinscher, pastor alemán, cocker spaniel americano, gran danés y labrador son las más susceptibles de contraer esta micosis.

En gatos es más frecuente en pacientes con leucemia felina.

Patogenia. Signos y síntomas

En general el hongo ingresa al hospedero vía inhalatoria, la infección puede pasar desapercibida ya que se manifiesta como un cuadro respiratorio leve, limitado a las vías aéreas superiores, con rinitis, estornudos. Si el paciente es normocompetente, resuelve sin dejar secuelas.

El hongo es pantrópico, disemina por sangre, tiene afinidad por numerosos órganos y tejidos, se acantona en próstata, y a partir de allí puede liberarse al torrente sanguíneo.

En ocasiones las lesiones hacen foco en la piel, y se observan pápulas que se ulceran y muestran un fondo oscuro, gelatinoso a partir del que es posible recuperar al hongo.

Criptococosis en felinos

La vía de infección más frecuente es por inhalación, aunque también puede producirse a través de heridas por mordeduras o arañazos. Luego del ingreso por la vía inhalatoria, la rinitis es el signo clínico más frecuente, se produce una descarga continua que puede ser serosa al inicio y progresa a mucosa, purulenta conforme avanza la enfermedad.

En algunos pacientes la evolución suele ser crónica y, en el 70 % de los casos la cavidad nasal puede deformarse por la presencia de granulomas. Puede haber invasión de los pulmones y tos. Cuando el hongo llega a senos paranasales y sistema nervioso central (SNC) hay pérdida de la coordinación, depresión, ataxia.

En el caso de que el hongo afecte el ojo, se observa ceguera. Pueden presentar fiebre.

Las manifestaciones cutáneas consisten en formación de nódulos que se ulceran y exudan material purulento, viscoso, de consistencia gelatinosa. Las lesiones cutáneas suelen localizarse en la región supraorbitaria, nasal, en pabellón auricular.

Criptococosis en caninos

La vía de infección más frecuente es la inhalatoria. Generalmente el 50 % de los perros suelen presentar afección de las vías respiratorias altas, pero la rinosinusitis suele ser subclínica y, por lo tanto, la sintomatología respiratoria suele pasar desapercibida. La diseminación multiorgánica es más frecuente en perros que en gatos. Se produce una rápida diseminación a SNC, por lo que la sintomatología nerviosa es muy frecuente (pérdida de la coordinación, depresión, parálisis facial, ataxia). También suelen aparecer alteraciones oculares. Algunos perros pueden presentar fiebre. Suele causar rinitis y puede posteriormente afectar pulmones, senos paranasales y sistema nervioso central. Puede causar granulomas subcutáneos.

Diagnóstico de laboratorio

Examen directo: a partir del aspirado obtenido de ganglios inflamados o del líquido cefalorraquídeo (LCR), biopsias, exudados nasales o cutáneos y sedimento urinario se centrifuga el material y con una alícuota del sedimento se realiza una observación microscópica con tinta china lo que permite visualizar a la levadura capsulada.

Procedimiento:

Colocar una gota del LCR u otro líquido biológico sobre un portaobjetos limpio y desengrasado.

Agregar sobre la muestra una gota de tinta china diluida con agua destilada estéril 1:1, homogeneizar (si es necesario), y colocar un cubreobjetos.

Observar de inmediato al microscopio óptico con objetivos de bajo y mediano aumento.

Interpretación:

Se visualiza la levadura rodeada de su cápsula (6-20 μm de diámetro) sobre un fondo oscuro. (Foto 5).

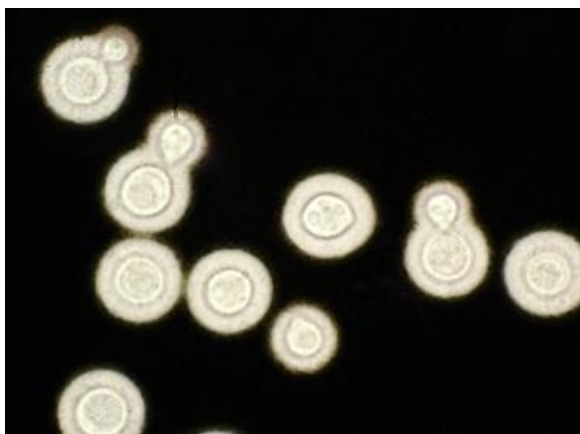


Foto 5. Tinta china, levaduras capsuladas, 6-20 μm , 40 X

Tinciones: el material de biopsias puede ser teñido con Mucicarmin de Meyer, cápsula de *Cryptococcus* toma color carmín, fucsia, de aspecto estrellado. (Foto 6).

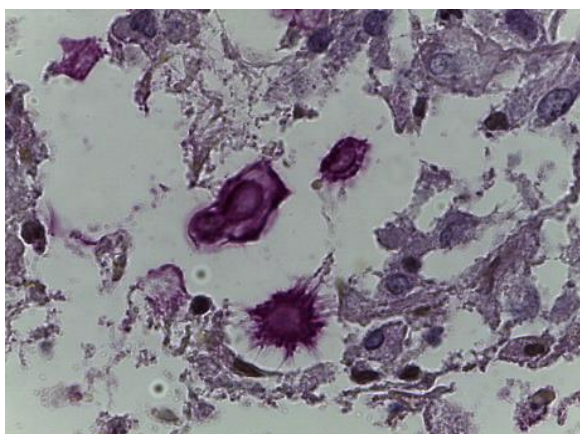


Foto 6. Tinción Mucicarmin de Meyer.
La cápsula de *C. neoformans* toma color fucsia, aspecto estrellado

- **Determinación del antígeno capsular:** se realiza mediante la técnica de aglutinación en látex en muestras de suero o del LCR. También puede realizarse en otros fluidos corporales como la orina, líquido pleural o lavado bronco alveolar.

- **Aislamiento e identificación:** a partir de las biopsias o aspirados de tejidos y ganglios, exudado nasal, LCR, orina y líquidos biológicos. Cuando se realiza a partir de muestras de la cavidad nasal, la interpretación de resultados debe realizarse con precaución ya que existe portación nasal de propágulos sin valor patológico. Se utilizará agar Sabouraud que permiten el crecimiento de las distintas especies de levaduras.

Producción de fenol-oxidasa (para identificación de *C. neoformans*/*C. gattii*) en Agar semillas de girasol

Se usa el medio agar semillas de girasol, es equivalente al de ácido cafeico o al de semillas de Niger (Staib). *C. neoformans* y *C. gattii* son las únicas dos especies dentro del género *Cryptococcus* con capacidad para producir a la enzima fenoloxidasa y la liberan al medio. La fenoloxidasa cataliza la oxidación de sustratos difenólicos precursores de la melanina y que están presentes en las semillas de girasol, se genera un pigmento marrón, las colonias toman color café o color dulce de leche cuando se incuban a temperatura ambiente. (Foto 7).

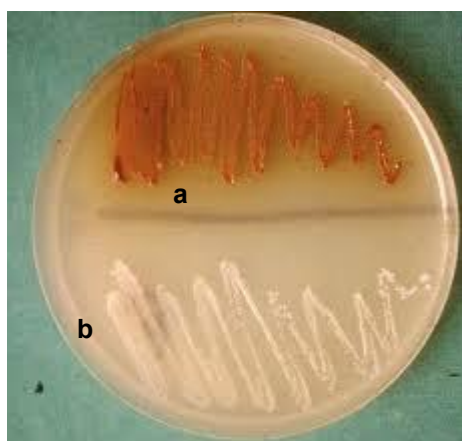
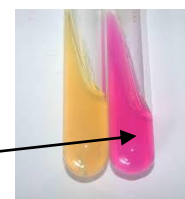


Foto 7. Agar semillas de girasol:
a-*C. neoformans*, b- *Candida albicans*

Producción de ureasa:

Las especies del género *Cryptococcus* producen ureasa y la liberan al medio. La prueba es positiva cuando el color del medio vira al rosa fucsia.



Diferenciación presuntiva de *C. neoformans* de *C. gattii*

Medio canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB)

La prueba se fundamenta en la particularidad que presenta *C. gattii* de ser resistente a la L-canavanina. Esta especie degrada a la canavanina y se libera amonio como compuesto final. El amonio en el medio eleva el pH, que pasa de 5,8 a 7 o más, virando de amarillo verdoso a un azul de cobalto, por la presencia de azul de bromotimol en la composición del medio de cultivo.

La L-canavanina, inhibe el crecimiento de *C. neoformans*, y el medio de cultivo permanece sin cambio el color. En cada ensayo se debe incluir un control (+) y (-). Foto 8 a y b).

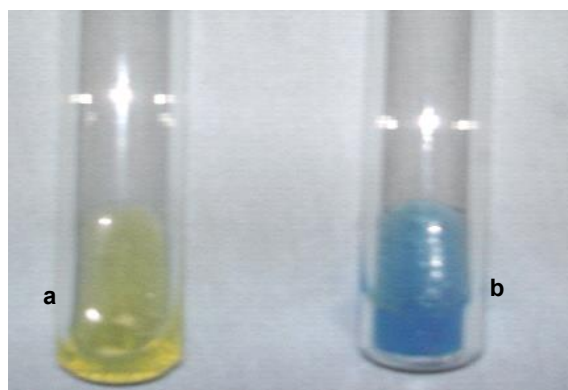


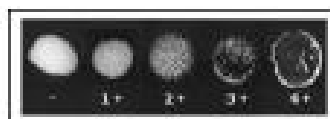
Foto 8. Medio Canavanina-glicina-azul de bromotimol. a-*C. neoformans* no desarrolla, el medio de cultivo no presenta variación en el color. a-*C. gattii* desarrolla y vira el medio de cultivo al color azul.

Serología

La Organización Mundial de la Salud recomienda el diagnóstico precoz mediante el uso de anfigeno de *Cryptococcus* (CrAg) ya sea por aglutinación de partículas en látex o con el reactivo Lateral Flow.



Lateral Flow



Látex



Aglutinación en látex

Técnicas moleculares para identificar a *Cryptococcus* sp.

Las pruebas moleculares se usan para la identificación de las especies del complejo *C. neoformans/C. gattii*, ya que son indiferenciables por el estudio de la micro o macromorfología.

Las técnicas que se usan son la PCR con iniciadores universales como el M13, (GACA)₄ y (GTG)₅, el análisis del polimorfismo en longitud de fragmentos amplificados (AFLP), el análisis del polimorfismo en longitud de fragmentos de restricción (RFLP) de los genes URA5 y PLB1 y

la tipificación de secuencias multilocus (MLST) empleando siete genes conservados (CAP59, GPD1, LAC1, PLB1, SOD1, URA5 y la región IGS1].

Con estas pruebas fue posible determinar los siguientes genotipos:

- Para *C. neoformans* var *grubii*, los genotipos VNI/AFLP1, VNII/ VNIB/AFLP1A, VNII/AFLP1B.
- Para *C. neoformans* var. *neoformans*, los genotipos VNIV/AFLP2.
- Para el híbrido *C. neoformans* AD, el genotipo VNIII/ AFLP3.
- Para *C. gattii* serotipo C, los genotipos VGI/ AFLP4, VGII/AFLP6, VGIV/AFLP10.
- Para *C. gattii* serotipo B el VGIII/ AFLP5 y VGIV/AFLP7.

Infecciones causadas por *Malassezia* spp

Las levaduras de género *Malassezia* forman parte de la biota de la piel en los animales de sangre caliente, particularmente de las áreas ricas en glándulas sebáceas.

El género *Malassezia* pertenece al Filo *Basidiomycota*, orden *Malasseziales*. Las características del Género son:

- a) Producen y liberan ureasa al medio.
- b) Tinción positiva con azul B de diazonium.
- c) Son lípido-dependientes a excepción de *M. pachydermatis*.
- d) La temperatura de desarrollo varía de acuerdo a la especie en estudio (30 °C a 37 °C).
- f) No fermentan la glucosa.
- h) No se conoce fase sexual.

Morfología general

Las levaduras son de forma variable: esféricas, ovoides o cilíndricas, el brote emerge sobre un cuello ancho, semejan una raqueta o palo de bowling. Es posible que varias especies co-existan en individuos sanos, así como en los enfermos.

La identificación definitiva se hace con técnicas de biología molecular. Los métodos fenotípicos no son confiables.

El género *Malassezia* comprende 18 especies, algunas son especie-específico, y otras pueden ser agentes de infecciones zoonóticas. En la tabla se listan las principales especies descritas que afectan a los animales y las especies responsables de infecciones zoonóticas.

En la siguiente tabla se listan las especies de *Malassezia* que afectan a animales y a las personas.

Especie de <i>Malassezia</i>	Hospedador
<i>M. brasiliensis</i> y <i>M. psittaci</i> , Cabañes y col., 2016.	Loros.
<i>M. caprae</i> , Cabañes y Boekhout, 2007.	Caprinos, equinos.
<i>M. cuniculi</i> , Cabañes y Castella, 2011.	Conejos.
<i>M. equina</i> , Cabañes y Boekhout, 2007.	Equinos, bovinos.
<i>M. furfur</i> , (Robin) Baillon, 1889.	Bovinos, elefantes, monos, avestruz, personas.
<i>M. globosa</i> , Midgley y col., 1996.	Felinos salvajes, bovinos, personas.
<i>M. nana</i> , Hirai y col., 2004.	Gatos, perros, bovinos.
<i>M. pachydermatis</i> , (Weidman) Dodge, 1925.	Perros, gatos.
<i>M. slooffiae</i> , Guillot y col., 1996.	Cerdos, ovinos, caprinos, personas.
<i>M. sympodialis</i> , Simmons y Gueho, 1990.	Equinos, cerdos, ovinos, personas.
<i>M. vespertilionis</i> , Lorch y col., 2018	Murciélagos.

Patologías causadas por *Malassezia* sp.

Las levaduras del género *Malassezia* pueden causar enfermedades de la piel como la dermatitis seborreica, foliculitis, otitis, dermatitis atópica y blefaritis seborreica. Las especies aisladas con mayor frecuencia son *M. pachydermatis* en caninos y *M. slooffiae* en cerdos y corderos. Mientras que, en las personas las especies que prevalecen son *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. furfur*.

Algunas especies de *Malassezia* se comportan como agentes de infección zoonótica. Hay reportes de la participación de *M. pachydermatis* como causante de infección sistémica en neonatos de humanos con bajo peso al nacer. Esta condición está asociada al contacto del personal de salud con mascotas caninas que se encuentran como portadores o padeciendo infección por *M. pachydermatis*. Esta levadura forma parte de la biota de la piel de los perros, en el conducto auditivo externo, y de los sacos anales.

Por otra parte, *M. slooffiae* causa lesiones cutáneas en trabajadores rurales cuyas labores se desarrollan en contacto con cerdos o corderos.

En medicina veterinaria, si bien *Malassezia* es agente de enfermedad, la infección se produciría en forma secundaria a otras infecciones o patologías tales como endocrinopatías, seborreas primarias idiopáticas (p. ej en cocker), dermatitis por contacto, etc. Puede estar asociada a infecciones por *Staphylococcus* spp.

Las razas más afectadas son cocker, basset hound, blood hound, labrador, retriever dorado, terrier, ovejero alemán.

Diagnóstico de laboratorio

Toma de muestra:

Para las lesiones cutáneas, se realiza un raspado de la lesión, de preferencia de la periferia. Se pueden utilizar dos portaobjetos estériles, uno para raspar y el otro para recibir las escamas o bien se puede coleccionar la muestra en una caja de Petri estéril. Otra opción es tomar la muestra de escamas de piel con bisturí estéril, previamente flameado para quitarle el filo.

Para tomar material de conducto auditivo (otitis), la muestra se toma con hisopo estéril humedecido con solución salina estéril.

Observación microscópica:

Sobre el portaobjetos limpio y desengrasado se coloca la muestra, se le agrega una gota de OHK 10-40 %. Puede usarse azul de algodón o tinta azul de marca Parker para dar contraste a la estructura fúngica.

En escamas obtenidas a partir de lesiones de piel, la observación de las estructuras parasitarias es diagnóstica de esta enfermedad. Las levaduras son esféricas de 2-8 μm de diámetro, agrupadas, asociadas con hifas de 10-25 μm de largo y 2-5 μm de ancho, las hifas pueden estar alineadas o ramificadas.

Macromorfología

Cultivos: las especies de *Malassezia* son lípido y temperatura dependientes. El desarrollo en el cultivo no siempre se logra ya que son levaduras muy exigentes por lo que no es un procedimiento que se realice de rutina en el laboratorio clínico.

M. pachydermatis es la única especie de *Malassezia* no lípido-dependiente, puede aislarse y mantenerse en medios de cultivo convencionales como el Agar dextrosa Sabouraud. Las colonias son elevadas, convexas, pálidas, con una superficie lisa de textura suave, color crema, pero se han reportado aislamientos rosados.

Para las especies lípido-dependientes se usa el medio de cultivo agar Dixon modificado, las colonias son secas, rugosas, granulares.

Micromorfología

Las células de *M. pachydermatis* son pequeñas, de 2-2,5 X 4,0-5,0 μm , la base de la gemación es ancha. (Foto 9 a y b).

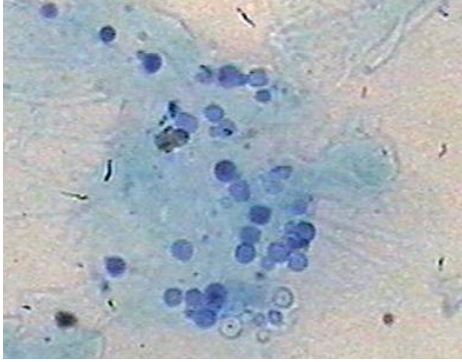
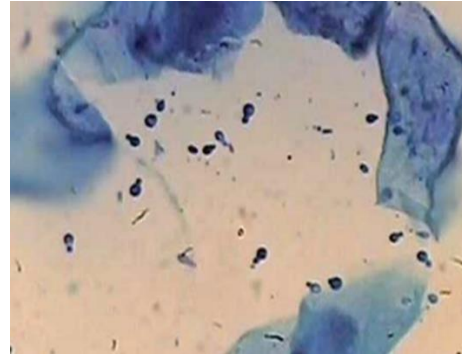


Foto 9. a. Micromorfología de *Malassezia* sp., en escamas de piel.



9. b. Micromorfología de *Malassezia pachydermatis*. Levaduras monobrotantes, unipolar.

Algoritmo de identificación presuntiva de levaduras

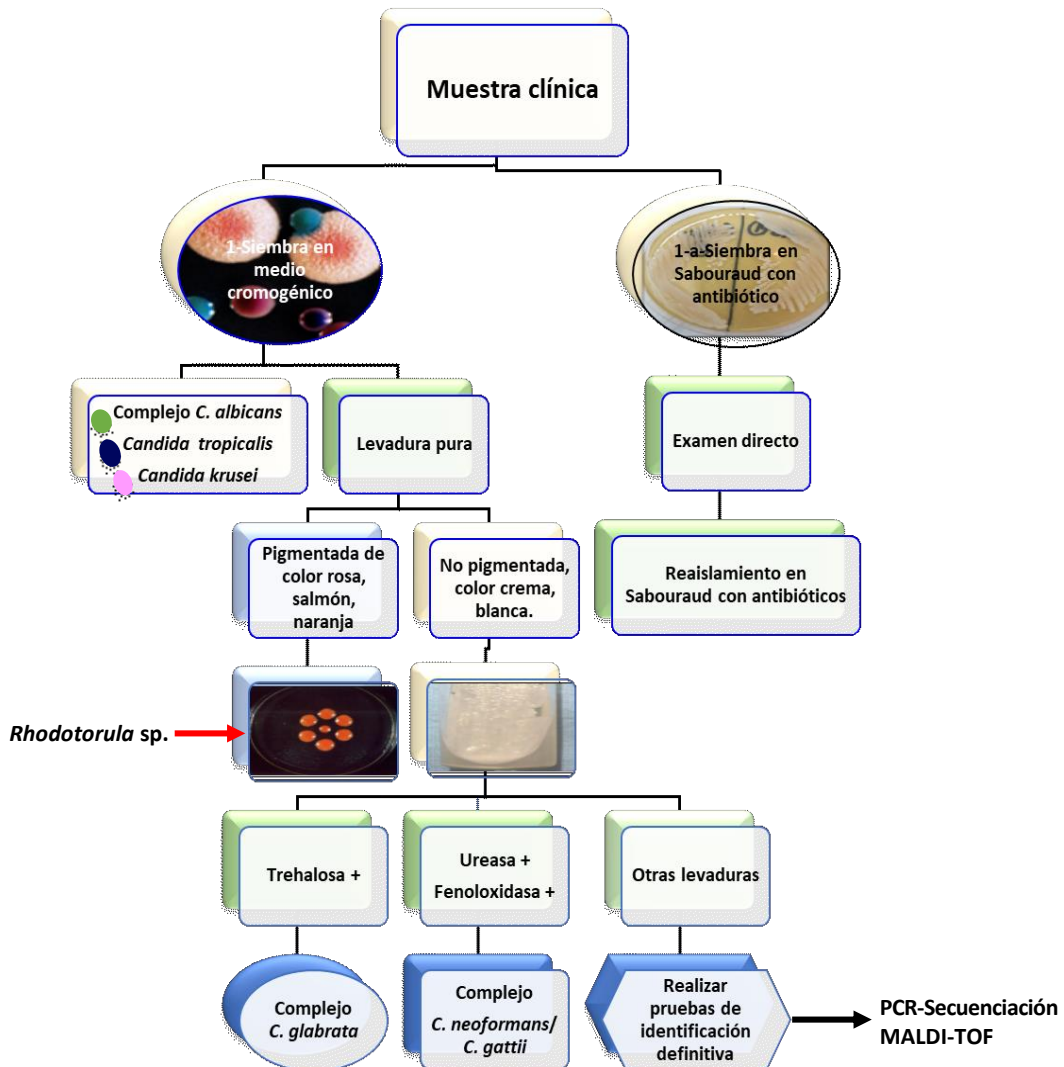


Figura. 2: 1- Siembra de la muestra en un agar cromogénico (contiene antibiótico) permite en 24-48 h la visualización de las colonias puras. La presencia de distintos colores permite evidenciar más de una especie de levaduras en un mismo cultivo y la identificación presuntiva de complejo *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei*. 1-a-Es conveniente realizar, además, una siembra en Sabouraud con antibióticos, observar si el cultivo está puro, en caso de presentar contaminación bacteriana realizar un reaislamiento en medio con antibióticos.

Si desarrollan levaduras no pigmentadas, color crema, blancas, y no se cuenta con agar cromogénico para identificar presuntivamente a las levaduras del complejo *C. albicans*, se puede realizar la prueba del tubo germinativo según el algoritmo que muestra la figura 3.

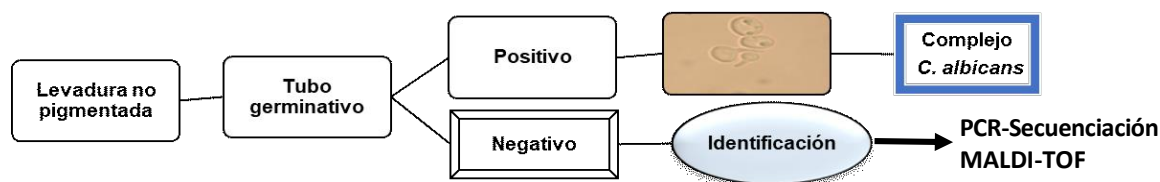


Figura 3: Algoritmo propuesto para identificar levaduras.

Glosario

Artrospora (artroconidio): espora asexual formada directamente por división y transformación de una hifa.

Baside/basidios: célula especializada de los *Basidiomycota* en la cual se originan las basidiosporas exógenas.

Basidiomycota: gran división de hongos que se distinguen por hifas tabicadas, a menudo grandes, con frutos y esporos que nacen en un característico basidio de forma de clava (hongos de sombrero).

Basidiospora: esporas resultantes de la reproducción sexual que se producen externamente sobre una estructura denominada basidio, que se forma a partir de un micelio dicariótico con fíbulas. Los basidios por su parte también pueden estar contenidos dentro de cuerpos fructíferos denominados basidiocarpos.

Blastospora (blastoconidios): célula fúngica que se forma como consecuencia de un proceso de gemación, por ej. células de levadura.

Clamidospora (clamidoconidio): elemento de resistencia formada por la diferenciación directa del micelio, con pared celular gruesa y citoplasma concentrado. Su diámetro es mayor que el de los filamentos en los que se forma.

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

Gemación: proceso reproductivo asexual característico de hongos unicelulares o esporos que involucra la formación de crecimientos externos laterales desde la célula madre para formar nuevas células.

Hifas: filamentos que forman el tallo o cuerpo de un hongo.

Seudohifas: hifa no verdadera; habitualmente se refiere a blastoconidias elongadas. Formadas por determinadas levaduras, que se diferencian de una hifa, por la presencia de estrangulamientos, en lugar de verdaderos septos.

Vegetativo: referido a hifas que se extienden hacia el sustrato que constituyen la porción que absorbe alimentos de un hongo.

Referencias

- Córdoba S. (2006). *Criptococcosis: una zoonosis emergente?* Acta Bioquímica Latinoamericana. ISSN 0325-2957 pp.93.
- Córdoba SB, Della Vedova R, Gornatti Churria CD, Reinoso EH. (2019). *Criptococcosis* En: Microbiología Veterinaria. Editor Jefe Néstor Oscar Stanchi 3º Edición Editorial Inter-Médica. ISBN 978-950-555-321-1. <http://www.intermedica.com.ar>.
- Della Vedova R, Gornatti Churria C D, Córdoba SB, Reinoso EH. (2019). *Candidiasis* En: Microbiología Veterinaria. Editor Jefe Néstor Oscar Stanchi 3º Edición Editorial Inter-Médica. ISBN 978-950-555-321-1. <http://www.intermedica.com.ar>.
- Guía de T.P. Cátedra de Micología Médica e Industrial “Prof. Dr. Pablo Negroni”. Año 2019. Carrera de Microbiología. F.C.V., UNLP.
- Kurtzman CP, Fell JW. *The yeast, a taxonomic study*. 5th ed. Amsterdam: Elsevier; 2011.
- Reagan KL, Dear JD, Kass PH, Sykes JE. (2019). Risk factors for Candida urinary tract infections in dogs and cats. J Vet Intern Med. 33(2):648-653. doi: 10.1111/jvim.15444.
- Taverna CG, Bosco-Borgeat ME, Mazza M, Vivot ME, Davel G, Canteros CE (2020). *Frequency and geographical distribution of genotypes and mating types of Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii species complexes in Argentina*. Rev Argent Microbiol. pii: S0325-7541(19)30088-4. doi: 10.1016/j.ram.2019.07.005.
- Taverna CG, Mazza M, Bueno NS, Alvarez C, Amigot S, Andreani M, Azula N, Barrios R, Fernández N, Fox B, Guelfand L, Maldonado I, Murisengo OA, Relloso S, Vivot M, Davel G. (2019). *Development and validation of an extended database for yeast identification by MALDI-TOF MS in Argentina*. Med Mycol. 1;57(2):215-225. doi: 10.1093/mmy/myy021.

CAPÍTULO 5

Micosis superficiales

Romina Della Vedova, Diana E. Rosa

Hasta ese momento, los hongos habían sido siempre -al menos para mí- objetos curiosos que aparecían en los dibujos para niños y que relacionaba con los bosques y los duendes. En todo caso, nada parecido a esa rugosidad que daba a la uña de mi madre la textura de una ostra.

Guadalupe Nettel. EL MATRIMONIO DE LOS PECES ROJOS. (2013)

Las micosis superficiales son infecciones causadas por hongos que afectan a la piel, uñas, el manto piloso y las mucosas.

Las dermatofitosis, la candidiasis y las malasseziosis son las micosis superficiales de presentación más frecuente en todo el mundo y son la causa de importantes pérdidas económicas.

Estas patologías son de importancia en salud por el carácter zoonótico que manifiestan las infecciones causadas por hongos dermatofitos y por algunas especies de *Malassezia*.

Micosis superficiales

Las micosis superficiales son lesiones causadas por hongos de micelio filamentoso tabicado hialino, que se localizan sobre la capa córnea de la piel y faneras de los animales.

Clasificación

Según el tejido o el sitio blanco de infección, las micosis superficiales se clasifican en:

Queratinomicosis:

- a. **Dermatofitosis:** son lesiones causadas por hongos queratinolíticos (dermatofitos) sobre la capa córnea de la piel y sus faneras (plumas, cornamenta, pelos, cascos, pezuñas). Los géneros *Microsporum*, *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Nannizzia*, *Lophophyton* son los agentes más frecuentes de dermatofitosis en personas y animales.
- b. **Dermatomicosis:** son lesiones de la capa córnea de la piel, o mucosas, causadas por levaduras del género *Candida* o *Malassezia* (no dermatofitos).

Dermatofitos

En general, los hongos dermatofitos son parásitos absolutos, aunque en algunos animales, p. ej. en los gatos, pueden vivir saprofiticamente sobre la piel y pelos. Los dermatofitos pueden proliferar sobre detritus queratínicos (escamas de piel, pelos) depositados sobre el suelo, sobre cercos de corrales, en criaderos y en parques.

Este grupo de hongos se transmite del enfermo o del portador al sano, por contagio directo o indirecto, producen lesiones poco inflamatorias y benignas, pero contagiosas, originan brotes o focos epidémicos en familias, escuelas, asilos, criaderos de animales, majadas, rebaños, etc.

Los dermatofitos tienen un micelio filamentosos hialino con septos, forman artroconidios que se depositan sobre el estrato córneo y germinan produciendo micelio vegetativo con capacidad para liberar exoenzimas, como las proteasas y fosfolipasas, las que facilitan su adaptación al parasitismo.

Fuentes de infección

La mayoría de los hongos dermatofitos se encuentran en la naturaleza, solo unos pocos se mantienen asociados a su hospedero.

Causas predisponentes

La edad, el sexo, condiciones higiénico-ambientales y alteraciones del estado general (metabólicas, inmunológicas, traumáticas) del individuo son algunas de las causas más comunes que favorecen la aparición de las dermatofitosis (tiñas), tanto en los animales como en las personas.

La invasión sobre el estrato córneo se ve favorecida por la humedad, deficiencia de ácidos grasos, otros componentes de la piel y defectos de pH. Además, ciertas condiciones del hospedador como obesidad, piel macerada, inmunodepresión y diabetes favorecen la aparición de las dermatofitosis en las capas superficiales.

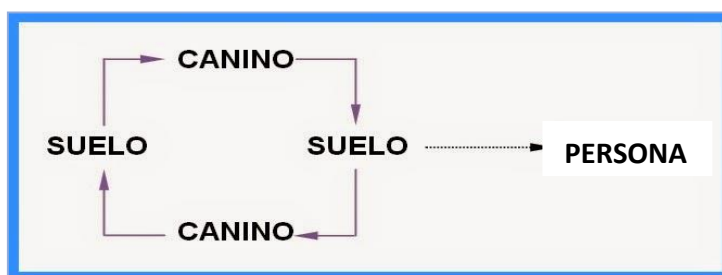
Puertas de entrada

El ingreso al organismo del hospedador puede ser por:

- **Contacto directo:** animal x animal, persona x animal, persona x persona.

Pese a la importancia del contagio directo, parece ser más importante el contacto con objetos inanimados como: camas, arneses, cepillos, peines, peladoras u otros elementos; así, algunas células fúngicas pueden permanecer viables durante cinco a siete años sobre objetos inanimados.

- **Contacto indirecto:** Suelo x animal, fomites x animal, etc.



Clasificación taxonómica de los hongos dermatofitos

Se consideran 8 géneros:

- *Arthroderma* (21 especies),
- *Epidermophyton* (1 especie),
- *Guarromyces* (1 especie),
- *Lophophyton* (1 especie),
- *Microsporum* (3 especies),
- *Nannizzia* (9 especies),
- *Paraphyton* (3 especies).
- *Trichophyton* (16 especies).

Sobre la base de su hábitat natural y especificidad de hospedero se los clasifica en:

- **Antropofílicos:** infectan a personas y en raras ocasiones a animales.
- **Zoofílicos:** son patógenos para animales, pero pueden infectar a personas.
- **Geofílicos:** habitan en el suelo y sirven de fuente de infección tanto para las personas como para los animales.

Tabla 1-Agentes etiológicos de hallazgo más frecuente. Clasificación según la fuente de infección

Antropofílicos	Geofílicos	Zoofílicos
<i>Epidermophyton floccosum</i> <i>Microsporum audouinii</i> <i>Trichophyton interdigitalis</i> <i>Trichophyton rubrum</i> <i>Trichophyton schoenleinii</i> <i>Trichophyton tonsurans</i> <i>Trichophyton violaceum</i>	<i>Nannizzia gypsea</i> (ex <i>Microsporum gypseum</i>) <i>Nannizzia nana</i> <i>Nannizzia persicolor</i>	<i>Microsporum canis</i> <i>Arthroderma benhamiae</i> <i>Trichophyton equinum</i> <i>Trichophyton mentagrophytes</i> <i>Trichophyton verrucosum</i> <i>Lophophyton gallinae</i>

Fisiopatología de las infecciones por dermatofitos

Para que ocurra la invasión del estrato córneo de la piel por dermatofitos deben ocurrir los siguientes eventos:

- Contacto y adherencia de las arthroconidias a los corneocitos.
- Germinación de las arthroconidias.
- Penetración del estrato córneo por los tubos germinativos.
- Formación de nuevas arthroconidias dentro de las células.

Las arthroconidias originan nuevos tubos germinativos que crecen y se ramifican dentro de la capa córnea engrosada dando lugar a un micelio fúngico dentro de ella. Son hongos queratofílicos con capacidad de metabolizar la queratina de la capa córnea y de esa forma desarrollan sobre los tejidos queratinizados.

Condiciones que favorecen el desarrollo de los dermatofitos

- La epidermis está compuesta por células muertas carentes de mecanismos de defensa inmune y lejos de los tejidos con capacidad de respuesta inflamatoria.
- La piel está bien hidratada por secreción ecrina y perspiración.
- Temperatura más baja, pH 5.5-6.7, aerobiosis.

Hay determinadas localizaciones anatómicas que son favorecedoras para que ocurra la invasión por dermatofitos, p. ej. espacios interdigitales y pliegues.

Condiciones que no favorecen el desarrollo de dermatofitos

1. Presencia de células de Langerhans.
2. Fagocitosis por queratinocitos.
3. Propiedades inhibitorias del suero.
4. Composición de los lípidos de la superficie cutánea.
5. Cantidades elevadas de CO₂.

Diagnóstico

Pasos a seguir:

1. Diagnóstico clínico presuntivo.
2. Preparación previa del paciente.
3. Toma de muestra.
4. Conservación de la muestra (se mantendrán a temperatura ambiente, en recipientes de boca ancha, cerrados, secos, protegidos de la humedad).
5. Remisión de la muestra a Micología (deberá realizarse siguiendo las normas de Bioseguridad y en el menor tiempo posible a partir del momento de toma de la muestra). Debe estar acompañada de la historia clínica.
6. Procesamiento de la muestra (se seguirán los protocolos de rutina).
7. Observación microscópica en fresco con: HOK al 10-40 %.
8. Cultivos en Agar Sabouraud, Lactrimel + antibiótico y antimicóticos (ver anexo medios de cultivo).
9. Incubación a 28 °C no menos de 3 semanas.
10. Informe.

Preparación previa del paciente

- La lesión debe estar libre de toda medicación, evitar el uso de pomadas, talcos y jabones.
- La piel debe estar limpia para disminuir la biota contaminante asociada.
- Suspensión de toda medicación antifúngica oral y tópica durante la semana previa a la toma de muestras.

Toma de muestra

Pelo: se procederá a extraer los pelos con pinza estéril. Si la depilación causa dolor, los pelos se cortarán con tijera.

Escarificación: las escamas de piel se colectarán mediante raspado con bisturí estéril y con la hoja previamente flameada para quitar el borde filoso. Se raspará la periferia de la lesión el crecimiento del hongo es centrífugo (de adentro hacia afuera).

Método de la cinta adhesiva: se colocará un trozo de cinta adhesiva sobre la lesión, luego se depositará sobre un portaobjetos limpio y desengrasado al que previamente se le colocó una gota de OHK al 10-40 % o de azul de metileno al 1 %.

Diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico de las dermatofitosis se basa en:

1. Observación microscópica directa en fresco.
2. Cultivo.

1. Observación microscópica directa en fresco

El material proveniente de piel, pelos (material queratínico en general) se coloca sobre un portaobjetos limpio y desengrasado, se agrega OHK 40 % y se calienta suavemente sobre la llama veladora del mechero Bunsen hasta emisión de vapor (no debe ebulir). Colocar un cubreobjetos y observar luego de 5 -15 minutos (10 X - 45 X aumentos).

Otra opción consiste en colocar sobre el portaobjetos el material biológico + lactofenol + cubreobjetos. Observar luego de 30 o 60 minutos (10 X - 45 X aumentos).

En escamas de piel y uñas: se pueden observar filamentos hialinos de 4-5 μm de diámetro, ramificados y tabicados, también artrosporados. (Foto 1).



Foto 1. Escamas de piel con OHK 20 %. Micelio artrosporado, hialino, compatible con hongos dermatofitos.

En pelos: los dermatofitos atacan el pelo invadiéndolos por fuera (Ectotrix), por debajo de la epidérmica (Endotrix), o una combinación de ambas.

De acuerdo a su tamaño, las artrosporas son clasificadas como microides ($< 5 \mu\text{m}$) y megasporadas ($> 5 \mu\text{m}$). (Foto 2).

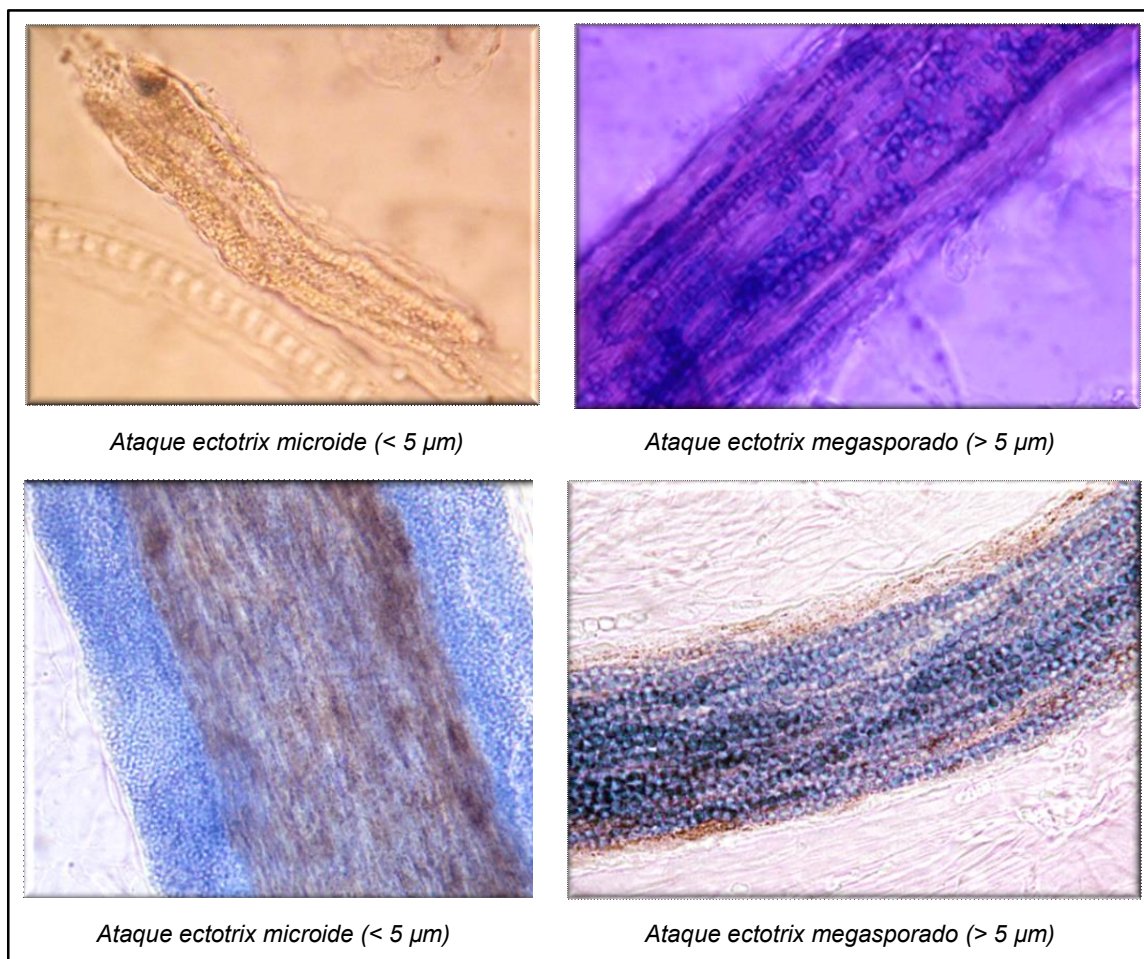


Foto 2. Observación directa en fresco con OHK 20 % de pelos atacados por dermatofitos. 40 X

2. Cultivo

Los agentes de las micosis superficiales desarrollan a temperatura de 28-30 °C.

Los medios de cultivo de elección son:

- Agar papa glucosa.
- Agar Sabouraud + antibiótico.
- Dermatofito Test Medium (D.T.M).
- Lactrimel (Leche, harina, miel).
- Agar Sabouraud + antibiótico + cicloheximida.
- Medio de arroz.

Microcultivos:

se realizan cuando es necesario observar la normal disposición del micelio de fructificación sobre el sustrato sólido del medio de cultivo. Permite estudiar la forma en que el hongo se reproduce mediante la multiplicación de sus conidios o alguna estructura fúngica en particular.

Macromorfología

Se debe registrar el color de la colonia, anverso, reverso, textura, forma, elevación, margen o borde, producción de pigmento con o sin liberación al medio, velocidad de crecimiento, etc.

Micromorfología

Se hace disgregado del material para observar la morfología, tamaño, agrupación de las conidias. El micelio vegetativo es hialino, tabicado, con hifas en raqueta, pectinadas, espiraladas, cuerpos nodulares, candelabros fávicos, clamidosporos, etc.

Pruebas fisiológicas:

Se usan la prueba de ureasa, requerimientos nutricionales, perforación del pelo "in vitro", tolerancia a altas temperaturas, prueba de producción de pigmentos, etc.

Breve descripción de los agentes etiológicos más frecuentes

Género *Microsporum*

Descripción del género

Presencia de macro y microconidias solas o en racimos en el final o a un lado de la hifa.

Las macroconidias emergen en grupos en ángulos agudos, 2 a muchas células, paredes delgadas a gruesas, equinuladas a rugosas, con forma de huso o cigarro, hialinas.

Las microconidias tienen 1 célula, lisa y de paredes delgadas, hialinas, ovoides a clavata, solitarias. El crecimiento de las colonias varía de rápido a lento, algodonosa a glabra, pulverulenta, amarilla, a veces con tintes marrones, reverso color crema, o amarillento.

Patogenicidad

Afectan pelo y piel de animales. El ataque al pelo es ectotrix.

Son micosis zoonóticas, en las personas pueden causar tinea capitis, barbae, corporis.

Diagnóstico diferencial

Difiere de las especies de los géneros *Trichophyton* y *Epidermophyton* por tener macroconidias rugosas o equinuladas.

Principales especies patógenas

1. *Microsporium canis*
2. *Nannizzia gypsea* (ex *Microsporium gypseum*)

Microsporium canis

Macromorfología

En agar papa, agar Sabouraud, los cultivos incubados a 28 °C las colonias desarrollan en 7-21 días. El anverso de la colonia es blanco, velloso, a veces algodonoso, el reverso de la colonia presenta pigmento amarillo ocre, a veces verdoso. (Foto 3).



Foto 3. *Microsporium canis*. Cultivo en agar papa, 28 °C, 21 días. Presencia de pigmento amarillo

La pteridina es un metabolito presente en *Microsporium canis*, al iluminar con lámpara de Wood produce fluorescencia (+) color amarillo-verdoso.

Micromorfología

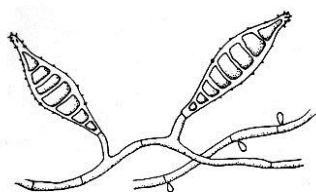


Foto 4 a. Esquema de *Microsporium canis*



4 b. Micromorfología de *Microsporium canis*. Las flechas indican a los macroconidios con paredes gruesas y rugosas.

Forma macroconidios equinulados, miden 40-60 μm de largo, son de paredes gruesas, extremos aguzados, con 4-6 tabiques que dan lugar a 8-12 células, fusiformes. Forma escasos microconidios con forma de clava, sin septos, son sésiles, emergen directamente de la hifa. (Foto 4).

Patogenicidad

Produce tiña en animales jóvenes y en personas, principalmente en niños. Es frecuente en perros, gatos, caballos, aunque también infecta conejos, monos, cerdos, ratas y ratones.

Género *Nannizzia*

Con base en los estudios de ADN, el dermatofito conocido como *Microsporium gypseum* fue re clasificado y en la actualidad se denomina *Nannizzia gypsea*.

Micromorfología

En agar papa, agar Sabouraud, la colonia tiene bordes desflecados, aspecto yesoso, pulverulento, el anverso de la colonia es color canela, el reverso con pigmento amarillo, tanino. (Foto 5).

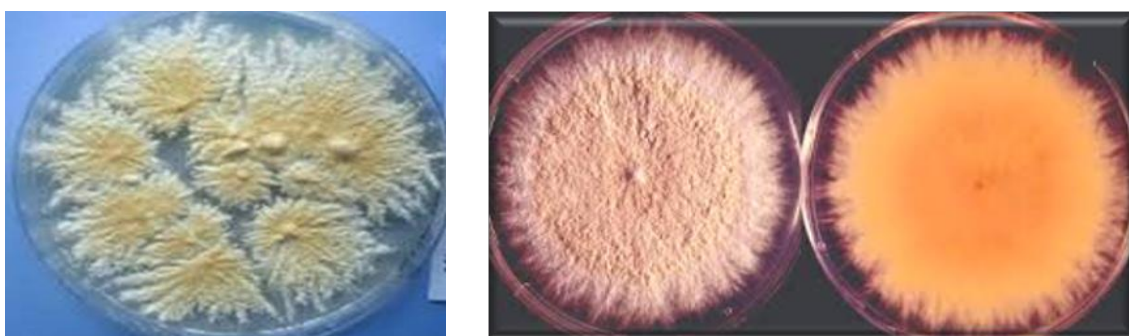


Foto 5. *Nannizzia gypsea*. Cultivo en agar papa, 28 °C, 21 días.

Micromorfología

Forma macroconidios con base truncada, miden 40-50 μm de largo, son de paredes delgadas, extremos aguzados, 3-4 tabiques que forman 6-8 células. Los microconidios son de paredes delgadas, lisas, sin septos, unicelulares, ovoides, clavatas. (Foto 6 a y b).

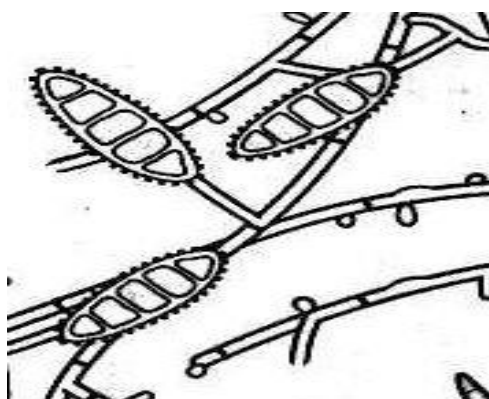


Foto 6. a. Esquema de *Nannizzia gypsea*.



6. b. Micromorfología de *Nannizzia gypsea*.

Patogenicidad

Produce tiña en animales jóvenes y en personas, principalmente en niñas y niños. Es frecuente en perros, gatos, caballos, aunque también infecta conejos, monos, cerdos, ratas y ratones.

Género Trichophyton

Macromorfología

En agar Sabouraud a 28 °C, las colonias son glabras, a veces algodonosas, pueden ser blancas, rosadas, amarillentas o color crema dependiendo de la especie. El reverso de la colonia puede ser marrón, rojo, violeta o amarillo, nunca oscuro.

Micromorfología

Los microconidios predominan, son terminales, pueden agruparse en clusters, o están a lo largo de las hifas, la pared generalmente es delgada, lisa, hialina, con 1 célula, ovoide, piriforme a clavata. Pueden formarse hifas en raqueta, cuerpos nodulares, clamidosporas.

Los macroconidios tienen 2 células o más con forma de cilindro o forma de cigarro, hialinas 20-50 x 4-8 µm.

Trichophyton mentagrophytes

Macromorfología

En agar Sabouraud a 28 °C, las colonias son pulverulentas, generalmente tienen forma de estrella, el anverso es color crema a amarillento, tanino, el reverso puede ser ocre a marrón rojizo, ocasionalmente amarillo.

Las especies de *T. mentagrophytes* se pueden distinguir de *T. rubrum* ya que el test de ureasa positivo y perforación del pelo "in vitro", ausencia de color rojo en el reverso de la colonia en agar harina de maíz dextrosa, inhabilidad de asimilar el sorbitol. No requiere tiamina para crecer.

Micromorfología

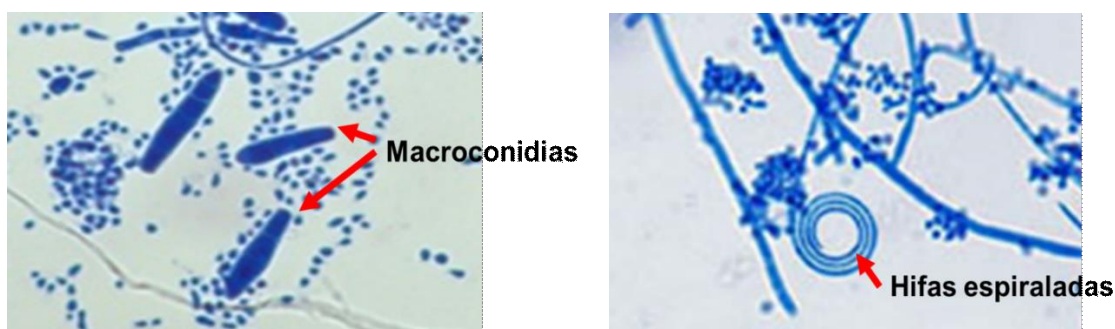


Foto 7. *Trichophyton mentagrophytes*, hifas espiraladas, macroconidios, microconidios.

Forma macroconidios con 3-8 células, de pared delgada y lisa, con forma de cigarro a clavata, 20-50 x 6-8 μm . Se pueden formar hifas espiraladas, hifas en raqueta, clamidosporas, cuerpos nodulares. Los microconidios son esféricos, 2 μm de diámetro, sésiles, surgen en densos clusters o a lo largo de la hifa. (Foto 7).

Patogenicidad

Afecta el pelo, tanto de las personas como de los animales, en forma endotrix y ectotrix, con esporas pequeñas.

Puede causar afección en el ganado, caballos, perros, gatos, ovejas, cerdos, conejos, monos, chinchillas, zorro plateado, ratas de laboratorio.

Fisiología

Las especies se pueden distinguir de *T. rubrum* por su test de ureasa positivo y perforación del pelo “*in vitro*”, ausencia de color rojo en el reverso de la colonia en agar harina de maíz dextrosa, inhabilidad de asimilar el sorbitol. No requiere tiamina para crecer.

Prueba de perforación del pelo “*in vitro*”

Se colocan fragmentos de pelos de personas o de caballos, previamente esterilizados, en una placa de Petri que contiene 25 mL de agua estéril con 2-3 gotas (0,15 mL) de extracto de levadura al 10 % y tierra. Se inocula con fragmentos de la colonia de la cepa en estudio y se incuba en oscuridad a 25 °C durante 3 semanas. Se forma una cuña cónica en la cutícula del pelo. La prueba es positiva para *T. mentagrophytes* o para *M. canis*. (Foto 8.a y b).

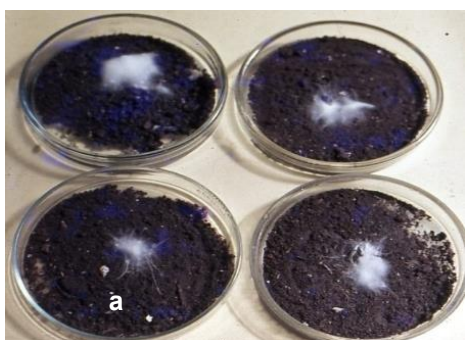


Foto 8.a. Perforación del pelo en placa.



8.b. Formación de cuña en la cutícula del pelo

Trichophyton verrucosum

Macromorfología

En agar Sabouraud a 37 °C, el crecimiento es muy lento. Las colonias son plegadas, de bordes desflecados, inicialmente son glabras, luego aterciopeladas, el anverso es color crema o blanco amarillentas, a veces con tintes salmón a amarillo, el reverso es color crema a salmón.

Microscopía

La esporulación rara vez se produce. Cuando los macroconidios están presentes tienen 4-7 células, lisas y de paredes delgadas. Los microconidios son ovoides a piriformes y pueden formarse cuando el medio es enriquecido con tiamina. Los clamidoconidios son comunes en aislamientos frescos, a menudo en cadenas, a veces terminan en hifas en forma de astas. (Foto 9).

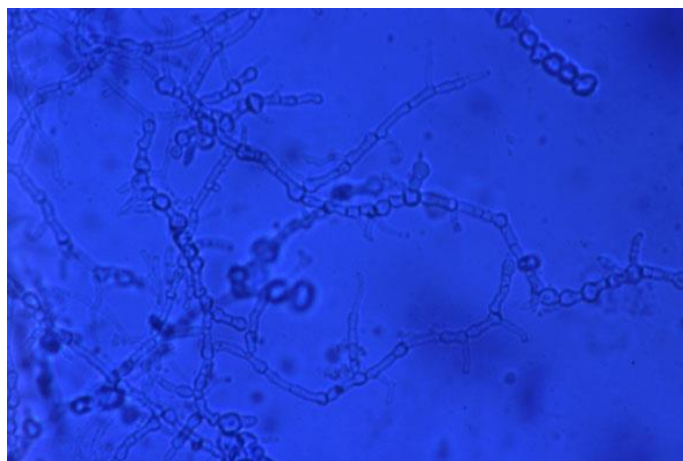


Foto 9. Cultivo a 37 °C de *T. verrucosum*, formación de clamidoconidios intercalares

La prueba de perforación del pelo “*in vitro*” es negativa. El crecimiento se favorece por la adición de tiamina e inositol, los que pueden sustituirse por el agregado de extracto de levadura.

A diferencia del resto de los dermatofitos, *T. verrucosum* crece a 37 °C. Fluorescencia positiva cuando es irradiado con Luz UV o lámpara de Wood.

Patogenicidad

Ataque ectotrix megasporado del pelo. En trabajadores rurales produce tinea corporis, capitis, barbae, con gran proceso inflamatorio.

En animales causa lesión en ganado vacuno principalmente, pero también puede infectar a monos, burros, ovejas y caballos.

Dermatomicosis

En esta sección se abordará el estudio de las patologías pilo-cutáneas causadas por hongos miceliales (no dermatofitos) y levaduriformes.

Las principales presentaciones se clasifican como:

Dermatomicosis: son lesiones de la capa córnea de la piel, o mucosas causadas por hongos miceliales (no dermatofitos) o por levaduras del género *Candida* o *Malassezia*.

Pilonodosis (piedras): son lesiones que afectan la porción extrafolicular del pelo, sin causar lesiones en el tegumento ni en las mucosas. Esta patología se presenta en las personas, no será abordada en este capítulo.

Fuentes de infección

La mayoría de los hongos miceliales causantes de dermatomicosis o pilonodosis se encuentran en la naturaleza, solo unos pocos se mantienen asociados a su hospedero. Mientras que las levaduras se encuentran asociadas al tegumento de los hospederos formando parte de la biota comensal.

Causas predisponentes

La edad, el sexo, condiciones higiénico-ambientales y alteraciones del estado general (metabólicas, inmunológicas, traumáticas) del individuo son algunas de las causas más comunes que favorecen la aparición de las dermatomicosis, tanto en las personas como en los animales.

La invasión sobre el estrato córneo se ve favorecida por la humedad, deficiencia de ácidos grasos, otros componentes de la piel y defectos de pH.

También ciertas condiciones del hospedador como obesidad, piel macerada, inmunodepresión y diabetes favorecen la aparición de las lesiones en las capas superficiales de la piel.

Con respecto a las pilonodosis, su presentación es muy infrecuente y está relacionada a condiciones higiénicas deficientes o como enfermedad profesional.

Infecciones causadas por *Candida* spp.

Las especies de *Candida* aisladas con mayor frecuencia como agentes causales de infecciones en personas y animales pertenecen al complejo *Candida albicans*, seguida del complejo *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, y el complejo *C. glabrata*.

En general, en los mamíferos las levaduras del género *Candida* se comportan como comensales y cuando se producen alteraciones en sus defensas celulares, en su fisiología o en su biota normal encuentran la oportunidad para colonizar, infectar y producir enfermedad.

El potencial patógeno de las levaduras varía con su virulencia, pero deben producirse cambios en cualquiera de los tres factores mencionados anteriormente para que un individuo sea infectado.

La intensidad de la enfermedad depende de la intensidad de la alteración del hospedador más que de la virulencia de la levadura.

En el capítulo 4 se aborda el estudio de las especies de *Candida* y *Malassezia*

Glosario

Artrospora (artroconidio): espora asexual formada directamente por división y transformación de una hifa.

Clamidospora: elemento de resistencia formada por la diferenciación directa del micelio, con pared celular gruesa y citoplasma concentrado. Su diámetro es mayor que el de los filamentos en los que se forma.

Conidióforo: hifa aérea especializada que sostiene y da origen a las conidias. Algunos conidióforos se dilatan en su extremo, y sobre esta superficie se forman numerosos pedúnculos en forma de frasco, de donde salen los conidios en cadenas (catenoide). La porción dilatada del conidióforo se denomina vesícula, las estructuras en forma de frasco son los esterigmas o fiálides. Los conidióforos pueden estar libres sobre el micelio, ya sea aislados o en grupos, o encontrarse agrupados o encerrados en estructuras especiales, que de acuerdo a su forma reciben el nombre de picnidios (piriformes) o acérvulos (almohadillas), esporodoquios (agrupaciones de conidióforos).

Conidia/Conidio: generados en forma exógena, ya sea directamente sobre células independientes (levaduras), sobre el ápice y/o los lados de las hifas o sobre estructuras especializadas denominados conidióforos (miceliales), espora formada como consecuencia de un proceso de reproducción asexual.

Son producidos aisladamente o en grupos, por hifas vegetativas especializadas llamadas conidióforos. Los conidios se separan del punto de unión por pinzamiento o compresión. Pueden clasificarse por forma, tamaño, anatomía, etc.

Dermatofito: hongo que vive como un parásito en la piel, pelo o uñas de las personas o animales.

Dermatomicosis: son lesiones de la capa córnea de la piel, o mucosas, en general causadas por levaduras del género *Candida* o *Malassezia*

Equinulado: espinoso.

Espora: célula formada como consecuencia de un proceso de reproducción sexual.

Faneras: son estructuras complementarias y visibles sobre la piel o que sobresalen de ella.

Fusiforme: con forma de huso.

Hialino: transparente o translúcido como el vidrio. Se aplica en biología a los tejidos y órganos que muestran ese aspecto

Hifas: filamentos que forman el tallo o cuerpo de un hongo.

Macroconidia: la más grande de dos tipos de conidias de hongos (> 5 µm).

Micelio. Conjunto de hifas o filamentos de un hongo.

Microconidia: la más pequeña de dos tipos de conidias en hongos (< 5 µm).

Moho: se refiere a los hongos de micelio filamentosos.

Queratinofílico: que tiene afinidad por la queratina.

Queratinomicosis: infección fúngica que afecta la capa queratínica de la piel.

Sésil: adherido directamente por la base, sin un pedículo.

Tabicado: dividido por paredes transversales.

Talo: cuerpo del hongo.

Vegetativo: referido a hifas que se extienden hacia el sustrato que constituyen la porción que absorbe alimentos de un hongo.

Zoonótico: enfermedad que puede transmitirse entre los animales y a las personas.

Referencias

Arenas, R.A. (2014). *Micología Médica Ilustrada*. 5º edición, Ed. McGraw Hill Interamericana.

Beneke Everett. S, Alvin L. Rogers. (1996). *Medical mycology and human mycoses*. STAR Publishing Company. P.O. Box 68. Belmont, California 94002.

de Hoog GS, Guarro J, Gené J, Ahmed S, Al-Hatmi AMS, Figueras MJ & Vitale RG. (2019). *Atlas of clinical fungi*. 3 rd ed. Utrecht / Reus,

Della Vedova R, Gornatti Churria C D, Córdoba SB, Reinoso EH. *Candidiasis* En: Microbiología Veterinaria. Editor Jefe Néstor Oscar Stanchi 3º Edición Editorial Inter-Médica. ISBN 978-950-555-321-1. <http://www.intermedica.com.ar>. 2019.

Guía de T.P. Cátedra de Micología Médica e Industrial “Prof. Dr. Pablo Negroni”. Año 2019. Carrera de Microbiología. F.C.V., UNLP

Refojo N, Abrantes R. (2019). *Identificación de Hongos Miceliales*. Departamento Micología. INEI ANLIS “Dr. C. G. Malbrán”. Especialización en Diagnóstico Veterinario en Laboratorio. FCV-UNLP.

Reinoso EH, Córdoba SB, Reynaldi FJ, Rosa DE. (2019). *Dermatofitosis. Dermatofitias-tiñas* En: Microbiología Veterinaria. Editor Jefe Néstor Oscar Stanchi 3º Edición Editorial Inter-Médica. ISBN 978-950-555-321-1. <http://www.intermedica.com.ar>

CAPÍTULO 6

Micosis endémicas

Della Vedova Romina

*Nada está a salvo de la vida. Porque es vida lo que cava,
quiebra y oscurece; vida la humedad, los hongos que florecen
en los altos ángulos pasivos (...)*

Santiago Kovadloff, ensayista, poeta, contemporáneo.

Las micosis endémicas son causadas por hongos patógenos que comparten la característica de presentar morfología levaduriforme o micelial según la temperatura en la que desarrollan. Son de distribución universal, aunque el hábitat se circunscribe a determinadas regiones geográficas de acuerdo a los requerimientos en temperatura y nutricional de cada especie.

La prevalencia de las micosis endémicas es mayor en países subdesarrollados o en vías de desarrollo. Son frecuentes en el continente americano y en determinadas zonas de África.

La incidencia de las micosis endémicas no es alta si se compara con las enfermedades causadas por bacterias, virus o parásitos, pero el desenlace suele ser fatal a pesar de instaurarse el tratamiento adecuado.

En este capítulo se abordará el estudio de la histoplasmosis y la coccidioidomicosis, ambas micosis endémicas están presentes en nuestro país y tienen impacto negativo en medicina veterinaria.

Histoplasmosis

Enfermedad de Darling. Reticuloendoteliosis. Citomicosis reticuloendotelial. Enfermedad de las cavernas. Enfermedad del Valle de Ohio. Fiebre de Tingo María.

La histoplasmosis es una enfermedad granulomatosa sistémica, descrita en todo el mundo, causada por el hongo termo dimorfo *Histoplasma capsulatum*.

Datos históricos

En 1905, Samuel Taylor Darling, al realizar la necropsia de un paciente de la Martinica logró identificar cuerpos redondos intracelulares. En ese momento se realizaban los primeros hallaz-

gos de protozoarios, por lo que supuso que esos cuerpos redondos correspondían a protozoarios. Los encontró en histiocitos que se asemejaban a plasmodios, parecían tener cápsula, y los nombró *Histoplasma capsulatum*.

En 1913, en Hamburgo, el estudiante brasileño da Rocha-Lima al comparar los cortes histológicos del 1º caso panameño con una linfangitis epizoótica equina concluyó que la histoplasmosis era de etiología micótica.

En 1940 Pablo Negroni describe el 1º caso en la Argentina.

Epidemiología

La zona endémica en nuestro país comprende la pampa húmeda, abarca las provincias de Buenos Aires, Santa Fe, Entre Ríos, Córdoba, la Pampa, se registran además, casos en Tucumán y Salta.

En los últimos años debido a la migración de los murciélagos hacia el sur de Argentina, *H. capsulatum* fue aislado en Neuquén en cunetas cubiertas con guano.

En la cuenca del Río de la Plata se calcula que un 30 a 41% de la población general de personas tiene infecciones asintomáticas. Se desconoce la prevalencia de esta micosis en veterinaria. (Figura 1).



Figura 1. Zona endémica de la histoplasmosis en Argentina.

H. capsulatum se lo aísla en: EUA, sur de México, norte de Panamá, Honduras, Guatemala, Nicaragua, Venezuela, Colombia, Perú, Brasil, Surinam, Jamaica, Puerto Rico, Belice, Alaska, Birmania, Indonesia, Filipinas, Turquía, Israel, Italia, Suiza, Australia, Asia.

Se comporta como oportunista en individuos inmunosuprimidos.

Factores predisponentes: linfomas, leucemias, terapéutica prolongada con corticoides o inmunosupresores.

Fuentes de infección

El hongo se encuentra disperso en la naturaleza, en las zonas de endemia, principalmente vinculado a lugares en los que se encuentra guano en grandes cantidades.

Etiopatogenia

H. capsulatum var. *capsulatum* es un hongo termo dimorfo, es el agente etiológico de la histoplasmosis a nivel mundial y es considerada una especie críptica formada por 7 especies filogenéticas:

- Norte América 1 (NAM 1) (prevalente en EUA)
- Norte América 2 (NAM 2)
- Latinoamérica A (LAM A)
- Latinoamérica B (LAM B) (prevalente en Argentina)
- Australia
- Holanda y África
- Eurasia.

En los medios de cultivo a 28-30 °C crece como hongo micelial con formación de colonias de color blanco a parduzco. Hay formación de macroconidios característicos, erizados, ovales o piriformes (7 a 15 μm) y microconidios pequeños (2 a 5 μm). En la naturaleza los microconidios (son los propágulos infectivos), pueden estar aerosolizados y al ser inhalados ingresan a los espacios alveolares, allí brotan para finalmente transformarse en levaduras en gemación con un diámetro de 2-5 μm . Las levaduras son captadas por los macrófagos y así son diseminadas al hígado, bazo, médula ósea y ganglios. La inhalación de una cantidad suficiente de conidios puede causar enfermedad pulmonar en un animal aun siendo normo-competente. (Figura 2)

Un 95 % de los casos son asintomáticos, subclínicos o benignos por completo. Algunos pacientes pueden presentar enfermedad pulmonar progresiva y crónica, enfermedad cutánea generalizada o crónica, aguda fulminante, mortal.

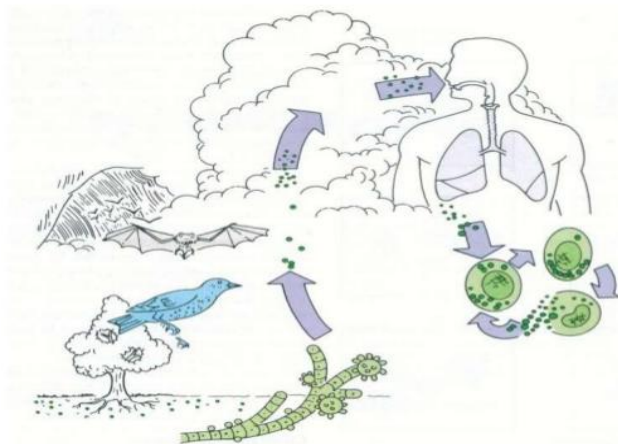


Figura 2. Ciclo de vida de *H. capsulatum*

Ecología

H. capsulatum es cosmopolita, aunque su desarrollo se limita a condiciones ambientales restringidas. Le favorecen las temperaturas de 22 a 29 °C, precipitaciones de 1000 mm y humedad relativa del 67-87 %. En estos parámetros están comprendidas áreas tropicales, subtropicales y templadas de todo el mundo.

H. capsulatum crece en suelos con alto contenido de nitrógeno, relacionado a guano, por lo que se lo encuentra en gallineros, cuevas de murciélagos, nidos de aves, etc. Se disemina adherido a las patas y cuerpos de los vectores, o en el contenido intestinal, aunque la forma más probable de dispersión sea el viento.

Desarrolla de preferencia en guano en descomposición más que en guano fresco. La enfermedad es común en animales salvajes de las zonas endémicas, aunque no se comunican los casos.

Variedades

H. capsulatum var. *duboisii* se describe en África (sinónimo de *H. duboisii* Vanbreuseghem; Carme *et al*, 1993), difiere por tener células brotantes más largas *in vivo*, con paredes gruesas, uninucleadas, y con un brote de base angosta. A 24 °C los cultivos son idénticos a los de *H. capsulatum* pero difieren en que no tienen actividad ureasa.

In vivo se diferencia de *Blastomyces dermatitidis* porque las células brotantes son multinucleadas y tienen base ancha. Generalmente produce lesiones en piel, con compromiso de los huesos del cráneo.

En Asia, África y Europa *H. capsulatum* var. *farciminosum*, provoca en caballos y mulas linfangitis epizoótica endémica. Puede diseminar a distintos órganos y causar las características lesiones de piel.

Clasificación taxonómica:

División: Ascomycota

Clase: Euascomycetes

Orden: Onygenales

Familia: Onygenaceae

Género: *Emmonsia* (*Ajellomyces*) - Estado teleomorfo
Histoplasma - Estado anamorfo

Especie: *capsulata* (Estado teleomorfo).
capsulatum, (Estado anamorfo)

Cuando el hongo se encuentra en la etapa de reproducción sexual produce ascomas (gimnotecios) globosos, toman forma estrellada con la edad característicos de los Ascomycetes.

El gimnotecio difiere del de *Ajellomyces dermatitidis* porque tiene hifas muy ramificadas que surgen de los espirales, irregularmente curvados, y por la pérdida de constricciones en el tabique de las paredes de las células. Los ascos contienen 8 ascosporas, globosas, hialinas, de paredes lisas (rugosas al microscopio electrónico), 1,5 μm de diámetro.

Puerta de entrada y vías de diseminación

H. capsulatum es patógeno *per se*. La puerta de entrada es fundamentalmente la inhalatoria, pero en los animales se considera, además, la vía digestiva. Las aves no se infectan, pero tienen un rol importante en la diseminación de los propágulos ya que el guano es un excelente medio para el crecimiento del hongo.

Enfermedad en animales

La histoplasmosis se presenta en animales, principalmente en caninos y felinos tanto de hábitat domiciliario como de vida salvaje. Las razas de caninos más susceptibles son las cazadoras, terriers, pointers, weimaraners, y entre los felinos los gatos persas.

Existen reportes de casos aislados de histoplasmosis en pequeños roedores, en lagomorfos, coaties, zorros, osos, etc.

Manifestaciones clínicas

Síntomas generales: fiebre elevada, expectoración mucopurulenta, hemoptisis, disnea, astenia, anorexia, disfagia, sialorrea, tenesmo, diarreas, los signos clínicos pueden variar desde adelgazamiento, lesiones pulmonares, cutáneas, gastrointestinales, hasta aborto micótico.

El período de incubación es de 5 a 18 días. En un 95 % de los casos, la infección es subclínica o asintomática. Se disemina en forma rápida, transitoria, hematogena y generalizada llegando a aparecer localizaciones mucocutáneas.

La enfermedad gastrointestinal es menos frecuente, pero puede manifestarse en caninos y está en relación con la puerta de entrada digestiva. La forma cutánea primaria provoca un chancro ulcerado indoloro con adenopatía regional; cura sola en semanas o meses.

La resolución de la enfermedad confiere cierta inmunidad a la reinfección y grados variables de hipersensibilidad a los componentes antigénicos del hongo.

En pocos casos, la enfermedad se convierte en crónica y progresiva y sigue un curso similar a la TBC.

En los gatos puede presentarse uveítis anterior, lesiones pulmonares tipo miliar, artropatías y lesiones óseas. (Foto 3 a y b).



Foto 3. a. Uveitis anterior en gato siamés.



3.b. Lesiones miliares en pulmón.

Gentileza MV. Zufriategui L.

Diagnóstico diferencial

La histoplasmosis simula tuberculosis a la vez que puede coexistir con ella, con sarcoidosis, y/o actinomicosis. Es difícil establecer la diferencia. El examen directo, cultivo y serología son herramientas útiles para el diagnóstico diferencial.

En el estudio histopatológico, debe diferenciarse de leishmaniasis (parásito redondeado con tinción bipolar) y toxoplasmosis (parásito más pequeño que no es intracitoplasmático ni se tiñe).

En la mayor parte de las formas clínicas de histoplasmosis es posible revelar al hongo a partir de muestras de sangre o punción de ganglios afectados.

La prueba con histoplasmina (intradermo reacción) no es de utilidad en medicina veterinaria.

Diagnóstico de Laboratorio

Muestras clínicas: se procesarán las muestras provenientes de líquidos estériles, punción pleural, peritoneal, sangre, lavado broncoalveolar, biopsias, escarificación de úlceras, y todo material biológico que pueda ser de utilidad para realizar el diagnóstico.

Microscopía

La observación directa del material obtenido de muestras clínicas es negativa si se procesa con KOH. El hongo es intracelular, por lo tanto, se requieren coloraciones para visualizarlo.

Los extendidos de esputo o improntas de biopsias fijadas con alcohol metílico y coloreados con May Grunwald Giemsa (3 gotas /cc agua durante 30 minutos) demuestran microscópicamente elementos levaduriformes ovoides, con pared gruesa de 3-5 μm de tamaño, preponderantemente dentro de los macrófagos o células gigantes. Se observa un halo que rodea a la célula y no se tiñe, esa característica le da aspecto de casquete. Cuando los monocitos o los macrófagos se lisan es posible observar a las levaduras en los alrededores.

La variedad a “grandes formas” de *H. capsulatum* var *duboisii*, puede confundirse con *Paracoccidioides brasiliensis*.

Tinciones

Los extendidos, las improntas y los cortes histológicos teñidos con PAS, Gomori-Grocott, facilitan la observación microscópica de *Histoplasma*.

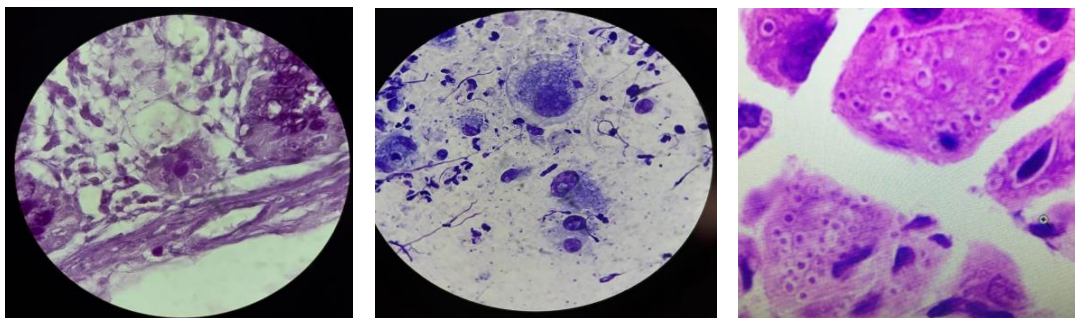


Foto 4. Levaduras intracelulares compatibles con *Histoplasma* sp. Tinción Giemsa.

La tinción Hematoxilina/Eosina (H/E) es útil para la observación de la morfología celular, indicaría el estado de reacción específica por parte del hospedero frente al microorganismo. (Foto 4).

Características de la colonia

En agar Sabouraud a 28 °C al principio las colonias son lisas, luego cerebriformes, granulares a algodonosas, inicialmente blanca, luego tostadas. El reverso es color crema, luego café pardo a marrón al envejecer.

Los cultivos de *Histoplasma* en agar glucosa + extracto de levadura + cicloheximida + clo-ranfenicol, agar Lactrimel, agar glucosa sangre, agar extracto de levaduras, etc. incubados a 37 °C durante 20-30 días muestran el desarrollo de colonias levaduriformes, pastosas, blanco sucias o parduscas, que presentan elementos ovoides semejantes a la forma parasitaria.

A 37 °C en agar cerebro corazón (por sus siglas en inglés BHI) se forman levaduras brotan-tes de 7 µm. La conversión a la fase de levadura en el laboratorio se logra sembrando en agar sangre + peptona y cisteína, a pH 7,4, se incuba a 37 °C, los tubos se tapan para aumentar la concentración de CO₂. En un comienzo aparece micelio, luego la colonia se torna lisa y pueden observarse levaduras al microscopio.

Las formas miceliales desarrollan en agar Sabouraud luego de incubación a 28 °C, durante no menos de 30 días. El hongo desarrolla micelio filamentoso tabicado, hialino, con formación de microconidias hialinas, sésiles o que salen de cortos pedículos a partir de hifas indiferenciadas, de paredes lisas y delgadas, están formadas por una célula piriforme o clavata, de 1-2 a 5 µm.

Las macroconidias son marrones, salen de cortos conidióforos, tienen paredes gruesas, tubercu-ladas, o con proyecciones cilíndricas, con una célula esférica, 7-15 µm de diámetro. (Foto 5 a y b).

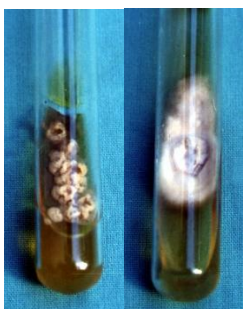
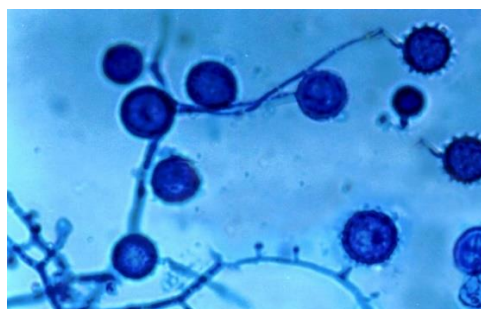


Foto 5-a. *Histoplasma* sp.
Cultivo a 37 °C y 28 °C

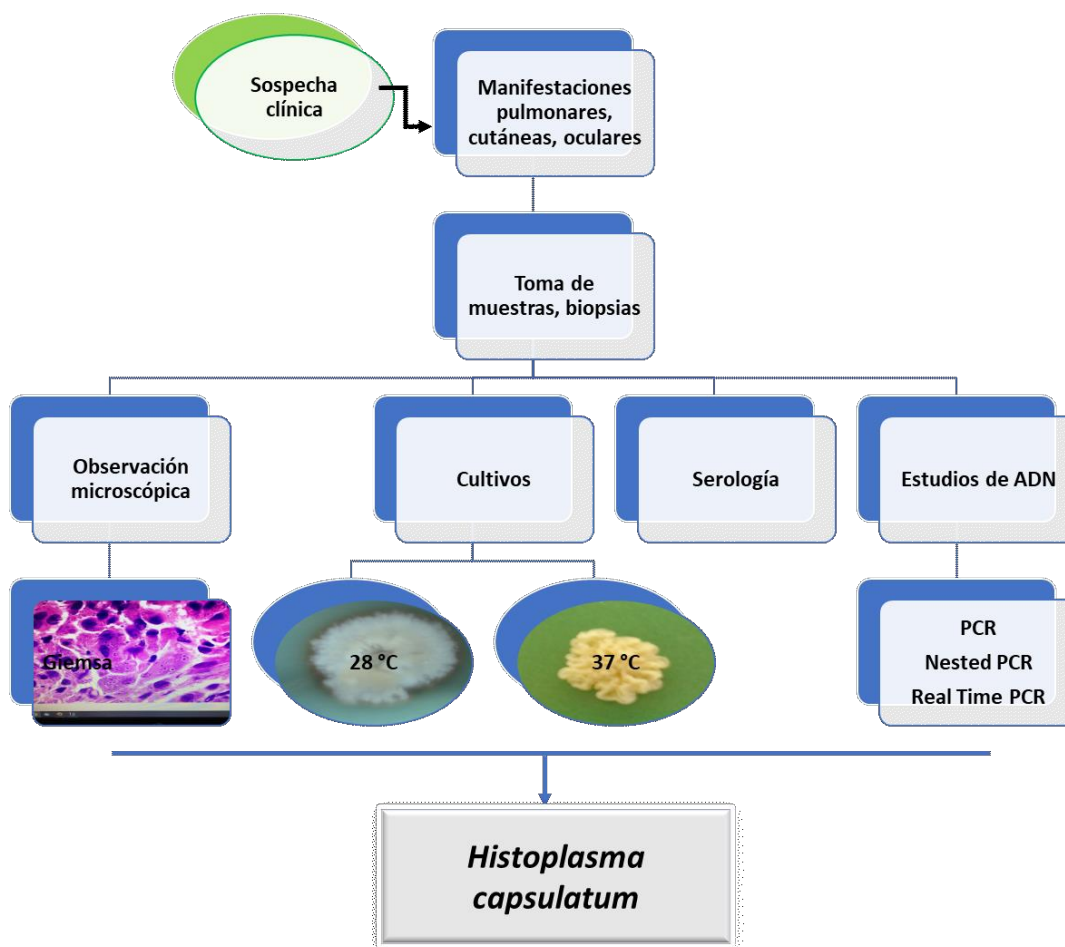


5-b. Cultivo a 28 °C. Micromorfología.
Macro y microconidias.

Serología

- **Fijación de complemento (FC):** tiene valor diagnóstico y pronóstico, detecta el 96 % de los casos con cultivos (+) positivos. Es compleja y costosa, da reacciones cruzadas en pacientes con blastomycosis norteamericana, coccidioidomicosis y otras micosis.
- **Aglutinación del látex:** detecta infecciones primarias agudas.
- **Inmunodifusión (ID) y FC:** detecta el 85 % de los casos.
- **ID y contraelectroforesis (CIE):** tienen una correlación de un 90 %, sirven especialmente cuando la FC da reacciones cruzadas o para sueros anticomplementarios. Bandas de precipitación **H** indican histoplasmosis activa (100 %), las bandas **M** indican formas agudas o crónicas y pacientes con pruebas cutáneas previas (70 %), mientras que las bandas **Y** indican histoplasmosis aguda.
- **Inmunolectroforesis** las bandas específicas H, son diferenciadas de las otras por su migración catódica (migración en retroceso).

Algoritmo de trabajo para identificar a *Histoplasma sp.* en el Laboratorio



COCCIDIOIDOMICOSIS

Granuloma coccidioidal, Enfermedad de California, Fiebre del Valle de San Joaquín, enfermedad de Posadas y Wernicke, Fiebre del desierto, reumatismo del desierto.

Es una micosis sistémica, granulomatosa, crónica causada por el hongo termo dimorfo *Coccidioides immitis/Coccidioides posadasii*.

Antecedentes

En 1892, Alejandro Posadas, estudiante de medicina, describió por 1º vez esta micosis en la Argentina en un soldado (Domingo Escurra) procedente de la provincia de Chaco. En esa época al realizar la descripción del microorganismo se lo consideró como un coccidio por su semejanza con los protozoarios.

En 1894, se comunicó otro caso en EUA, proveniente del Valle de San Joaquín, considerado como la zona más endémica del mundo. El material proveniente de este paciente se cultivó y se obtuvo el desarrollo de un moho blanco, el que se incineró pues se creyó, en ese entonces, que el agente etiológico era un protozoario al que denominaron *Coccidioides* (parecido a *Coccidio immitis* (del latín “duras”, para describir el curso clínico).

Agente etiológico

Con las técnicas de biología molecular se logró identificar a *C. immitis* y *C. posadasii* como los agentes etiológicos de la coccidioidomicosis. Ambas especies comparten las mismas características morfo-fisiológicas y solo son diferenciadas con estudios del ADN.

C. immitis es la especie prevalente en EUA y norte de México, mientras que *C. posadasii* es la especie prevalente en Argentina.

Coccidioides sp. es un hongo termo dimorfo, tiene una fase saprofítica a 28 °C (presente en el ambiente) y una fase parasitaria a 37 °C (en el hospedero).

La fase saprofítica se caracteriza por la formación de micelio filamentosos tabicados, hialino, micelio en raqueta, funículos, esclerotes rudimentarios. Los elementos infectantes son los endosporos o clamidoartrosporos (ingresan al organismo por la vía inhalatoria).

En los medios de cultivo en 4-5 días, a 28 °C se forma en la hifa fértil una separación, se observa un material granuloso dentro de la hifa, llamado proconidio, la membrana se fusiona con el resto, se condensa material de la célula vecina y se forma el endosporo intercalar, que se desprende con el viento.

Epidemiología

El hongo vive en el suelo, en ciertas zonas áridas de América.

Todas las zonas endémicas del continente americano comparten características comunes, son semidesérticas, con tierras arcillosas y arenosas, con escasa capacidad para retener la humedad.

La zona de endemia se extiende sobre toda la cadena montañosa desde Estados Unidos hasta Argentina. Se calcula que un 7,4 % del continente americano constituye zona endémica.

En Argentina abarca la pampa occidental, La Rioja, San Juan, San Luis, Alto Valle del Río Negro, Neuquén y parte de Santiago del Estero.

En estas zonas el suelo es alcalino, las precipitaciones anuales oscilan entre 150-500 mm, la temperatura promedio es de 28 °C en verano y 7 °C en invierno.

La variación de la temperatura durante el día es de 0 a 45 °C. (Figura 2).

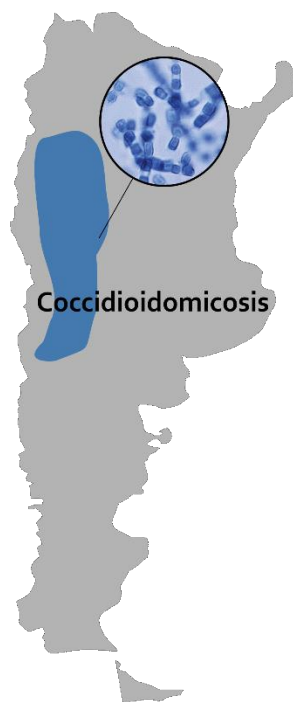


Figura 2. Zona endémica de *Coccidioides posadasii* en Argentina

Coccidioides sp., puede crecer en suelos pobres con variación de pH, alcanza su mayor desarrollo en suelos con poca competencia fúngica. Los meses cálidos son favorables para su reproducción, pero es en la época invernal o de vientos cuando se adquiere la enfermedad con mayor facilidad, debido a que las artrosporas son transportadas por el viento.

En algunas regiones endémicas de Argentina, el aumento de emprendimientos inmobiliarios, con gran movilización de tierra por las excavaciones generó brotes de coccidioidomycosis en residentes y turistas, así como también en mascotas, principalmente en caninos.

La presencia de *Bacillus anthracis* y/o *Penicillium* en el suelo actúa como biota inhibitoria competitiva del desarrollo de *Coccidioides*.

Coccidioides puede ser aislado de cuevas de roedores y de cementerios de aborígenes. El sol puede esterilizar las capas superficiales del suelo, pero se lo puede encontrar hasta unos 28 cm de profundidad con capacidad infectante. A partir del suelo puede infectar a personas y animales.

Vías de entrada

En el 98 % de los casos el ingreso al organismo es por la vía respiratoria, aunque se describen casos cutáneos primarios por penetración traumática.

Factores predisponentes

- Residencia en la zona endémica.
- Edad: ligado a la inmunidad celular, es decir, los caninos jóvenes son más susceptibles.
- Sexo: se presenta por igual en hembras y machos.
- Raza: en caninos, en general las razas grandes, de rápido crecimiento son más susceptibles de padecer la enfermedad, bulldog, ovejero alemán, boxer, gran danés, etc.
- Otras especies también sufren la infección, ganado vacuno, ovino, porcino.

Entre los animales silvestres se reportaron casos en canguros, murciélagos, primates no humanos, grandes felinos (pumas), animales marinos.

Período de incubación

Se estima que es de 2 semanas.

Patogenia

Las artrosporas ingresan por la vía respiratoria y llegan al pulmón. Una vez en el alvéolo pulmonar el endosporo forma un protoplasma central que se divide, origina esporangios de primoinfección, con un tamaño de 40-90 μm . En el centro del esporangio queda un protoplasma residual y en la periferia endosporos sin membrana propia, por presión salen al exterior, según algunos autores por un ostíolo.

Dos semanas post ingreso al organismo, se forman esporangios quísticos o de reinfección, más chicos, de hasta 40 μm , los endosporos son más grandes con membrana propia y ocupan todo el esporangio. Tiene reacción acidófila en la perifería llamada Splendore Hoeffli. Estos endosporos no se diseminan con facilidad por ser más grandes. Hay polimorfonucleares neutrófilos, macrófagos, células gigantes, fibrocitos, fibroblastos, se deposita calcio.

En general, la infección es asintomática, un 20-25 % cursa como un leve resfrío y sólo un 0,5-2 % de los casos dan sintomatología pulmonar grave, puede diseminarse por vía linfática o hematológica hacia otros órganos, haciendo blanco en subcutáneo, huesos, vísceras.

Cuando el ingreso es por traumas cutáneos, se forma un complejo primario similar al de la esporotricosis, con chancro inicial con linfangitis, adenitis, puede involucionar o formar una lesión granulomatosa casi siempre verrugosa.

Manifestaciones clínicas

La enfermedad puede cursar con una forma pulmonar leve o inaparente. En general ocurre en animales normocompetentes.

Cuando el animal presenta algún estado de inmunocompromiso, independientemente del origen, se puede presentar una forma multisistémica diseminada, en general más frecuente en caninos. En esta forma el hongo disemina a partir del pulmón a otros órganos blanco y lleva a una falla multisistémica con desenlace fatal.

En caninos jóvenes, de razas grandes, pesadas, como boxer, bulldog, gran danés suele presentarse una forma ósea, que lleva a error en el diagnóstico ya que simula tumor óseo.

Diagnóstico de Laboratorio

Observación directa en fresco

A partir de las muestras clínicas se realiza la observación en microscopio óptico. Dependiendo de la densidad, viscosidad, textura de la muestra se agrega OHK 10-40 % en un portaobjetos limpio y desengrasado, se deposita una pequeña porción de la muestra, se calienta sobre llama suave del mechero de Bunsen para facilitar la fluidificación. Se observan los esporangios de primo o de reinfección de 40-90 μm . (Foto 6).

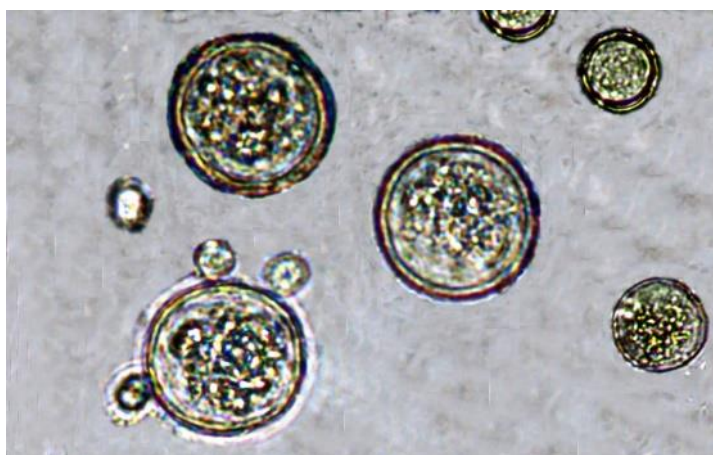


Foto 6. Observación directa en fresco con OHK 20 %. Esporangios

Tinciones

Los esporangios se observan con claridad con tinciones histiológicas comunes, H/E, Giemsa, Grocott. En ocasiones pueden estar rodeados de una reacción acidófila llamada Splendore-Hoeppli.

Cultivos

En agar Sabouraud a 28 °C el hongo desarrolla en 7-10 días la forma micelial, forma micelio filamentosos tabicados, hialinos, con superficie vellosa, forma artroconidias de 2,5-4 x 3-6 μm .

La forma parasitaria a 37 °C se obtiene en el medio Converse, y se observa la formación de esferas. (Foto 7).

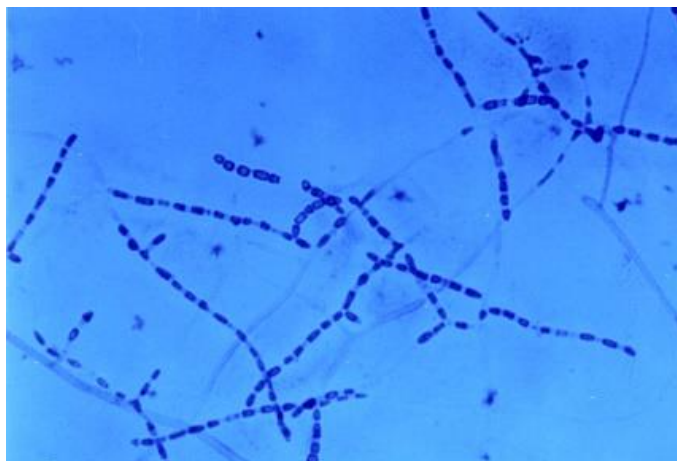


Foto 7. *Coccidioides sp. a-Cultivo a 28 °C, arthroconidios*

Serología

Se realiza la IDD, la presencia de la banda F (47-kDa quitinasa), indica una infección por *Coccidioides sp.*, activa o no. Perdura hasta 6 meses después de la infección activa. No tiene valor pronóstico. Tiempo de aparición: 1 a 3 semanas después de la primoinfección. No es influenciada por la coccidioidina.

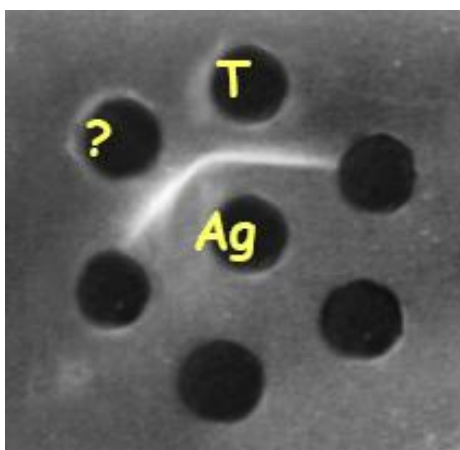
Banda F (47-kDa quitinasa).

Indica infección por *Coccidioides sp.*, activa o no.

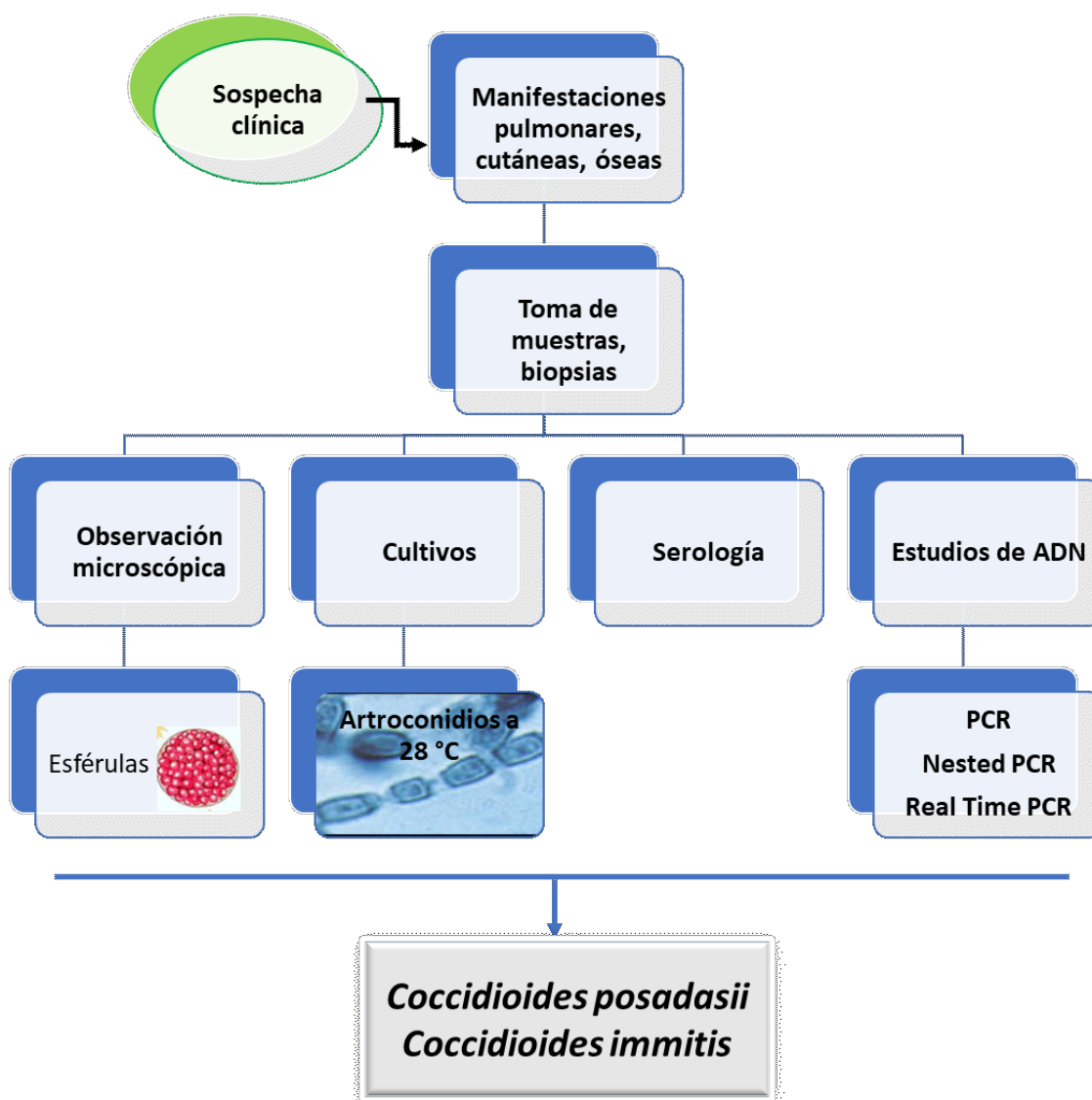
No tiene valor pronóstico

Aparece 1 a 3 semanas de la primoinfección

Persiste hasta 6 meses post-infección.



Algoritmo de trabajo para identificar *Coccidioides* sp. en el Laboratorio



Glosario

Anamorfo: estado reproductivo asexual, involucra conidiogénesis y conidios. Cuando un hongo produce múltiples anamorfos morfológicamente distintivos, se denominan sinamorfos (p. ej un hongo produce filococonidias y clamidoconidias, ambos estados son sinamórficos).

Arthrospora (artroconidio). Espora asexual formada directamente por división y transformación de una hifa.

Ascoma: estructuras que contienen esporas sexuales

Chancro: lesión que se forma en el sitio de ingreso al organismo por inoculación traumática del patógeno fúngico.

Conidióforo: hifa aérea especializada que sostiene y da origen a las conidias. Algunos conidióforos se dilatan en su extremo, y sobre esta superficie se forman numerosos pedúnculos en forma de frasco, de donde salen los conidios en cadenas (catenoide). La porción dilatada del conidióforo se denomina vesícula, las estructuras en forma de frasco son los esterigmas o fiálides. Los conidióforos pueden estar libres sobre el micelio, ya sea aislados o en grupos, o encontrarse agrupados o encerrados en estructuras especiales, que de acuerdo a su forma reciben el nombre de picnidios (piriformes) o acérvulos (almohadillas), esporoquios (agrupaciones de conidióforos).

Conidia/Conidio: generados en forma exógena, ya sea directamente sobre células independientes (levaduras), sobre el ápice y/o los lados de las hifas o sobre estructuras especializadas denominados conidióforos (miceliales), espóra formada como consecuencia de un proceso de reproducción asexual.

Son producidos aisladamente o en grupos, por hifas vegetativas especializadas llamadas conidióforos. Los conidios se separan del punto de unión por pinzamiento o compresión. Pueden clasificarse por forma, tamaño, anatomía, etc.

Dimorfo: que tiene dos formas. Se refiere a las formas filamentosas/levaduriformes que desarrollan ciertos hongos patógenos a diferentes temperaturas.

Equinulado: espinoso.

Esclerote: masa compacta de micelio, contiene reservas de alimento, son estructuras de resistencia.

Espora: célula formada como consecuencia de un proceso de reproducción sexual.

Esporangio: estructura cerrada dentro de la cual se producen esporas asexuadas por clivaje.

Gimnotecio: ascoma compuesto por hifas entrelazadas de manera floja, esta disposición genera espacios abiertos para la liberación de las ascosporas formadas dentro del ascoma.

Hialino: transparente o translúcido como el vidrio. Se aplica en biología a los tejidos y órganos que muestran ese aspecto

Hialohifomicetes: hongos miceliales que presentan micelio hialino o con pigmentos claros, nunca negros o marrones.

Hifas: filamentos que forman el tallo o cuerpo de un hongo.

Macroconidia: la más grande de dos tipos de conidias de hongos (> 5 µm).

Micelio. Conjunto de hifas o filamentos de un hongo.

Microconidia: la más pequeña de dos tipos de conidias en hongos (< 5 µm).

Moho: se refiere a los hongos de micelio filamentosos.

Saprofito: cualquier microorganismo vegetal que obtiene su nutrición de materia orgánica muerta.

Tabicado: dividido por paredes transversales.

Talo: cuerpo del hongo.

Teleomorfo: estado reproductivo sexual, desarrolla un ascoma y esporas.

Vegetativo: referido a hifas que se extienden hacia el sustrato que constituyen la porción que absorbe alimentos de un hongo.

Referencias

- Calanni LM, Pérez RA, Brasili S, Schmidt NG, Iovannitti CA, Zuiani MF, Negroni R, Finkelievich J, Canteros CE. (2013). *Outbreak of histoplasmosis in province of Neuquén, Patagonia Argentina*. Rev Iberoam Micol.;30(3):193-9. doi: 10.1016/j.riam.2012.12.007.
- Canteros CE, Madariaga MJ, Lee W, Rivas MC, Davel G, Iachini R. (2010). *Endemic fungal pathogens in a rural setting of Argentina: seroepidemiological study in dogs*. Rev Iberoam Micol. 31;27(1):14-9. doi: 10.1016/j.riam.2009.11.002.
- Canteros CE, Toranzo A, Ibarra-Camou B, David V, Carrizo SG, Santillán-Iturres A, Serrano J, Fernández N, Capece P, Gorostiaga J, Chacón YA, Tonelli R, Boscaro G, Abiega C, Mendieta S, Fernández C, Fernández A, Vitale R, Santos P, Pizarro MR, López-Joffre MC, Lee W, Mazza M, Posse G, Tiraboschi IN, Negroni R, Davel G. (2010). *Coccidioidomycosis in Argentina, 1892-2009*. Rev Argent Microbiol. 42(4):261-8. doi: 10.1590/S0325-75412010000400004.
- Casal JI, Alvarez RO, Lee W, Rivas MC, Davel G, Canteros CE. (2008). *Disseminated coccidioidomycosis in a dog*. Rev Argent Microbiol. 40(2):109.
- Córdoba SB, Reinoso EH. (2019). *Histoplasmosis* En: Microbiología Veterinaria. Editor Jefe Néstor Oscar Stanchi 3° Edición Editorial Inter-Médica. ISBN 978-950-555-321-1. <http://www.intermedica.com.ar>.
- Larsuprom L, Duangkaew L, Kasorndorkbua C, Chen C, Chindamporn A, Worasilchai N. (2017). *Feline cutaneous histoplasmosis: The first case report from Thailand*. Med Mycol Case Rep. 25;18:28-30. doi: 10.1016/j.mmcr.2017.07.008. eCollection 2017 Dec.
- Sahaza JH, Rodríguez-Arellanez G, Canteros CE, Reyes-Montes MDR, Taylor ML. (2020). *Thermotolerance of Histoplasma capsulatum at 40 °C predominates among clinical isolates from different Latin American regions*. Braz J Infect Dis. 24(1):44-50. doi: 10.1016/j.bjid.2019.12.007.
- Taylor ML, Hernández-García L, Estrada-Bárceñas D, Salas-Lizana R, Zancopé-Oliveira RM, García de la Cruz S, Galvão-Dias MA, Curiel-Quesada E, Canteros CE, Bojórquez-Torres G, Bogard-Fuentes CA, Zamora-Tehozol E. (2012). *Genetic diversity of Histoplasma capsulatum isolated from infected bats randomly captured in Mexico, Brazil, and Argentina, using the polymorphism of (GA)(n) microsatellite and its flanking regions*. Fungal Biol. 116(2):308-17. doi: 10.1016/j.funbio.2011.12.004.

CAPÍTULO 7

Micosis por implantación

Diana E. Rosa, Susana B. Córdoba y Francisco J. Reynaldi

Raíces tortuosas y nudos malignos de musgo retardaban la marcha, y de vez en cuando una pila de piedras húmedas o los fragmentos de una pared en ruinas hacían aún más depresiva aquella atmósfera que los árboles deformados y las colonias de hongos contribuían a crear.

Howard Phillips Lovecraft. LA LLAMADA DE CTHULHU (1928).

Las micosis por implantación, antes conocidas como micosis subcutáneas, son entidades clínicas que incluyen la participación como agentes etiológicos, de distintos hongos miceliales saprófitos, cuyo hábitat está en el suelo y las plantas, y se caracterizan por invadir piel y tejido subcutáneo.

En general, el ingreso al hospedador es a través de la inoculación traumática de astillas, espinas, o cualquier objeto contaminado con los hongos presente en el suelo.

En este capítulo se describirá a la esporotricosis y los micetomas por ser las micosis por implantación de importancia en Medicina Veterinaria que se presentan en nuestro país. Además, se tratarán la pitiosis y la rinosporidiosis, no son micosis, son conocidas como seudomicosis y se caracterizan por manifestar similares signos clínicos y las estructuras microscópicas pueden confundirse con estructuras fúngicas.

Esporotricosis

La esporotricosis, es conocida también como la “enfermedad de los jardineros”, “enfermedad de las mulitas”, es una micosis de implantación causada por hongos pertenecientes al complejo *Sporothrix schenckii*.

La esporotricosis fue descrita por primera vez por Benjamin Schenck en 1898 en EUA y a partir de entonces ha sido descrita en todos los continentes.

La micosis afecta tanto a las personas, como a los animales silvestres y domésticos; y en algunos casos provoca brotes zoonóticos en regiones de clima templado-cálido.

Agentes etiológicos

Las especies incluidas en el complejo *S. schenckii* son termo dimorfas, cambian su morfología de acuerdo a la temperatura. Así, se encuentran en la naturaleza, a 25-28 °C, en forma de micelio (fase saprofítica) y en el hospedero, a 35-37 °C desarrolla la fase levaduriforme (parasitaria).

Posición taxonómica

Inicialmente el hongo recibió el nombre de *S. schenckii*, y fue reconocido como el único agente causal de la esporotricosis. A partir de la década de 1990 los estudios basados en técnicas de RFLP-ADN mitocondrial permitieron agrupar distintos clados de *S. schenckii* de acuerdo al origen geográfico:

Grupo A: incluye aislados de *S. schenckii* de Sud África y del Norte, Centro y Sud América.

Grupo B: incluye aislados de *S. schenckii* de Australia y Asia (China, Japón).

Posición taxonómica del Género *Sporothrix* (<http://www.indexfungorum.org>)

Reino Fungi

División *Ascomycota*

Clase *Sordariomycetes*

Orden *Ophiostomatales*

Familia *Ophiostomataceae*

Género *Sporothrix*

Especies del Complejo *Sporothrix schenckii*

En la actualidad, y gracias a los avances en los estudios del ADN se reconocen dos complejos de especies de importancia en medicina humana y veterinaria: el complejo *S. schenckii* formado por *S. schenckii sensu stricto*, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. luriei*, y el complejo *S. pallida* formado por *S. pallida sensu stricto*, *S. chilensis* y *S. mexicana*.

Existen otros complejos principalmente aislados de muestras ambientales y con escasa participación como agentes patógenos e incluyen a *S. brunneoviolacea*, *S. lignivora* y *S. dimorphospora*. (Figura 1).

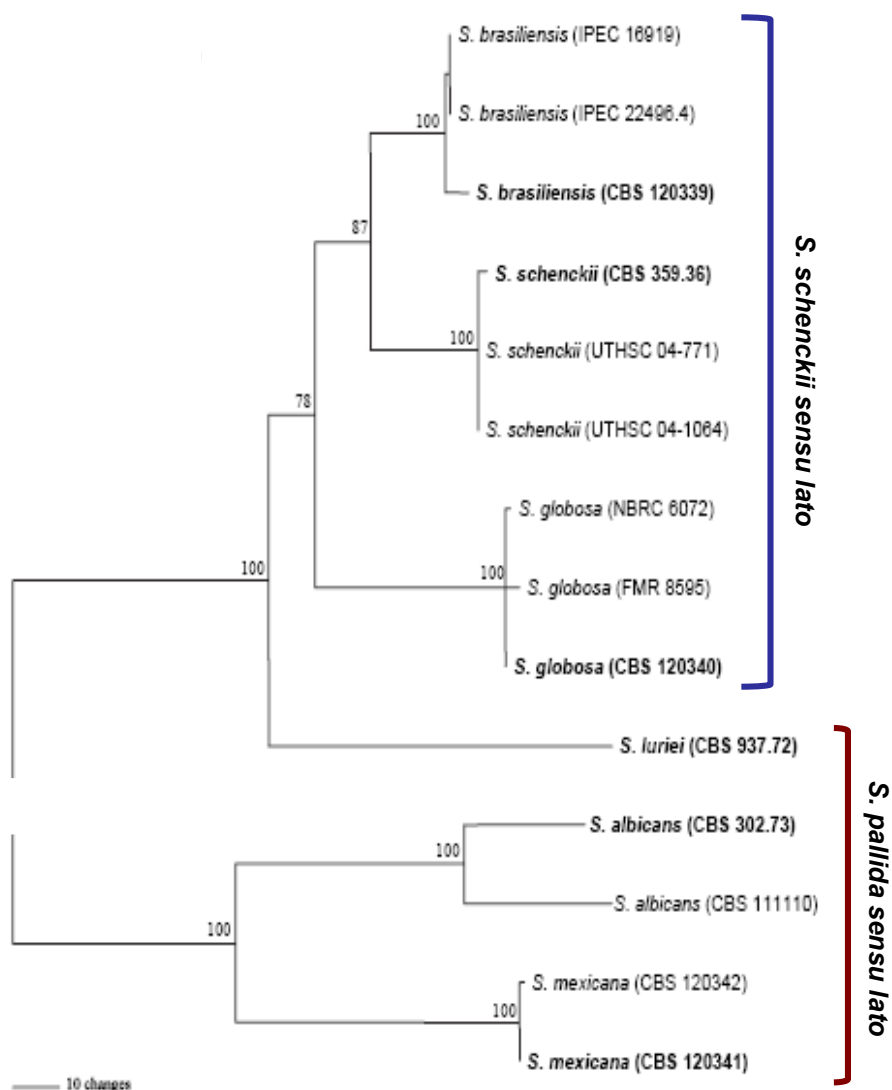


Figura 1. Relación filogenética generada mediante el análisis Neighbor-Joining (NJ) usando la secuencia parcial de nucleótidos del gen CAL. El valor indicado en cada rama expresa porcentaje de repeticiones bootstrap (2000 repeticiones). El análisis filogenético se realizó con MEGA6.

Epidemiología

El complejo *S. schenckii* tiene amplia distribución en la naturaleza, se lo encuentra en el suelo asociado a materia orgánica vegetal, tanto fresca (hojas, madera, astillas), como en descomposición y en colectas de agua dulce.

Se lo aísla con mayor frecuencia de sitios con clima cálido tropical, aunque se describieron casos en zonas de clima desértico de Perú y en regiones de China con temperaturas medias de 2 °C - 6 °C.

En 1947, se reportó el mayor brote vinculado a exposición por trabajo en el que resultaron infectados 2899 mineros en Sudáfrica entre 1941 y 1944.

La enfermedad es frecuente en EUA y Japón, además existe una zona endémica en el norte de India. Esta micosis es poco frecuente en Europa.

En Centro y Sudamérica, la esporotricosis es la micosis de implantación más común y con alta prevalencia en México, Uruguay, Perú y Brasil.

En 2015, en la región sudeste de Brasil se registró la mayor epidemia mundial de transmisión zoonótica de esporotricosis con más de 5000 casos humanos y más de 4500 casos en animales. Se demostró que los gatos domésticos (*Felis catus*) fueron los involucrados en la transmisión de la enfermedad, tanto a las personas como a los perros. La transmisión se produjo, no solo por heridas, mordeduras, arañazos, sino también por el estrecho contacto de los propietarios con los animales enfermos al realizarles las curaciones de las lesiones cutáneas.

Actualmente, las regiones de mayor endemidad para la esporotricosis son China con 3299 casos, Sudáfrica con 3154 y Brasil con aproximadamente 12000 casos.

En Argentina los casos comunicados por *S. schenckii sensu stricto*, *S. brasiliensis* y *S. globosa* fueron en distintas provincias del centro, del norte y del este del país. Estas cepas fueron aisladas de casos clínicos en personas, en animales, y a partir del ambiente.

En Brasil, Uruguay y Argentina los cazadores de mulitas son potencialmente susceptibles de contraer la enfermedad por las maniobras que realizan para extraer a los animales de las cuevas de hasta 40 cm bajo tierra en las que se encuentran estos animales. Durante las maniobras, los cazadores sufren heridas a través de las cuales se produce el ingreso del microorganismo.

De acuerdo a un estudio reciente, *S. brasiliensis* se asocia con grandes epizootias durante la transmisión horizontal de los animales, principalmente en gatos; *S. schenckii* también puede infectar a los gatos, pero con menor frecuencia.

La esporotricosis puede ser transmitida a las personas a través de arañazos y mordeduras de gatos (zoonosis). La amenaza de transmisión de patógenos entre especies plantea la posibilidad de una epidemia masiva de seres humanos en áreas altamente endémicas.

Por su parte *S. schenckii* y *S. globosa* se contraen directamente de inoculación traumática desde fuentes naturales (saprónosis), mientras que *S. brasiliensis* es menos frecuente como saprónosis.

Patogenia. Manifestaciones clínicas

El hongo ingresa al organismo por la inoculación traumática con astillas, espinas, o por lesiones causadas por animales infectados o portadores. A partir del sitio de ingreso al organismo, el hongo sigue la cadena ganglionar y adopta la forma de “gomos escalonadas o linfangitis nodular ascendente”.

En gatos, la forma de presentación más frecuente es la linfangítico-nodular (75-90 % de los casos). Entre los 7-30 días luego del trauma e inoculación del *S. schenckii*, se manifiesta como una pápula indurada de 2-4 cm de diámetro, llamado “chancro de inoculación” con escasa supuración. Pueden formarse nódulos dermoepidérmicos en número variable, a lo largo de la cadena ganglionar, conformando así la tríada: chancro de inoculación, linfangitis y adenopatía regional.

Con menos frecuencia se observa la forma cutánea localizada o fija (20 %), que se presenta como lesiones dermo-epidérmicas inflamatorias, de superficie granulomatosa o verrucosa, que simula otras enfermedades. Excepcionalmente el hongo puede ingresar al hospedero vía inhalatoria y dar lugar a las formas extra-cutáneas (pulmonar, sistémica, óseas, articulares, del SNC, etc.)

En la última década, los gatos domésticos son parte importante en la vía de transmisión por ser más susceptibles a contraer la infección debido a sus hábitos de merodear, y de cazar pequeños roedores, los que suelen ser portadores o estar infectados con *Sporothrix* sp. Los gatos pueden transportar los conidios del hongo, pueden infectarse y manifestar lesiones múltiples, necróticas, exudativas y con diseminación sistémica. Las lesiones en piel son ulceradas, se ubican principalmente en la cabeza, en orejas, puente de nariz, aunque también se encuentran en los miembros. Cuando se afecta la mucosa oral o nasal es común que el animal presente fiebre, anorexia y decaimiento. Los gatos infectados son fuente de contagio para otros animales, y principalmente para las personas, por el estrecho contacto que mantienen con sus propietarios y con los niños.

La micosis fue descrita, además, en caninos, equinos, bovinos, porcinos, roedores, camélidos, chimpancés, delfines y aves.

Diagnóstico micológico

El diagnóstico micológico incluye los siguientes procedimientos:

- Toma de la muestra
- Examen directo (en fresco y coloración)
- Cultivo e identificación fenotípica
- Histopatología
- Pruebas Serológicas
- Identificación molecular

Toma de muestra:

Los materiales que se usan para los estudios microbiológicos dependerán de las manifestaciones clínicas que presenten los pacientes.

Se realizará escarificación en las lesiones costrosas, raspado en los bordes del chancro de inoculación o por punción de nódulos, biopsias.

Examen microscópico directo en fresco: una alícuota del material purulento tomado de las lesiones se coloca en un portaobjetos y se le agrega 1 gota de KOH 10-40 %. Luego se observa en microscopio por 40 X aumentos. Se deben buscar levaduras polimorfas, aunque no siempre es posible visualizarlas.

Los extendidos (frotis) coloreados con los métodos de tinción microbiológicos tradicionales son de poca utilidad, ya que los elementos fúngicos se colorean mal. El pus y los cortes histológicos de biopsias de tejidos parasitados teñidos con los métodos de ácido peryódico de Schiff

(PAS) y Gomori Grocott asociados con hematoxilina eosina (HE) son los más convenientes para buscar el hongo.

En estos preparados se puede observar, por microscopía, las formas parasitarias de *S. schenckii* que se presentan como células levaduriformes esféricas, ovales o elongadas tipo cigarro o “navette” y con pocos brotes, en general en escaso número. Con la tinción de HE también se puede observar levaduras envueltas en un material eosinofílico (cuerpo asteroide). (Foto 1).

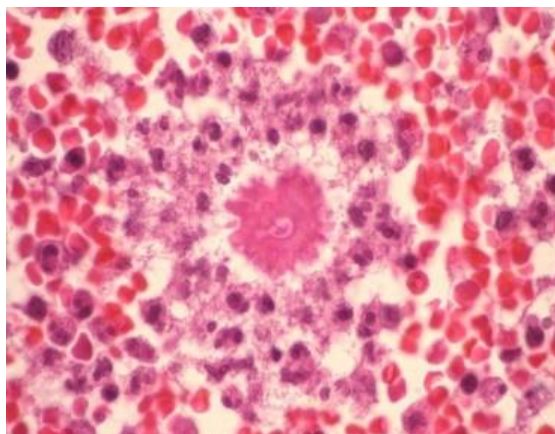


Foto 1. Tinción PAS. Célula asteroide. Reacción de Splendore-Hoeppli en el tejido del hospedador

Cultivo e identificación fenotípica:

Se utilizan el medio agar Sabouraud (ASG), agar Sabouraud más cloranfenicol (ASG-C), agar Sabouraud más cloranfenicol y cicloheximida (ASG-CC) y agar cerebro corazón (BHI, por sus siglas en inglés Brain Heart Infusion). La siembra se realiza en 2 tubos y se incuban uno a 26-28 °C, y otro a 35-37 °C en atmósfera de CO₂ con el fin de recuperar ambas fases. A partir del cultivo se estudia la macro y la micromorfología del microorganismo.

Macromorfología: la fase de levadura desarrolla entre los 3 y 5 días en agar BHI a 35-37 °C, con atmósfera de 5 % CO₂. Las colonias son cremosas, color blanco a crema.

La fase micelial desarrolla a 26-28 °C, el hongo crece en 3 a 5 días en los medios de rutina. En agar papa dextrosa la colonia puede ser blanca al inicio, con aspecto de levadura, cremosa, algo pigmentada, brillante, luego se torna membranosa, para finalmente cambiar a marrón oscura, gris, negra, parda o tostada debido a la presencia de un pigmento melánico.

Además, existen cepas blancas y distintas combinaciones, por ejemplo, centro de la colonia negro, bordes blancos; centro marrón, bordes blancos.

Micromorfología: a 37 °C las levaduras son redondas, ovoides, fusiformes, con gemación única o múltiple, con tamaño promedio de 1-3 x 3-10 µm.

A 25 °C, se observan hifas hialinas, finas septadas de 1-3 µm de diámetro, ramificadas, con conidióforos de 10 - 30 µm de largo con pequeños conidios hialinos de pared delgada, pirifor-

mes o redondos (2-3 x 3-6 µm), agrupándose en forma de “margarita o roseta” (cultivos jóvenes), luego aparecen conidios aislados sobre conidióforos o, a lo largo de las hifas (rabdosporos), presentando paredes gruesas, rugosas y oscuras. (Foto 2).

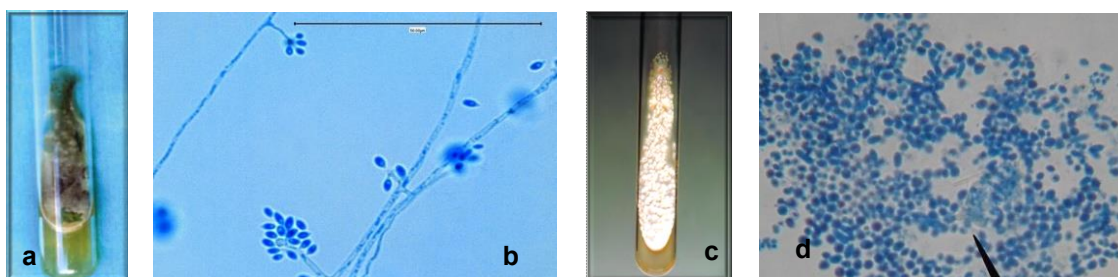


Foto 2. Macro y micromorfología de *Sporothrix* sp. en fase micelial y fase de levadura. a- Fase micelial o saprófita. Cultivo a 25-28 °C, pH 3 a 12. Colonia blanca o beige, con el tiempo tiende a pigmentarse; b- Hifas finas, ramificadas, septadas. Conidios ovoides o piriformes dispuestos en forma de “pétalos de margarita o roseta”. Rabdoconidios; c- Fase levaduriforme o parasitaria. Cultivo a 35-37 °C, pH 2,4 a 9,5; Colonias cremosas, glabras, blanco amarillentas; d-Levaduras ovoides, fusiformes, ≈ 1-3 x 3-10 µm.

Histopatología

En general, el estudio de las biopsias tomadas de las lesiones esporotricósicas muestra una reacción inflamatoria mixta, purulenta y granulomatosa, frecuentemente acompañada de fibrosis. Las tinciones de metenamina plata, Gridley o PAS son las que habitualmente se utilizan para evidenciar la presencia del hongo en los tejidos, sin embargo, no siempre es posible detectarlo.

Pruebas Serológicas

La detección de anticuerpos aglutinantes es útil en el diagnóstico temprano de la esporotricosis en sus distintas presentaciones: cutánea localizada, subcutánea diseminada o sistémica.

El sistema comercial LA-Sporothrix Antibody System® (IMMY, OK, EUA) [www.immy.com] es una prueba cualitativa de aglutinación de partículas de látex, se utiliza para determinar la presencia de anticuerpos de tipo IgM a partir del suero en pacientes con esporotricosis. La prueba es sensible, de rápida ejecución y detecta los anticuerpos aglutinantes cuando se unen a las partículas de látex cubiertas de antígenos de *Sporothrix*. La sensibilidad de la prueba varía de acuerdo a la presentación clínica: de 100 %, 86 %, 73% y 56 % para las formas diseminadas, articulares, pulmonares y la enfermedad cutánea, respectivamente. La especificidad de la prueba de LA - Sporothrix es 100 %.

Identificación molecular

Los primeros estudios realizados mediante el análisis del ADN mitocondrial por distintos autores describieron la heterogeneidad en cepas de *S. schenckii*.

Otros investigadores realizaron estudios de taxonomía molecular utilizando distintas técnicas entre las que se mencionan: el estudio de los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), la secuenciación de

las regiones de los espaciadores internos de transcripción (ITS), los estudios de polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP), y PCR M13 fingerprinting. En todos los estudios se demostró que los aislados de *S. schenckii* presentaban polimorfismo genético y se confirmó que se trataba de un complejo de especies.

En 2006 se estudió el polimorfismo de la secuencia de tres loci que codifican proteínas: quitina sintasa (gen *CHS*), beta-tubulina (gen *TUB*), y calmodulina (gen *CAL*) de aislados de diferentes regiones geográficas. El análisis combinado de los tres loci reveló la presencia de tres grupos principales, uno con los aislados europeos, otro con los aislados de Brasil, y el tercero con los aislados de otros países de América del Sur y África.

Recientemente propusieron un nuevo taxón: *Sporothrix chilensis* sp. nov., para cepas de un caso clínico de onicomicosis y cepas de origen ambiental de Chile. Los análisis de la región ITS 1/2 - 5.8S y de los genes β -*TUB*, *CAL* y el factor de elongación de la traducción (*TEF*) revelaron que *S. chilensis* es un miembro del complejo *S. pallida*, y el taxón más cercano es *S. mexicana*, una especie presente en el suelo, no patógena para los humanos.

Los análisis filogenéticos de región ITS 1/2 - 5.8S dividieron al género *Sporothrix* en dos grupos bien definidos con ecologías diferentes. Las especies incluidas en el complejo *S. schenckii* son con frecuencia los agentes de la esporotricosis humana y animal.

El complejo *S. schenckii* contiene las especies clínicamente relevantes: *S. brasiliensis*, *S. globosa*, y *S. luriei* además de *S. schenckii sensu stricto*, mientras que *S. mexicana* se agrupa en el complejo *Ophiostoma-Sporothrix* que está anidado dentro del orden Ophiostomatales.

Diagnóstico diferencial

En felinos la esporotricosis puede confundirse con otras patologías de origen infeccioso como la criptococosis, tuberculosis cutánea, nocardiosis, micetoma, leishmaniasis, histoplasmosis, y con procesos tumorales como el carcinoma de células basales.

Micetomas

El micetoma es una infección crónica de la piel y de los tejidos subyacentes con tendencia a afectar los huesos. Se caracteriza por un aumento de volumen relativamente indoloro y fístulas a través de las cuales se elimina pus y granos constituidos por filamentos.

Los agentes causales son de origen exógeno y pueden ser hongos miceliales (eumicetoma) o bacterias filamentosas aerobias Actinomicetales (actinomicetoma).

Epidemiología

Los micetomas se describen con mayor frecuencia en regiones de clima tropical o subtropical de México, Centro América, Venezuela, Colombia y Brasil, mientras que, en África, prevalece en Sudan, Senegal, Uganda, Egipto, Mauritania y Argelia; en Medio Oriente, India, Pakistán, y Bangladesh.

En Argentina, la frecuencia de presentación de casos de micetomas es relativamente elevada, principalmente, en el norte del país en donde los arbustos espinosos como las acacias son abundantes y los traumatismos producidos por espinas, son la fuente más frecuente de infección.

No se ha registrado la transmisión entre personas, ni entre animales, como tampoco de los animales a las personas.

Etiología

A diferencia de otras patologías, los micetomas son causados por unas 20 especies de hongos miceliales y además pueden ser causados por bacterias filamentosas aerobias del orden *Actinomycetales*.

Cuando el agente etiológico es un hongo se les da el nombre “eumicetoma” o “micetomas maduromicóticos” para diferenciarlo de los “actinomicetomas” causados por bacterias filamentosas.

Aquí se describirán solo las especies presentes en Argentina.

Micetomas maduromicóticos (eumicetomas)

En este tipo de micetomas los agentes causales pueden generar estructuras llamadas “granos negros” y son *Trematosphaeria (ex-Madurella) grisea*, y *Exophiala jeanselmei*; mientras que los agentes productores de “granos blancos” son: el complejo *Scedosporium apiospermum* complejo *Fusarium solani*, *Sarocladium kiliense* y *Acremonium recifei*.

Micetomas actinomicéticos (actinomicetomas)

Los agentes causales son *Nocardia brasiliensis*, *N. otitidiscaviarum*, *N. asteroides*, *Actinomyces madurae*, *A. pelletieri* y *Streptomyces somaliensis*.

A continuación, se hará una breve descripción de las características macro y micromorfológicas de los cultivos, la forma, color y tamaño de los granos de cada agente.

Descripción de los granos actinomicóticos

Los granos de los micetomas producidos por las diferentes especies de género *Nocardia* (*Nocardia brasiliensis*, *N. otitidiscaviarum*, *N. asteroides*) tienen el mismo aspecto; son blanco-amarillentos, de 150 a 200 µm de diámetro, blandos; se aplastan con facilidad.

Tinciones

En los cortes histopatológicos, con H&E, los granos de *Nocardia* sp. tienen forma arriñonada, de 200 µm de diámetro, la parte externa muestra clavos acidófilos bien marcadas y en el interior se observa un material ligeramente basófilo y granuloso. En los cortes teñidos con Kinyoun se ven bacterias filamentosas ácido-resistentes, con la coloración de Gram estos microorganismos se fragmentan en elementos cocoides o bacilares Gram+ y en los coloreados con la metenammina de plata de Grocott se observan filamentos bacterianos negros.

Cultivo

Las bacterias actinomicetales se cultivan en medios no enriquecidos. Las colonias son similares para las distintas especies, todas desarrollan bien a 37 °C y presentan colonias inicialmente plegadas, de color coral y consistencia pastosa, con el tiempo se cubren parcialmente de un vello corto blanquecino y que desprende un fuerte olor a tierra mojada. La diferenciación entre las especies se lleva a cabo mediante pruebas bioquímicas.

Actinmadura madurae

Los granos producidos por este microorganismo miden 1 a 2 mm de diámetro, son de color blanco amarillento, de consistencia blanda y polilobulados. En los extendidos de los granos aplastados presenta filamentos bacterianos largos, Gram-positivos, que no se fragmentan en elementos bacilares cocoides y no son ácido-resistentes con la coloración de Kinyoun.

Tinciones

En los cortes histopatológicos se observan granos grandes polilobulados, de 1 a 2 mm de diámetro, se observan los filamentos bacterianos, de color violeta; el borde externo está ocupado por reacciones acidófilas de Splendore-Hoepli.

Cultivo

A. madurae desarrolla bien en medios no enriquecidos a 37 °C, en 10 días forma colonias plegadas de color crema, superficie lisa y diámetros variables; el examen microscópico muestra filamentos bacterianos largos.

Actinmadura pelletieri

Genera granos de 500 a 900 μm de diámetro, de color rojo rubí y consistencia blanda; en los extendidos muestra las mismas características morfológicas y tintoriales de la especie anterior.

Tinciones

En los cortes histopatológicos teñidos con H & E se observan granos de 700 a 900 μm de diámetro, ovales, con un centro violeta, donde se encuentran los filamentos bacterianos y en el borde se ven radiaciones eosinófilas. (Foto 3).

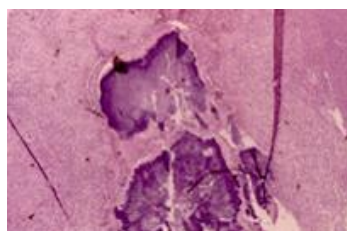
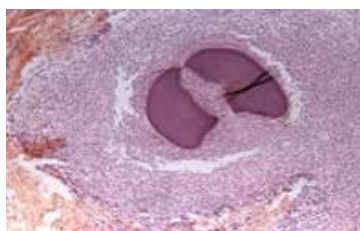
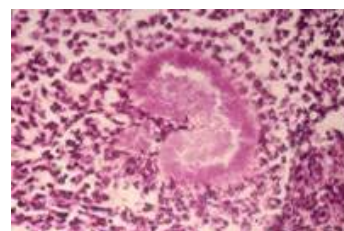


Foto 3. Grano de *Nocardia*



Grano de *A. pelletieri*



Grano de *A. madurae*

Cultivo

Desarrolla bien en medios no enriquecidos, incubados a 37° C, produce colonias color rojo rubí, plegadas, y de consistencia pastosa. Microscópicamente se observan las mismas características enunciadas en la especie anterior.

A. madurae desarrolla colonias de color blanco/crema, de aspecto húmedo, ceroso y arrugado, adherentes al medio de cultivo. Las colonias amarillas corresponden a *Nocardia asteroides* y las colonias de color rojo a *Micromonospora* spp. (Foto 4).

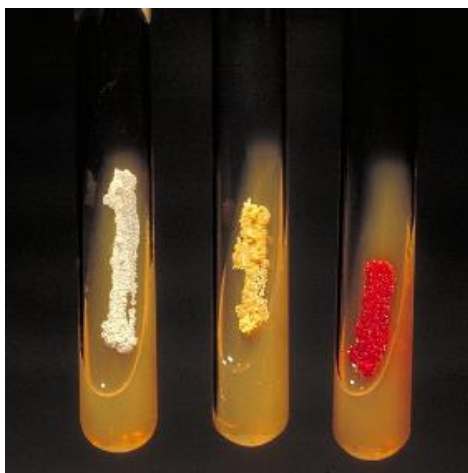


Foto 4. Cultivo en agar Sabouraud dextrosa a 37°C.

Streptomyces somaliensis

Los granos son de color ocre, de 1 mm de diámetro, consistencia dura, difíciles de aplastar. Desarrolla lentamente en medios no enriquecidos incubados a 37 °C, las colonias son de color ocre, pequeñas, plegadas, de consistencia semidura y con el tiempo se cubre de un vello blanquecino. Microscópicamente presenta filamentos bacterianos largos, Gram-positivos y no ácido-resistentes.

En los cortes histopatológicos teñidos con hematoxilina-eosina, los granos son ovales de 700 a 800 µm de diámetro, de contenido homogéneo, consistencia dura, en el borde externo presentan reacción de Splendore-Hoepli. (Foto 5).

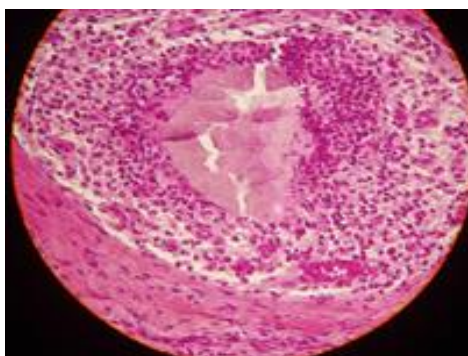


Foto 5. Grano de *S. somaliensis*

Granos maduromicóticos (eumicetoma)

Complejo *Scedosporium apiospermum*

Las especies del complejo *S. apiospermum* son las que se describen con mayor frecuencia como agentes productores de eumicetomas y generan granos blancos.

Los granos blancos miden 1 mm de diámetro, son homogéneos, de contornos curvos, ovales, reniformes o polilobulados, desprovistos de cemento, y en los cortes histológicos, presenta una coloración amarillo claro. En la zona periférica muestra una banda eosinófila con formaciones radiadas o auténticas clavav. La parte central del grano está ocupada por un fieltro de filamentos de regular densidad, en tanto que en la zona externa se observan dilataciones vesiculosas (clamidosporas) de pequeño tamaño.

Cultivo

El hongo desarrolla bien en los medios comunes de micología. Luego de 15 días de incubación las colonias son planas de 5 cm de diámetro, el micelio aéreo es velloso.

Micromorfología

El hongo es de micelio tabicado hialino, ramificado. Los conidióforos son erectos y llevan un conidio único, y se implanta en su extremo distal, de tipo aleuria, piriforme u oval, unicelular de 7,5 x 3 μm de diámetro. En algunas partes, los esporóforos se agrupan en coremios de 0,3 mm de altura y pigmentados.

La reproducción sexual se observa en agar-papa-zanahoria, incubación a 28 °C, 21 días, forma cleistotecios de 150 a 200 μm de diámetro, duros, de pared peridial rugosa, plectenquimatosa y pigmentada, que llega a alcanzar hasta 30 μm de espesor. Carece de ostiolo. En el interior hay ascos globosos, y contienen 8 ascosporas elípticas, de extremos ligeramente afilados que miden 7,5 x 4,5 μm .

Complejo *Fusarium solani*

Las especies del complejo *Fusarium solani* producen granos blanco-amarillentos de 0,5 a 2 mm de diámetro, de consistencia blanda, ovales o reniformes, polilobulados, en el centro hay filamentos hialinos, con tabiques espaciados, de un diámetro uniforme 2 a 3 μm . La parte externa muestra dilataciones vesiculosas en forma de botellas u ovales, de 5 a 10 μm , con escasa cantidad de cemento blanco-amarillento. El grano está rodeado por clavav acidófilas.

Cultivo

En medio agar Sabouraud, las colonias son de desarrollo rápido, con micelio aéreo abundante de color blanco. En el reverso y los bordes, aparece un pigmento lila o rojo violáceo, difusible en el medio de cultivo. Con el tiempo, las colonias se aplanan y el micelio aéreo se vuelve pulverulento.

Micromorfología

La observación microscópica a partir de los cultivos muestra un micelio vegetativo hialino, filamentosos, ramificado y tabicado, de 2 a 3 µm de diámetro, con clamidosporas esféricas, intercalares o terminales, aisladas o en grupos de 2 ó 3 elementos, de paredes gruesas y rugosas. Los conidióforos son erectos, en forma de fíalide afilada, a veces con un tabique; en su extremo distal se forman microconidios en forma de salchicha, no tabicados de 2 X 7 µm, agrupadas en conglomerados globosos. Los macroconidios son falciformes, presentan de 2 a 5 celdas, su diámetro oscila entre 3 y 4 µm, y su longitud varía de 5 a 30 µm. Pueden verse además mesoconidios de tamaño intermedio y con un tabique. A veces produce órganos nodulares.

Acremonium recifei

Es agente de micetomas podales de granos blancos. Produce granos idénticos a los de la especie anteriormente descrita.

Cultivo

Las colonias en medio de Czapek son de crecimiento lento, de 2 a 3 cm de diámetro, planas, con escaso micelio aéreo, blanco con el tiempo se tornan amarillo-verdosas en el centro. Los bordes tienen micelio aéreo más alto y blanco. En agar Sabouraud, forman colonias de color crema, de centro elevado y micelio corto, que después se tornan vellosas y de color grisáceo; producen un pigmento pardo difusible en el medio.

Micromorfología

La observación microscópica a partir de los cultivos muestra la formación de conidios muy pequeños, de 2 µm de longitud, falciformes y agrupados en conglomerados globosos. El micelio vegetativo no posee clamidosporas.

Sarocladium kiliense**Cultivo**

En agar Sabouraud, forma colonias circulares de 3 cm de diámetro, cuyo centro es elevado y con numerosas espículas formadas por los coremios; el resto de la colonia carece casi de micelio aéreo, es de aspecto céreo, color gris oscuro o canela y está surcada por pliegues radiados poco profundos. No tiene pigmento difusible.

Micromorfología

El micelio filamentosos es hialino, fino y tabicado, de 0,5 a 1,5 µm de diámetro. En agar sangre a 37 °C genera clamidosporas. Los conidióforos son erectos, sin tabiques, y miden de 15 a 30 µm de longitud. En su extremo distal presentan conglomerados de esporas de 5 a 11 µm de diámetro, que contienen de 6 a 24 conidios baciliformes, de 3 x 1,5 µm. Con frecuencia se forman coremios.

Exophiala jeanselmei

Forma granos pequeños, negros, blandos, huecos en el centro y de forma tubular.

El examen microscópico muestra filamentos cortos, de 2,5 a 3 μm de ancho, con artrosporas en cadena, de paredes gruesas y posee escasa sustancia intercelular. Los filamentos toman las coloraciones del PAS y de Gomori.

Cultivo

En agar Sabouraud, las colonias son inicialmente mucosas y negras, formadas por elementos unicelulares brotantes. Luego de 2 semanas de incubación a 28-30 °C, se observan colonias esféricas, de bordes bien definidos, con un micelio aéreo aterciopelado de color gris oscuro. En el reverso son negras y sin pigmento difusible.

Micromorfología

Microscópicamente el micelio es filamentososo, ramificado y tabicado de 2 μm de ancho, ligeramente pardo. Los esporóforos son simples, de 5 a 15 μm x 2 μm , con anelaciones en el punto de origen de los conidios.

Patogenia

Los agentes productores de micetomas son ambientales, viven en la tierra, sobre restos de vegetales, maderas y sustancias orgánicas en descomposición y la penetración al hospedador animal o a las personas, se hace a través de micro o macro traumas, en especial por pinchazos de espinas o astillas.

La progresión del micetoma se produce por contigüidad y sus agentes causales tienen la capacidad de invadir todos los tejidos, desde la piel hasta los huesos y articulaciones. Raras veces se propagan hacia los ganglios linfáticos regionales.

Entre los factores de virulencia de los agentes causales de micetoma figuran la capacidad de desarrollar a 37 °C, la producción de proteasas ácidas, colagenasas y elastasas, la capacidad de producir granos, la generación de melanina y la producción de una matriz intercelular amorfa.

La alteración más típica es la presencia de los granos, que pueden estar formados por hifas de hongos verdaderos, entrelazadas en forma más o menos densa y unidas entre sí por una sustancia cementante acidófila o bien, formados por filamentos bacterianos de actinomicetos cuya afinidad por la hematoxilina varía con los distintos agentes causales.

Rodeando a los granos hay reacción inflamatoria con polimorfonucleares neutrófilos y en menor cantidad con eosinófilos, alrededor a esta parte central abscedada, se observa un granuloma epitelioides, la cantidad de células gigantes está relacionada a la cantidad de cemento que contienen los granos del agente causal. La parte más externa está constituida por una respuesta de células mononucleares y fibras colágenas, responsable de la dureza de los nódulos y de los infiltrados de consistencia leñosa observados en la exploración clínica.

Manifestaciones clínicas

En general las lesiones inician con la formación de nódulos que pueden fistulizar y dar salida a una secreción purulenta o serosanguinolenta con granos.

Los granos causados por *Nocardia* son de evolución rápida, con formación de varias fistulas drenantes.

Para el resto de las presentaciones de los micetomas el crecimiento es lento, y pueden transcurrir más de 6 meses para alcanzar los 2 cm de diámetro y fistulizarse. La infección puede progresar a través de las aponeurosis, a las cuales perfora, las destruye hasta invadir el tejido óseo y las articulaciones. Este proceso puede llevar más de 3 años.

Diagnóstico

El diagnóstico definitivo se realiza mediante el aislamiento e identificación del agente causal. Es importante coleccionar al menos 5 mL o más de secreción purulenta para realizar la observación microscópica en fresco y con coloración y para sembrar en los medios de cultivo adecuados.

Los estudios histopatológicos se realizan en cortes teñidos con H & E, metenamina plata de Grocott y Kinyoun, en ocasiones también se realizan coloraciones de Gram para tejidos como la de Brown Breen.

Medios de cultivo

Se usan el agar glucosa de Sabouraud sin antibióticos, agar caldo glicerinado al 5 %, el medio de Lowenstein Jensen, medio Thayer- Martin y agar infusión de cerebro y corazón. Los cultivos se incuban a 28 °C, 37 °C y 42 °C durante 1 y 4 semanas.

Es conveniente separar y lavar varias veces a los granos en agua destilada estéril para eliminar a la mayor cantidad de bacterias u hongos contaminantes que puedan acarrear en su superficie.

Si la observación microscópica confirma la presencia de hifas, se deben usar medios de cultivo adicionados con antibacterianos. La incubación se realiza a 28 °C y 37 °C durante 4 semanas. Si la muestra es escasa, es necesario realizar una biopsia que incluya material óseo.

La identificación de los agentes causales de los micetomas maduromicóticos se hace en base a las características macromorfológicas y micromorfológicas de las colonias, incluyendo la realización de cultivos en lámina y algunas pruebas fisiológicas como la temperatura óptima de crecimiento.

La identificación definitiva se realiza con técnicas moleculares.

Diagnóstico diferencial

El diagnóstico diferencial debe hacerse con otras patologías granulomatosas, pitiosis, esporotricosis, otras feohifomicosis.

En las tablas 1 y 2 se resumen las principales características de los micetomas.

Tabla 1. Principales diferencias entre los eumicetomas y actinomicetomas

Agente etiológico	Color de los granos	Diámetro (mm)	Consistencia
<i>Actinomadura madurae</i>	Blanco amarillo	1,5-2	Blando
<i>Actinomadura pelletieri</i>	Rojo	0,2-0,5	Duro
<i>Nocardia asteroides</i>	Blanco	<0,5	Blando
<i>Nocardia brasiliensis</i>	Blanco-naranja	<0,5	Blando
<i>Streptomyces somaliensis</i>	Amarillo	0,5-2	Duro

Tabla 2. Color, tamaño y consistencia de los granos según el agente causal

	Eumicetoma	Actinomicetoma
Agente etiológico	Hongos	Bacterias
Lesión	Encapsulada, delimitada	Difusa
Fístulas	Escasas	Muchas
Color de los granos	Blancos, negros	Distintos colores, nunca negros
Evolución	Lenta	Rápida
Compromiso óseo	Tardío	Rápido

Pseudomicosis

Las pseudomicosis comprenden un grupo de manifestaciones clínicas compatibles con micosis verdaderas, aunque los agentes etiológicos no son hongos, sino que pertenecen a grupos muy diversos de microorganismos, tales como bacterias (*Actinomycetales*, ya descrito en este capítulo como actinomicetomas), protozoos acuáticos (*Rhinosporidium* spp.), o Reinos muy extraños como Stramenopila (*Pythium* spp.).

Debido a la particularidad de las presentaciones clínicas tan similares a las causadas por eumycetos, se los agrupa como agentes de “pseudomicosis”.

Rinosporidiosis

Esta pseudomicosis es causada por el *Rhinosporidium seeberi* (Protista superior o eucariota de clasificación incierta, descrito por **Guillermo Seeber** en Argentina en 1896), que se caracteriza por ser una enfermedad granulomatosa y crónica que afecta a las personas, a los caballos, a los perros y en menor medida a las cabras, gatos, zorros y aves.

Se presenta especialmente en mucosas, como una tumoración de aspecto polipoideo y aframbuesado. En la superficie de estas lesiones aparece un puntillado blanco-amarillento típico rico en esférulas grandes llenas de esporangiosporas (Foto 6).

Con el tiempo el enfermo tiene sensación de cuerpo extraño intranasal, prurito y secreción. La localización que sigue en frecuencia es la ocular, y se la ha relacionado con traumatismos de la conjuntiva ocasionados por granos de arena.

Ocasionalmente se observan lesiones en otras partes del cuerpo.



Foto 6. Rinosporidiosis en ollar de caballo. (Gentileza Dr. Ramón López)

Los animales comúnmente infectados son los solípedos. En ellos es frecuente encontrar pólipos de variada forma y tamaño, que nacen directamente sobre la mucosa del ollar o sobre cortos pedúnculos, en rarísimos casos el parásito puede diseminarse por vía hematógena.

Diagnóstico

Observación microscópica

En los tejidos infectados, la forma parasitaria de *R. seeberi* se manifiesta con la formación de esporangios (esférulas) que alcanzan de 6 a 300 μm de diámetro, dependiendo del estado de crecimiento en su ciclo biológico.

Los esporangios maduros tienen una espesa pared celular constituida por quitina y celulosa, en su interior contienen de 16.000 a 20.000 endosporas de 6-7 μm de tamaño (Foto 7). Cuando los esporangios están completamente maduros, las endosporas son liberadas por ruptura de la pared celular.

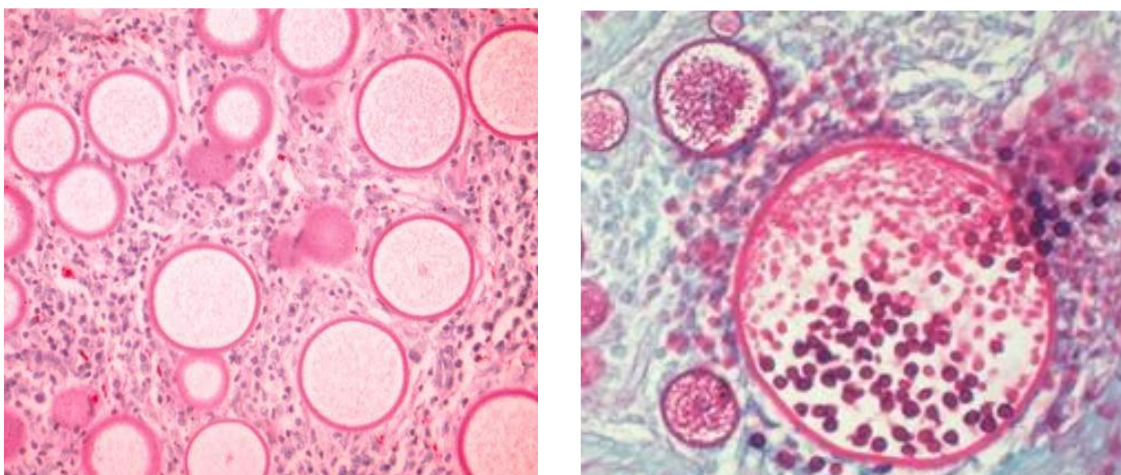


Foto 7. Corte histológico de un pólipo nasal. Tinción PAS (x10 y x40).
Esférulas de diferente tamaño con endosporos.

Epidemiología

La fuente de infección está asociada a sistemas dulceacuícolas, las personas y animales que nadan o abrevan en aguas estancadas, adquieren generalmente la enfermedad, lo que sugiere que el hábitat de este protozoario es acuático o subacuático.

En nuestro país, la rinosporidiosis está descrita en zonas de climas húmedos, templados y subtropicales como son la cuenca de los ríos Pilcomayo, Bermejo, Paraná y Río de la Plata. La mayoría de los casos diagnosticados en personas y animales han sido encontrados en la provincia de Chaco.

Diagnóstico de Laboratorio

El *R. seeberi* no desarrolla en los medios de cultivo comunes, tampoco desarrolla luego de ser re-inoculado en animales de laboratorio, aunque, recientemente se logró su aislamiento en condiciones experimentales.

El diagnóstico presuntivo de la rinosporidiosis se basa en la observación microscópica directa de las esférulas entre porta y cubreobjetos, mientras que la confirmación diagnóstica debe realizarse a través de técnicas de biología molecular.

Histopatología

Los cortes histológicos coloreados con H & E son muy útiles para la identificación del hongo en los tejidos. Las coloraciones especiales como Gomori-Grocott y PAS son de elección para evidenciar las endosporas en el interior de las esférulas.

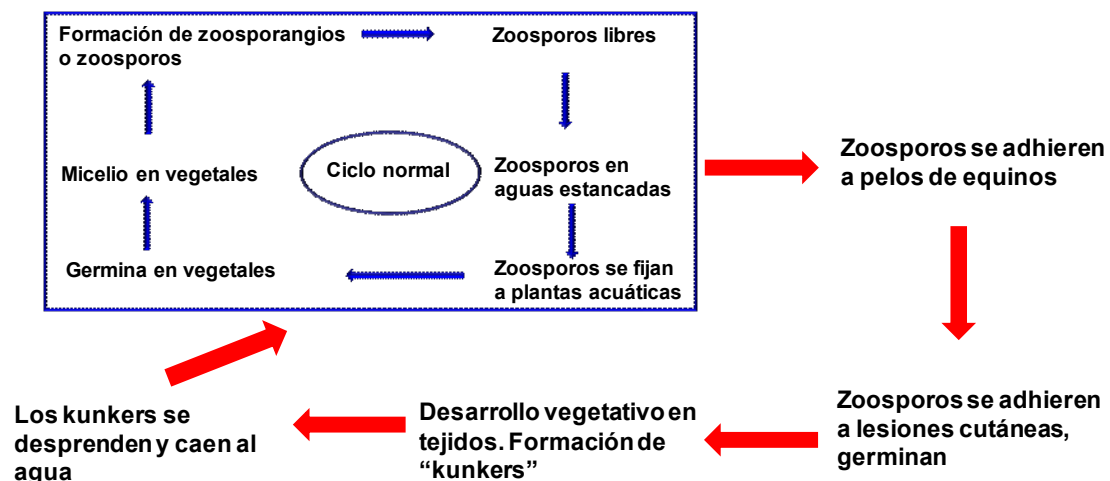
Pitiosis

La pitiosis, es una enfermedad granulomatosa crónica que afecta a las personas y a varias especies animales, es causada por *Pythium insidiosum*.

Pythium spp., tiene una ubicación filogenética no muy clara, no obstante, el más reciente estudio filogenético ubica a este género en el Reino *Stramenopila*, Phylum *Oomycota*, Orden *Peronosporales* y Familia *Pythiaceae*. Tiene la particularidad de generar zoosporas móviles.

Este microorganismo desarrolla un micelio muy parecido al de los Eumycetos, pero **no es un hongo verdadero** (no pertenece al Reino Fungi), ya que su pared celular no contiene quitina, está compuesta de celulosa, β -glucanos, la membrana celular carece de ergosterol y posee zoosporas móviles. Esta infección es considerada emergente.

Ciclo de vida de *Pythium insidiosum*



Epidemiología

Esta micosis ha sido descrita en Brasil, Venezuela, Colombia, Argentina, Costa Rica, Guatemala, Panamá, Nicaragua, Haití y Estados Unidos, en algunos países europeos y en el sures-

te asiático. Las condiciones ambientales son determinantes para el desarrollo del organismo en su ecosistema.

Para que sea posible la producción de zoosporos son necesarias temperaturas entre 30 y 40 °C, además del acúmulo de agua en regiones inundables. La gran mayoría de los casos de pitiosis fue observada durante o después de la estación lluviosa.

Los primeros casos fueron descritos en caballos, y se los llamó “bursitis, dermatitis granular, hyphomycosis destruens equina o cáncer de los pantanos”.

A partir de técnicas de inmunodifusión y anticuerpos fluorescentes, se demostró que *P. insidiosum* es patógeno para caninos, caballos y personas mientras que otras especies de *Pythium* son fitopatógenos.

Formas clínicas

En caballos, la presentación más frecuente de la pitiosis es la cutánea, en caninos la forma más frecuente es la gastrointestinal y cursa con lesiones en el estómago e intestino, mientras que en los felinos la forma más común es la respiratoria.

Las lesiones cutáneas en equinos se caracterizan por ser de crecimiento lento, insidioso, circulares y ulceradas hasta formar grandes granulomas de hasta 50 cm de diámetro. Se ubican por lo general en la zona inguinal ventral, sitios que están en contacto con las aguas; sin embargo, se han reportado en la cara, nariz y cavidad oral.

En la pitiosis cutánea equina se observan estructuras sólidas llamadas *kunkers* no reportadas en lesiones de bovinos o caninos y tienen su origen en el acúmulo focal de eosinófilos alrededor de las hifas.

En personas la pitiosis se limita a las extremidades, con lesiones nodulares cutáneas o subcutáneas, ulceradas con secreción serosanguinolenta.

Diagnóstico

Histopatología

En las biopsias de los tejidos lesionados se realiza inmunohistoquímica para detección de las hifas e histoquímica para morfometría de hifas con coloración H&E y Gomori. Con histoquímica H & E se observa reacción granulomatosa eosinófila de Splendore – Hoepplii

Cultivo

Las muestras clínicas se cultivan en agar Sabouraud dextrosa a 37 °C. Las colonias son blanquecino-amarillentas planas de distribución radial, sin hifas aéreas. El aspecto macroscópico de las colonias es similar al que presentan algunos dermatofitos.

Glosario

Chancro: lesión que se forma en el sitio de ingreso al organismo por inoculación traumática del patógeno fúngico.

Clamidospora: elemento de resistencia formada por la diferenciación directa del micelio, con pared celular gruesa y citoplasma concentrado. Su diámetro es mayor que el de los filamentos en los que se forma.

Cleistotecio: estructura sexual habitualmente esférica, en la cual están contenidos ascos con ascosporas en su interior.

Conidióforo: hifa aérea especializada que sostiene y da origen a las conidias. Algunos conidióforos se dilatan en su extremo, y sobre esta superficie se forman numerosos pedúnculos en forma de frasco, de donde salen los conidios en cadenas (catenoide). La porción dilatada del conidióforo se denomina vesícula, las estructuras en forma de frasco son los esterigmas o fiálides. Los conidióforos pueden estar libres sobre el micelio, ya sea aislados o en grupos, o encontrarse agrupados o encerrados en estructuras especiales, que de acuerdo a su forma reciben el nombre de picnidios (piriformes) o acérvulos (almohadillas), esporodoquios (agrupaciones de conidióforos).

Conidia/Conidio: espora formada como consecuencia de un proceso de reproducción asexual. Son generados en forma exógena, aisladamente o en grupos, ya sea directamente sobre células independientes (levaduras), sobre el ápice y/o los lados de las hifas o sobre estructuras especializadas denominados conidióforos (miceliales). Los conidios se separan del punto de unión por pinzamiento o compresión. Pueden clasificarse por forma, tamaño, anatomía, etc. **Dimorfo:** que tiene dos formas. Se refiere a las formas filamentosas/levaduriformes que desarrollan ciertos hongos patógenos a diferentes temperaturas.

Hialino: transparente o translúcido como el vidrio. Se aplica en biología a los tejidos y órganos que muestran ese aspecto

Hialohifomicetes: hongos miceliales que presentan micelio hialino o con pigmentos claros, nunca negros o marrones.

Hifas: filamentos que forman el tallo o cuerpo de un hongo.

Macroconidia: la más grande de dos tipos de conidias de hongos (> 5 µm).

Mesoconidios: conidios pluriseptados sin célula basal.

Micelio. Conjunto de hifas o filamentos de un hongo.

Microconidia: la más pequeña de dos tipos de conidias en hongos (< 5 µm).

Saprophyto: cualquier microorganismo vegetal que obtiene su nutrición de materia orgánica muerta.

Sésil: adherido directamente por la base, sin un pedículo.

Zoosporas: es una espora asexual mótil provista de flagelos para locomoción; producida dentro de esporangios propios de algunos hongos y algas.

Referencias

- Arenas, R.A. *Micología Médica Ilustrada*. 5° edición, Ed. McGraw Hill Interamericana (2014).
- Brandolt TM, Madrid IM, Poester VR, Sanchotene KO, Basso RP, Klafke GB, Rodrigues ML, Xavier MO. (2018). *Human sporotrichosis: A zoonotic outbreak in southern Brazil, 2012-2017*. Med Mycol. doi: 10.1093/mmy/myy082.
- Córdoba S, Isla G, Szusz W, Vivot W, Hevia A, Davel G, Canteros CE. (2018). *Molecular identification and susceptibility profile of Sporothrix schenckii sensu lato isolated in Argentina*. Mycoses. doi: 10.1111/myc.12760.
- de Miranda LHM, Meli M, Conceição-Silva F, Novacco M, Menezes RC, Pereira SA, Sugiarto S, Dos Reis ÉG, Gremião IDF, Hofmann-Lehmann R. (2018). *Co-infection with feline retrovirus is related to changes in immunological parameters of cats with sporotrichosis*. PLoS One. 30;13(11):e0207644. doi: 10.1371/journal.pone.0207644. eCollection 2018.
- de Souza EW, Borba CM, Pereira SA, Gremião IDF, Langohr IM, Oliveira MME, de Oliveira RVC, da Cunha CR, Zancopé-Oliveira RM, de Miranda LHM, Menezes RC. (2018). *Clinical features, fungal load, coinfections, histological skin changes, and itraconazole treatment response of cats with sporotrichosis caused by Sporothrix brasiliensis*. Sci Rep. 13;8(1):9074. doi: 10.1038/s41598-018-27447-5.
- Dowst M, Pavuk A, Vilela R, Vilela C, Mendoza L. (2019). *An unusual case of cutaneous feline pythiosis*. Med Mycol Case Rep. Oct 31;26:57-60. doi: 10.1016/j.mmcr.2019.10.004. eCollection 2019 Dec.
- Kaadán MI, Dennis M, Desai N, Yadavalli G, Lederer P. (2020). *One Health Education for Future Physicians: A Case Report of Cat-Transmitted Sporotrichosis*. Open Forum Infect Dis. 12;7(3):ofaa049. doi: 10.1093/ofid/ofaa049. eCollection 2020 Mar.
- Lacerda Filho AM, Cavalcante CM, Da Silva AB, Inácio CP, de Lima-Neto RG, de Andrade MCL, Magalhães OMC, Dos Santos FAG, Neves RP. (2019). *High-Virulence Cat-Transmitted Ocular Sporotrichosis*. Mycopathologia. 184(4):547-549. doi: 10.1007/s11046-019-00347-6. Epub 2019 Jun 22.
- Reinoso EH, Córdoba SB, Reynaldi FJ. (2019). *Esporotricosis* En: Microbiología Veterinaria. Editor Jefe Néstor Oscar Stanchi 3° Edición Editorial Inter-Médica. ISBN 978-950-555-321-1. <http://www.intermedica.com.ar>.
- Tartor YH, Hamad MH, Abouzeid NZ, El-Belkemy FA. (2020). *Equine pythiosis in Egypt: clinico-pathological findings, detection, identification and genotyping of Pythium insidiosum*. Vet Dermatol. 28. doi: 10.1111/vde.12845.

CAPÍTULO 8

Antifúngicos. Pruebas de sensibilidad

Susana Beatriz Córdoba

Si buscas resultados distintos no hagas siempre lo mismo

Albert Einstein, 1879-1955

En los últimos años se produjo un importante avance en el diagnóstico de enfermedades causadas por distintas especies de hongos, muchas de las cuales son consideradas como patógenos emergentes menos sensibles a los antifúngicos de uso convencional.

Este nuevo escenario generó la necesidad de implementar en los laboratorios clínicos el uso de pruebas de sensibilidad para conocer el comportamiento *in vitro* de los fármacos frente a los patógenos fúngicos.

Algunas micosis son de difícil diagnóstico y tratamiento por lo que resulta prioritario conocer el perfil de sensibilidad de las especies circulantes en la región con el fin de colaborar en la elección del tratamiento más adecuado y eficaz.

En este Capítulo abordaremos el estudio de los antifúngicos de uso habitual y las pruebas de sensibilidad generalmente utilizadas en los Laboratorios de Veterinaria.

Antifúngicos

Se entiende por antifúngico o antimicótico a toda sustancia que tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de algunos tipos de hongos o incluso, de provocar su muerte.

En las tablas 1 y 2 se muestra una clasificación de los antifúngicos disponibles para uso clínico.

Tabla 1. Antifúngicos empleados en micosis sistémicas

Grupo	Antifúngicos
Polienos	Anfotericina B
Pirimidinas fluoradas	5-Fluorocitosina
Azoles	Imidazoles: ketoconazol, miconazol
	Triazoles: fluconazol, itraconazol, isavuconazol, voriconazol, posaconazol
Lipopéptidos Equinocandinas	Caspofungina, anidulafungina, micafungina

Tabla 2. Antifúngicos de uso tópico

Grupo	Antifúngicos
Polienos	Nistatina, natamicina
Azoles	Imidazoles: butoconazol, bifonazol, clotrimazol
	Triazoles: terconazol, fluconazol, itraconazol
Alilaminas	Terbinafina, naftifina, butenafina, amorolfina
Tiocarbamatos	Tolnaftato
Otros	Ioduro de potasio, ciclopirox, griseofulvin.

Según el sitio de acción en la célula fúngica, los antifúngicos se agrupan como se muestra en la tabla

Antifúngicos que actúan sobre la membrana
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Polienos ✓ Azoles ✓ Alilaminas ✓ Tiocarbamatos
Antifúngicos que actúan sobre la pared
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Lipopéptidos (equinocandinas)
Antifúngicos que actúan sobre el núcleo
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Pirimidinas fluoradas

Resistencia a los antifúngicos

Antes de avanzar con la descripción de los antifúngicos es conveniente recordar una serie de conceptos vinculados a la resistencia.

Definición de sensibilidad o resistencia

La forma más habitual de determinar si un hongo es sensible o resistente a los antifúngicos es mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM).

Existen dos puntos de vista a tener en cuenta, el microbiológico y el clínico.

Desde un punto de vista microbiológico una cepa es resistente a un antimicrobiano cuando su CIM es más elevada que la habitual para esa especie.

Para conocer y definir la CIM habitual del antifúngico frente a esa especie es necesario realizar la sensibilidad frente a un número representativo de cepas y determinar la distribución de las CIM y la CIM moda. De esta forma se determina los que se denomina CIM elevada desde el punto de vista microbiológico.

En la figura siguiente se puede observar un ejemplo

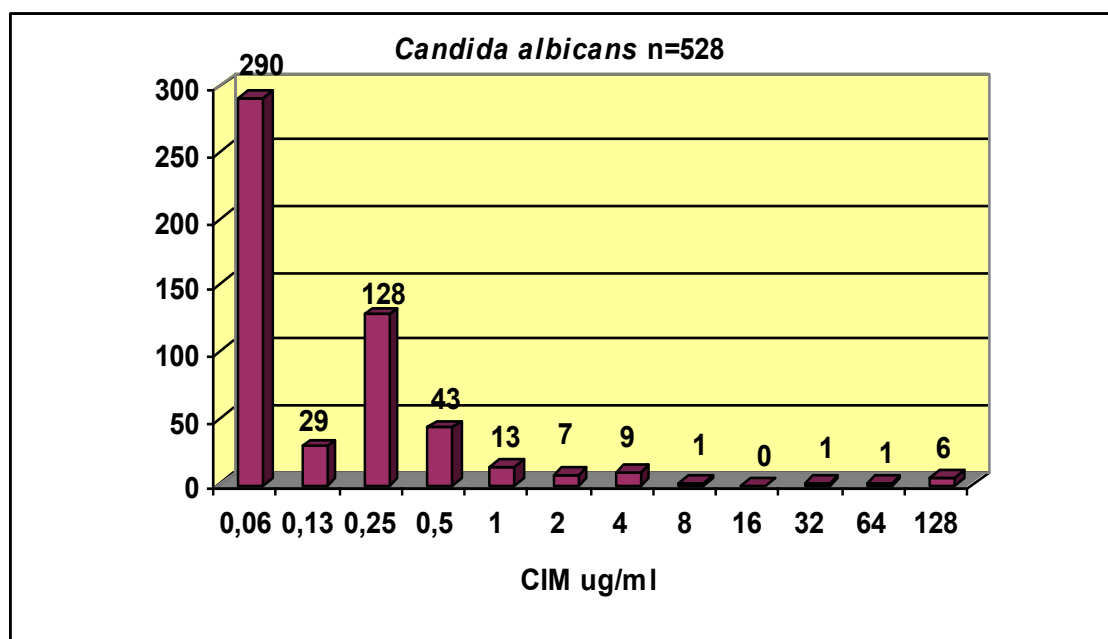


Figura 1. Distribución de las CIM de fluconazol de 528 aislados de *C. albicans*

En este gráfico se muestra la distribución de las CIM de fluconazol frente a 528 aislados de *C. albicans*. Como se puede observar, la distribución tiende a ser bi modal, con dos picos. La moda de esta distribución está en 0,06 mg/L, con el 54,3 % de las cepas. Por lo tanto, desde un punto de vista microbiológico y atendiendo a este ejemplo, un aislado de *C. albicans* con una CIM de 1 mg/L es microbiológicamente resistente puesto que ya no está dentro de los límites (0,06-0,5 mg/L) de la población habitualmente sensible de *C. albicans*.

Desde el punto de vista clínico hay que tener en cuenta que cepas consideradas resistentes microbiológicamente pueden responder perfectamente a un tratamiento, ya que la concentración del fármaco en el lugar de la infección puede ser mucho más elevada que la CIM del microorganismo. En consecuencia, para clasificar a un microorganismo como resistente clínicamente es acertada la definición propuesta por Kerridge y cols “un hongo es resistente a un antifúngico cuando continúa creciendo y produciendo síntomas a pesar de que la concentración del fármaco es máxima en el lugar de la infección”.

En condiciones ideales, para clasificar a un microorganismo como clínicamente resistente se debería conocer la CIM del mismo y la concentración que está alcanzando el antifúngico en la zona de infección. Además, se debería recuperar al microorganismo en el sitio de la infección.

Con independencia de la situación clínica en particular, cuando se hable de resistencia, los siguientes conceptos deben estar claros:

Resistencia intrínseca: cuando ningún miembro de una especie es sensible a un antifúngico.

En este caso, en realidad, corresponde utilizar el término insensibilidad, ya que se trata de toda una especie y no de alguno de sus miembros. Ejemplo: *C. krusei* y fluconazol.

Resistencia primaria: este término se aplica cuando una cepa perteneciente a una especie normalmente sensible al antifúngico, posee una resistencia natural al mismo sin necesidad de haber estado en contacto con el compuesto. Ejemplo: cepas de *C. albicans* y 5-fluorocitosina.

Resistencia secundaria: cuando una cepa previamente sensible adquiere resistencia al compuesto tras haber entrado en contacto con él. Ejemplo: *C. albicans* con 5-fluorocitosina y fluconazol.

Bases Moleculares de la resistencia a los antifúngicos

Se describen cuatro mecanismos bioquímicos de resistencia a antifúngicos:

1. Alteración de la membrana celular que conlleva una menor permeabilidad a los antifúngicos (azoles).
2. Defecto de alguna enzima, que el antifúngico necesita para sufrir una modificación estructural, que lo hace activo o para ser transportado al interior del hongo y ejercer su acción (5-fluorocitosina).
3. Aumento de la síntesis de compuestos naturales del hongo que compiten con el antifúngico o con sus derivados activos formados en el interior celular. Este aumento en la síntesis se debe a una mayor actividad de las enzimas responsables de la misma, o a una pérdida en su regulación (5-fluorocitosina).
4. Desaparición de la diana o cambio estructural de la misma, de forma que el antifúngico no puede ejercer la acción sobre la misma (polienos y azoles).

En cuanto a la base genética, se conocen distintos mecanismos:

1. **Mutaciones cromosómicas:** en la mayoría de los casos la resistencia a antifúngicos se debe a mutaciones cromosómicas puntuales. En general, se requieren varias mutaciones sucesivas para la expresión completa de la resistencia. También puede ocurrir que los genes de resistencia estuvieran presentes en un pequeño número de células de la población, o bien en el caso de hongos diploides y herencia recesiva en uno solo de los dos alelos.
2. **Mutaciones extracromosómicas:** en mutantes de laboratorio de *S. cerevisiae* resistentes al miconazol se demostró el origen mitocondrial de esta resistencia.
3. **Segregación mitótica de homocigotos resistentes:** en el caso de la 5-fluorocitosina se sabe que existen heterocigotos de *C. albicans* que son menos sensibles (resistencia parcial) que los homocigotos sensibles normales. Estos heterocigotos se seleccionan en presencia de concentraciones muy bajas del antifúngico, con

lo que aumenta la probabilidad de que aparezcan por segregación mitótica nuevos homocigotos totalmente resistentes.

A continuación, se hará una breve descripción de los principales antifúngicos utilizados para el tratamiento de las micosis.

Polienos

Los polienos son moléculas macrólidas que presentan un amplio espectro de actividad antifúngica. Se conocen más de 200 compuestos dentro de esta clase que comparten varias características comunes, como son la baja solubilidad en agua, la escasa biodisponibilidad digestiva, lo que conlleva que no existan presentaciones orales de estos fármacos, y la toxicidad para las células eucariotas.

Anfotericina B

Este antifúngico no está licenciado para su uso en veterinaria, aunque se la utiliza para el tratamiento de las micosis más severas. En 1957 se licenció como fármaco de uso clínico humano, a pesar de su toxicidad, escasa solubilidad y sensibilidad a la luz ultravioleta. El fármaco se mezcla con desoxicolato acuoso y solo puede administrarse vía intravenosa, si bien la solución es más estable y homogénea, resulta tóxica para las personas y animales.

Mecanismos de acción

El mecanismo de acción de la anfotericina B, de la nistatina y de otros polienos consiste en la unión, especialmente, con el ergosterol de la membrana plasmática de los microorganismos. Tras la unión se produce la rotura de la membrana plasmática. Los polienos se unen irreversiblemente, siendo su tasa de absorción dependiente de la temperatura y de la energía.

Anfotericina B es un fármaco fungicida, pero sólo a concentraciones elevadas, las cuales no suelen alcanzarse *in vivo*. A concentraciones más bajas, detiene o lentifica el crecimiento del hongo.

Uso clínico

La anfotericina B desoxicolato se utiliza para el tratamiento de las candidosis invasoras, criptococosis meníngea, histoplasmosis, y en general para cualquier micosis sistémica. Se emplea sola o en combinación con la 5-fluorocitosina en la terapia de la criptococosis grave o del sistema nervioso central. Asimismo, está indicada para tratar infecciones oportunistas por hongos miceliales (aspergilosis, zigomicosis).

En infecciones localizadas como queratitis, endoftalmitis, artritis y abscesos cerebrales pueden emplearse inyecciones intraoculares, intra articulares o intratecales del fármaco.

Efectos adversos

La anfotericina B es una molécula tóxica para las células de los mamíferos, puede ocasionar daño renal irreversible. Los efectos relacionados con la infusión pueden minimizarse con la administración de antihistamínicos, corticoides y paracetamol.

La nefrotoxicidad se caracteriza por daño glomerular y pérdidas tubulares de potasio, insuficiencia renal, hiperpotasemia y acidosis metabólica por uremia. Otros efectos adversos relacionados con la anfotericina B son hipomagnesemia, anemia, leucopenia y trombocitopenia.

Nistatina

La nistatina produce unos efectos tóxicos tan graves que no puede emplearse en infusión parenteral. Su mecanismo de acción es similar al de la anfotericina B, así como su espectro de actividad *in vitro*. Su uso se reserva para tratamiento tópico, principalmente en perros y gatos para el tratamiento de otitis y dermatosis.

Natamicina

Este polieno está licenciado para uso en veterinaria, solo para bovinos y equinos. Tiene moderada actividad frente a levaduras y *Aspergillus*. En algunos países se la utiliza para descontaminar el ambiente. Es una droga muy tóxica.

Resistencia primaria y secundaria

La resistencia primaria a los polienos es poco frecuente, aunque algunas especies de *Scedosporium*, *Fusarium*, así como *Candida haemulonii* y *Candida auris* puede ser resistentes a la anfotericina B sin que los pacientes hayan recibido tratamientos previos con este polieno.

A pesar de la amplia utilización de estos compuestos durante los últimos 70 años, la incidencia de resistencia secundaria es muy baja.

Mecanismos de resistencia

La base bioquímica de la resistencia a los polienos es la sustitución del ergosterol por varios precursores que tienen grupos metilo en posiciones 4 y 14 y que están más cercanos al lanosterol. Existen, además, otras bases bioquímicas.

5-fluorocitosina

La 5-fluorocitosina es una pirimidina que actúa como potente inhibidor de la síntesis de macromoléculas. Este compuesto es un profármaco que debe ser metabolizado por las enzimas fúngicas para ser activo.

Mecanismo de acción

Tras su transporte a través de la membrana celular mediante una citosina-permeasa, la 5-fluorocitosina es convertida en 5-fluorouracilo mediante una citosina-desaminasa. El 5-fluorouracilo es convertido por una uridina monofosfato-pirofosforilasa en 5-fluorouridina monofosfato, precursor de la síntesis de RNA aberrante. Los hongos son incapaces de transportar el fluorouracilo que es tóxico para las células de mamífero.

Espectro de actividad y uso clínico

La 5-fluorocitosina se absorbe por vía oral. Las especies sensibles a 5-fluorocitosina pertenecen a los géneros *Candida*, *Cryptococcus* y algunos hongos dematiáceos.

La combinación de anfotericina B y 5-fluorocitosina es el tratamiento de elección de la criptocosis sistémica, o para la forma meníngea.

Efectos adversos

La toxicidad de este antifúngico se produce por medio de uno de sus metabolitos, el 5-fluorouracilo que es una molécula tóxica para la médula ósea. Las bacterias intestinales pueden convertir la 5-fluorocitosina en este compuesto. En ocasiones puede producir alteraciones que se acompañan de diarrea, colitis y afectaciones hepáticas. Los efectos adversos más frecuentes son leucopenia y trombocitopenia.

Resistencia primaria y secundaria

La resistencia primaria es frecuente en especies de *Candida*. La aparición de resistencia secundaria es frecuente cuando se la administra como monodroga.

Mecanismos de resistencia

La resistencia a la 5-fluorocitosina puede ser por deficiencia o carencia de una de las enzimas implicadas en su acción como por ejemplo la citosina-permeasa, la citosina-desaminasa o la uridina monofosfato pirofosforilasa. También puede ocurrir por un aumento en la producción de pirimidinas que compiten con los metabolitos fluorinados que se derivan de la 5-fluorocitosina. Se cree que todos estos mecanismos ocurren en algún grado, en los aislados resistentes. En *C. albicans* la causa más frecuente de la resistencia es la alteración de la uridina monofosfato pirofosforilasa.

Azoles

Los azoles son antifúngicos que presentan amplio espectro de actividad y limitados efectos adversos. Los triazoles son de elección ya que permiten tratar eficazmente muchas infecciones fúngicas, reduciendo la toxicidad que invariablemente se asocia a otros antifúngicos.

No obstante, estos fármacos muestran algunos inconvenientes, como el desarrollo de resistencia secundaria y la escasa utilidad que hasta la fecha demostraron en las infecciones invasoras graves por hongos miceliales.

Derivados del imidazol y del triazol

Los antifúngicos sintéticos derivados del imidazol y del triazol son el avance más importante de los últimos años en el tratamiento de las micosis sistémicas oportunistas.

Los imidazoles y triazoles comparten los mecanismos de acción y de resistencia, y por ello se suelen agrupar como derivados azólicos o azoles. No obstante, existen numerosas diferencias entre los dos grupos de antifúngicos.

Los imidazoles, miconazol y ketoconazol, y los triazoles, fluconazol, itraconazol y voriconazol, se utilizan por vía oral o parenteral. El resto de los imidazoles, mucho más numerosos, y algún triazol, como el terconazol, se administran sólo tópicamente.

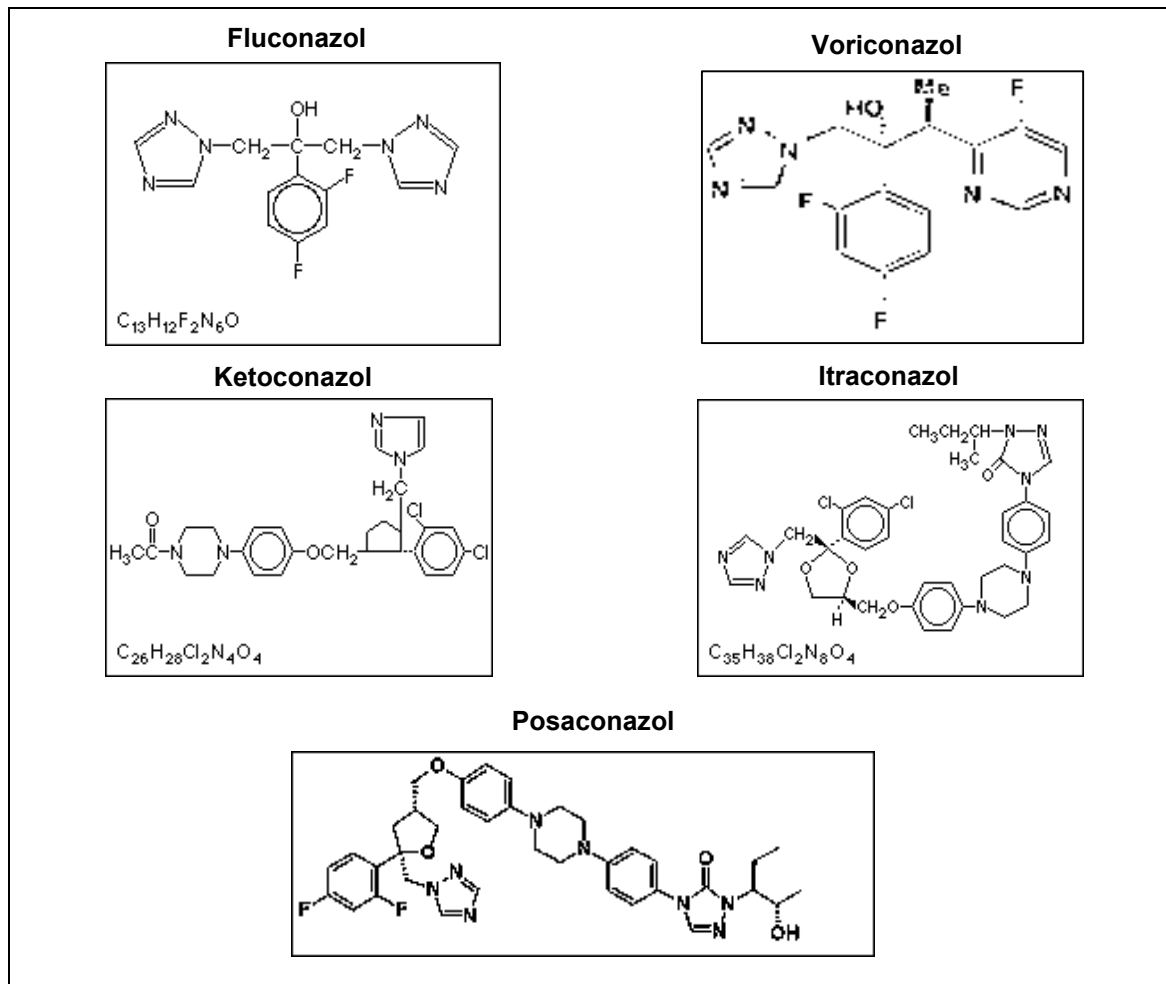


Figura 2. Fórmulas químicas de los principales azoles de uso clínico

Mecanismos de acción

Los azoles inhiben la biosíntesis del ergosterol, concretamente el paso de desmetilación del lanosterol en el carbono 14. La diana de los azoles es, por tanto, la enzima lanosterol-14-alfa-desmetilasa, que es una de las especies del citocromo P450 (P450_{14DM}) localizado en el retículo endoplásmico.

La disminución del ergosterol y la acumulación de esteroides metilados producen cambios en la estructura y en las funciones de la membrana celular, que se vuelve más permeable y vulnerable a daños posteriores. De esta forma se alteran diferentes sistemas enzimáticos unidos a la membrana, como los que participan en el transporte de nutrientes y en la síntesis de quitina. El resultado es la inhibición del crecimiento y, por tanto, los imidazoles y triazoles son primariamente fungistáticos, lo que limita su utilidad. No obstante, el fluconazol, el itraconazol y el voriconazol se utilizan como tratamiento de micosis sistémicas, incluso en pacientes inmunodeprimidos.

Este carácter fungistático de los azoles, que implica en muchos casos largas terapias de mantenimiento, está directamente relacionado con el desarrollo de resistencia secundaria.

Espectro de actividad

Los azoles son antifúngicos de amplio espectro.

Los imidazoles muestran actividad frente a levaduras, dermatofitos, hongos patógenos primarios y algunos hongos miceliales.

Respecto a los triazoles, el fluconazol tiene actividad frente a levaduras y hongos patógenos primarios, aunque es inactivo frente a hongos miceliales (*Aspergillus*, *Fusarium*...) y algunas especies de levaduras muestran resistencia intrínseca (*C. krusei*); además es frecuente que aparezcan resistencias secundarias cuando las cepas contactan durante períodos prolongados con el antifúngico.

El itraconazol tiene un espectro de actividad más amplio ya que es activo frente a levaduras y muchos hongos miceliales. Debe destacarse que la resistencia secundaria al fluconazol suele acompañarse de resistencia al itraconazol, lo que pueden determinar fallos terapéuticos.

Uso clínico

La utilización clínica de los azoles depende de los efectos adversos y de las propiedades bioquímicas de cada una de las moléculas. La mayoría de los imidazoles son tóxicos o insolubles en agua por lo que no pueden administrarse ni oral ni parenteral, aunque algunos se utilizan en presentaciones tópicas para el tratamiento de micosis superficiales en caninos.

El miconazol es un imidazol soluble que se utiliza en la formulación de gotas para el tratamiento de otitis externa en perros y gatos y en combinación con polimixina B y prednisolona.

na. Además, tiene actividad contra *Malassezia* spp. cuando se lo usa combinado con clorhexidina al 2 %.

Con respecto a los triazoles, su disponibilidad y relativa falta de toxicidad generan prácticas terapéuticas abusivas.

El fluconazol no está licenciado para su uso en caninos ni en felinos, sin embargo, se lo usa en la práctica. Es soluble en agua con un perfil farmacocinético excepcional lo que permite que pueda administrarse oral y parenteral. Se elimina en la orina y penetra en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y otros líquidos orgánicos. Se emplea en el tratamiento de las infecciones causadas por levaduras y en algunos tipos de micosis primarias.

La existencia de una presentación parenteral lo convierten en un fármaco de primera línea en el tratamiento de las fungemias e infecciones invasoras por levaduras, aunque debe destacarse que existen especies resistentes al fluconazol, por lo que es recomendable identificar a nivel de especie y si es *C. krusei* o *C. glabrata*, tratar la micosis con otro antifúngico.

El itraconazol no presenta un perfil farmacocinético tan bueno como el fluconazol. Es una molécula derivada del ketoconazol, por lo que no es soluble en agua, se absorbe irregularmente en el tracto digestivo, se une a proteínas plasmáticas, no se elimina por orina y no penetra en el LCR. A finales de los años 90 se comercializaron dos nuevas presentaciones de itraconazol, una solución oral y otra parenteral. Estos compuestos incluyen ciclodextrina que permite obtener una suspensión estable del antifúngico, lo que mejora sus parámetros farmacocinéticos. El itraconazol oral es eficaz en infecciones superficiales y profundas leves por levaduras y hongos miceliales, en micosis primarias y en algunos casos como tratamiento de refuerzo o de mantenimiento en micosis invasoras.

Resistencia primaria y secundaria

Para el caso del fluconazol, *C. krusei* es insensible, al igual que los hongos miceliales y los hongos termo-dimorfos.

La resistencia secundaria al fluconazol en *C. albicans* aparece después de tratamientos prolongados de infecciones superficiales. En el caso de *C. glabrata*, por el contrario, la resistencia secundaria al fluconazol puede ocurrir tras tratamientos cortos y en pacientes inmunocompetentes.

Mecanismos de resistencia

En los últimos años se avanzó en el conocimiento de los mecanismos de resistencia para los azoles. En la tabla siguiente se retoman los principales mecanismos de resistencia identificados en las células eucariotas.

Mecanismos de resistencia en las células eucariotas

Alteraciones en la entrada del fármaco

Alteraciones en el procesamiento intracelular

Modificación

Degradación

Alteraciones de la diana

Mutaciones puntuales

- ✓ Aumento en la expresión
- ✓ Amplificación génica
- ✓ Reconversión genómica o recombinación mitótica

Alteraciones en otras enzimas en el proceso de biosíntesis del ergosterol

Alteraciones en las bombas de eliminación

En una célula sensible, el azol ingresa a su interior y contacta con la diana, la enzima lanosterol desmetilasa, que es el producto del gen *ERG11*.

Los primeros mecanismos implicados en la resistencia son aquellos referidos a la incapacidad del fármaco de alcanzar el interior celular.

El segundo mecanismo implicado en la resistencia es la modificación de la diana, en este caso la lanosterol desmetilasa. Cuando se altera esta enzima se acumulan esteroides 14α metilados. Las alteraciones genéticas relacionadas con la síntesis de la lanosterol desmetilasa están asociadas con el gen *ERG11*.

Se logró identificar las siguientes alteraciones genéticas.

- Mutaciones puntuales en la región que codifica.
- Aumento de la expresión del gen.
- Amplificación del gen, es decir aumento en el número de copias del mismo.
- Conversión o recombinación mitótica en microorganismos diploides.

Además, se identificaron alteraciones de otras enzimas involucradas en la síntesis del ergosterol.

El tercer mecanismo incluye a las bombas de expulsión de azoles que, en general siempre están expresadas pero a un nivel bajo. Existen 2 tipos de bombas de expulsión que contribuyen a la resistencia a los antifúngicos:

1. Transportadores de casete de unión del ATP (ATP binding cassette transporters, ABCT).
2. Facilitadores mayores (Major Facilitators, MF). Estas bombas usan como energía el gradiente de protones de la membrana.

Estas bombas se ocupan de la expulsión activa de moléculas (hidrofóbicas o lipofílicas) que son tóxicas para las células y entre ellas están los azoles. Se identificaron en *S. cerevisiae* el número total de genes ABCT y MF y respectivamente son 30 y 28.

En resumen, en los aislados clínicos la resistencia es poco probable que se deba a una simple mutación. Las mutaciones aparecen luego de largos periodos de presencia del fármaco. Lo más probable es que la resistencia se desarrolle durante periodos prolongados y debido a diversas alteraciones como consecuencia de la presión selectiva del antifúngico.

Ruta de la biosíntesis del ergosterol, enzimas y genes implicados. Zonas de acción de los antifúngicos

Gen	Enzima	Esterol	Inhibidor
		Escualeno	
ERG1	<i>Escualeno epoxidasa</i>	↓	Alilaminas Tiocarbamatos
		2,3-oxidoescualeno	
ERG7	<i>Lanosterol sintetasa</i>	↓	
		Lanosterol	
ERG11	<i>Lanosterol (C-14) desmetilasa</i>	↓	Azoles
ERG24	<i>C14 esterol reductasa</i>	↓	Morfolinas
ERG25		↓	
ERGX	<i>Enzimas C-4 esterol desmetilasas</i>	↓	
ERGY		↓	
		Zymosterol	
ERG6	<i>C-24 esterol metiltransferasa</i>	↓	
		Fecosterol	
ERG2	<i>C-8 esterol isomerasa</i>	↓	Morfolinas
		Episterol	
ERG3	<i>C-5 esterol desaturasa</i>	↓	
ERG5	<i>C-22 esterol desaturasa</i>	↓	Azoles (¿?)
ERG4	<i>C-24 esterol reductasa</i>	↓	
		Ergosterol	

Griseofulvina

La griseofulvina es un antimetabolito licenciado para el tratamiento de las dermatofitosis. Es una droga tóxica, teratogénica por lo que su uso debe evitarse en hembras preñadas. Actúa como fungicida pues inhibe el factor de elongación durante la mitosis celular, por lo que produce la muerte de la célula fúngica. No es activa frente a levaduras.

Se administra vía oral. Es importante que sea administrada con **vehículo graso** para facilitar su absorción.

Lipopéptidos-Equinocandinas

Casporfungina, anidulafungina, micafungina

La principal novedad de estos antifúngicos es su mecanismo de acción, ya que actúan sobre la 1,3- β -D-glucano sintetasa, enzima necesaria para la formación de 1,3- β -glucano, uno de los principales componentes de la pared fúngica.

Este mecanismo de acción le confiere ciertas ventajas, ya que no muestra resistencia cruzada con los antifúngicos que actúan sobre la membrana y podría ser de elección para la terapia combinada con azoles o anfotericina B.

Las equinocandinas son activas para inhibir el desarrollo de *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Pneumocystis* spp. y de los hongos termo dimorfos, pero no son activas frente a aquellas las que tienen 1,6- β -glucano en su pared como los hongos Basidiomycetes (*Cryptococcus* spp., *Malassezia*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*, etc.), otros hongos como *Fusarium* spp y Mucorales.

Pruebas de sensibilidad

El objetivo primordial de las pruebas de sensibilidad es conocer si los microorganismos ensayados son sensibles o resistentes a los antimicrobianos. Las condiciones de realización de estas pruebas son completamente diferentes a lo que ocurre en el organismo animal. Sin embargo, cuando los resultados se interpretan con sentido común, son de utilidad para el clínico.

Utilidad

Los resultados obtenidos con estas pruebas tienen aplicaciones que influyen en el tratamiento empírico, en el directo y en el control de la infección. Asimismo, son pruebas cruciales para el descubrimiento y desarrollo de nuevos antimicrobianos.

Pruebas en medio líquido y medio sólido

Existen tres procedimientos generales para determinar la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos y estos son:

Dilución en caldo

Se procede a la dilución del antimicrobiano en una serie de tubos que contienen un caldo adecuado para el crecimiento del microorganismo que se va a ensayar. Se inocula el microorganismo, se incuba a una temperatura determinada y se determina la concentración del antimicrobiano que produce la inhibición del crecimiento del microorganismo.

Dilución en agar

Se procede a la dilución del antimicrobiano en un medio de cultivo apropiado y solidificado con agar. Se inoculan los microorganismos en la superficie del medio. Se incuba a una temperatura adecuada y se determina la concentración del antimicrobiano que produce la inhibición del crecimiento.

Difusión en agar con disco

Se inocula el microorganismo en la superficie del agar. Se deposita un disco con una concentración conocida de antimicrobiano. Se incuba a una temperatura adecuada. Se produce una zona de inhibición del crecimiento del microorganismo alrededor del disco. Dependiendo del tamaño de la zona, se puede determinar si el microorganismo es sensible, intermedio, indeterminado o resistente al antimicrobiano.

Antes de seleccionar el procedimiento que se va a realizar en el laboratorio para determinar la interacción entre un antimicrobiano y un microorganismo es necesario tener en claro si los resultados se quieren expresar de forma cuantitativa (CIM) o cualitativa (sensible, intermedio, indeterminado o resistente).

Para las levaduras existen a la fecha los documentos del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-4th ed y M44-3rd ed, para dilución en caldo y difusión en agar respectivamente, y el European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) E.Def 7.3.2 para dilución en caldo. Estas técnicas fueron desarrolladas para los laboratorios de medicina humana pero son extrapolables a los Laboratorios de Veterinaria.

La determinación de la sensibilidad mediante un procedimiento cuantitativo permite determinar además de la CIM, la Concentración Fungicida Mínima (CFM). Estos valores cuantitativos o parámetros farmacodinámicos se pueden utilizar junto con la farmacocinética del antimicrobiano, para calcular índices terapéuticos.

La principal ventaja de la técnica por difusión en agar es el bajo costo unido a la simplicidad de la técnica y esto incluye desde la realización, la lectura y en la mayoría de las ocasiones, la interpretación.

Limitaciones

La primera y fundamental limitación de cualquiera de las técnicas que se mencionaron más arriba es que el procedimiento se realiza en una atmósfera artificial. Por lo tanto, existe poca relación con las complejas interacciones que ocurren entre el microorganismo y el hospedador. Asimismo, hay que tener en cuenta el tipo de hospedador (normal, inmunocomprometido por

corticoides, por quimioterápicos, etc.) y el tipo de microorganismo que causa la infección (de crecimiento normal o lento, si necesita suplementos especiales para crecer, etc.). Por último, hay que considerar que en el laboratorio la concentración del antimicrobiano es constante y el inóculo del microorganismo también.

En el hospedador, un número indeterminado de microorganismos (pequeño o grande) está expuesto a concentraciones fluctuantes del antimicrobiano entre cada dosis del mismo.

En resumen, las condiciones *in vivo* difícilmente se pueden modificar y así la evolución del paciente depende de un gran número de factores entre los que se encuentra la inherente sensibilidad del microorganismo a los antimicrobianos. En el laboratorio, se pueden manipular distintos elementos que influyen en los resultados de las pruebas de sensibilidad.

Por tanto, es indispensable la estandarización de las pruebas para que, con independencia de donde se realicen, los valores obtenidos resulten equiparables.

Método de difusión en medio sólido

Documento M44-3rd ed del CLSI

En las últimas décadas se desarrollaron y realizaron numerosos trabajos con el fin de mejorar las pruebas de sensibilidad de los antifúngicos *in vitro*.

Distintos grupos de trabajo en todo el mundo desarrollaron pruebas de sensibilidad en medio sólido, con la intención de obtener técnicas que pudieran llevarse a cabo en el laboratorio clínico.

Por el momento, el CLSI estandarizó el método de difusión en agar con discos para el género *Candida*. El documento vigente es el M44-3rd ed del CLSI.

Además de la difusión en agar con discos de papel, la aparición de las tiras embebidas en distintas concentraciones de antifúngicos (Etest y Liofilchem en el mercado), constituye una herramienta potencial al momento de realizar pruebas de sensibilidad en los laboratorios de rutina, por otra parte, cuenta con el aval de numerosos trabajos.

Las pruebas en medio sólido y en especial las de difusión con disco son simples de realizar y los resultados se obtienen de forma rápida, siendo, en teoría, muy fáciles de interpretar. No obstante, en este punto hay que ser muy estrictos, pues si las técnicas no se realizan siguiendo rigurosamente las instrucciones sugeridas por los fabricantes, es posible que se obtengan resultados erróneos.

Placas con medio de cultivo

Se utiliza el medio agar Mueller-Hinton, adicionado con glucosa al 2 % y azul de metileno (MHm).

El medio de cultivo en las placas de Petri debe de tener una profundidad de 4 mm (± 1). Para lograr esa profundidad, si la placa es de 9 cm de diámetro se necesitan 25 mL de medio y si es de 15 cm, 60 mL. El pH del medio debe ser controlado (7,2-7,4), después que haya solidificado y a temperatura ambiente. Las placas se deben guardar en bolsas de plástico a 2-8 °C.

En todos los casos se recomienda su uso antes de las 2 semanas de elaboradas, aunque hay trabajos en los que se pudo comprobar que la estabilidad del Mueller-Hinton se mantiene hasta 30 días, dando resultados aceptables, siempre que se respeten las condiciones de almacenaje.

La superficie del agar debe estar seca antes de usarlas, hay que colocar las placas durante media hora, en la estufa de 37 °C, boca abajo y con las tapas ligeramente abiertas para permitir que la humedad se evapore.

Comprobar esterilidad de las placas, con una muestra que represente al lote, a 30-35 °C por al menos 24 h y someterlas a un control de calidad.

Escala McFarland

Para la elaboración de la escala McFarland en el laboratorio agregar 0,5 mL de 0,048 mol/L BaCl₂ (1,175% p/v BaCl₂ • H₂O) a 99,5 mL de 0,18 mol/L H₂SO₄ (1 % v/v) en constante movimiento para mantener la suspensión. Para verificar la correcta densidad de la turbidez se utiliza un espectrofotómetro, en el cual la absorbancia a 625 nm debe ser de 0,08 a 0,13. Cada mes se debe verificar la densidad y si es necesario, debe reemplazarse.

Distribuir 4 - 6 mL por tubo de ensayo, del mismo tamaño que el utilizado para la preparación del inóculo, y precintarlo.

Preparación del inóculo

Para la preparación del inóculo se parte de un cultivo de 24 h, en agar Sabouraud glucosa a 35 ($\pm 2^\circ$ C). De este cultivo, se tocan cinco colonias y se suspenden en 5 mL de solución salina estéril (8,5 g/L NaCl; 0,85 %).

El resultado de la suspensión se homogeneiza durante 15 segundos, y su turbidez se ajusta a 0,5 de la escala McFarland (equivalente a $1 - 5 \times 10^6$ UFC/mL).

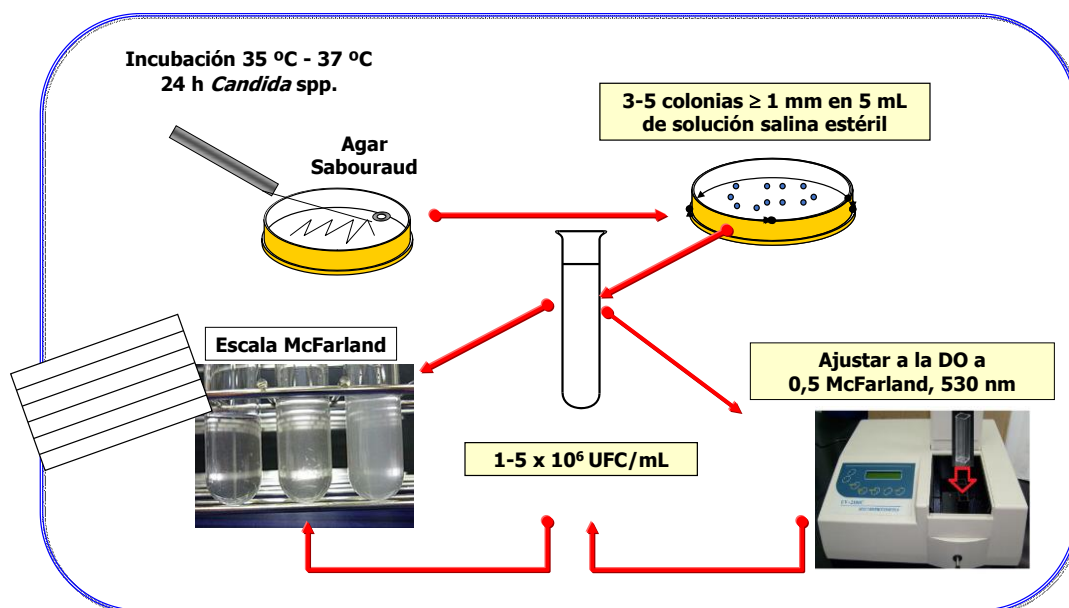


Figura 3. Algoritmo para la preparación del inóculo

Inoculación de las placas

Para permitir el secado de las placas se dejan entreabiertas de 3 a 5 minutos, pero no más de 15. Las placas se deben de inocular dentro de los 15 minutos de ajustada la turbidez del inóculo, si esto no es posible, se debe conservar a 4 °C, por no más de 2 h.

La utilización de inóculos grandes que producen una zona limítrofe engrosada, o de inóculos pequeños que producen colonias separadas no es adecuada ya que la zona de inhibición resultante no refleja la sensibilidad o resistencia real del aislado.

Siembra de las placas

Siembra por dispersión con hisopo

Se debe aplicar el siguiente procedimiento: se sumerge un hisopo de algodón estéril en el inóculo. El exceso de líquido es eliminado girando el hisopo varias veces contra las paredes interiores del tubo.

El inóculo se extiende por toda la superficie de la placa 3 veces seguidas. En cada repetición, se gira la placa 60°, de forma que se asegure la distribución uniforme del inóculo. (Figura 4)

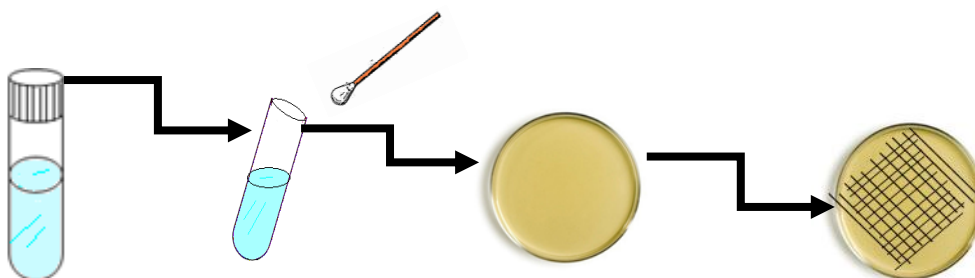


Figura 4. Esquema que muestra el hisopado de las placas

Siembra por inundación

La siembra por inundación no se describe en el M44-3 er ed, sin embargo, es una técnica sencilla y permite una mejor visualización de los halos de inhibición.

Una vez que se preparó el inóculo, se realiza una dilución 1/10 en agua destilada estéril, se toman 2-4 mL de la suspensión y se vuelcan en la placa de Petri. Se homogeneiza rotando la placa.

El exceso de líquido se retira con una pipeta Pasteur estéril. Se deja secar la superficie durante 10-15 minutos a temperatura ambiente. Esta técnica solo puede ser utilizada con *Candida* spp., **no usar con *Cryptococcus* spp.**

Colocación de los discos de antimicrobiano

Los discos de antimicrobianos se deben colocar luego de no más de 15 minutos tras la inoculación de las placas, de esa forma la difusión y el crecimiento ocurren en simultáneo. Se pueden aplicar con la ayuda de un dispensador o con pinza estéril.

Para asegurar un completo contacto se aconseja presionar el disco contra la superficie del agar. Los discos se deben de colocar al menos a una distancia de 15 mm del borde de la placa y separados entre sí por una distancia de 24 mm.

Una vez colocados en el agar, es importante no moverlos ya que la difusión comienza de forma inmediata.

Incubación de las placas

Las placas inoculadas deben ser incubadas a 35 ± 2 °C durante 20-24 h y hasta 48 h en una posición invertida dentro de los 15 minutos de aplicado el disco.

Lectura de las zonas de inhibición

Lectura visual

Cada placa es examinada a las 20 a 24 h de incubación. Si el crecimiento es confluyente y satisfactorio, las zonas de inhibición son uniformemente circulares. Para los azoles, las microcolonias crecidas de manera aislada dentro de la zona de inhibición deben ser ignoradas. El diámetro de cada zona de inhibición se mide con una regla, calibre, plantilla o instrumental electrónico.

Para obtener resultados reproducibles, los métodos empleados para el examen de las placas y la medición de las zonas deben estar estandarizados. Si la lectura de la zona de inhibición requiere condiciones especiales de iluminación (intensidad y ángulo de la luz), o hay que mirarla con lupa, la interpretación es diferente y por tanto estos procedimientos requieren un acercamiento distinto que solo puede ser considerado bajo circunstancias especiales.

Se leen a las 48 h solo los aislados que a las 24 h presentan crecimiento insuficiente.

Lectura automatizada

Si bien en el documento M44 se considera la lectura visual, varias compañías comercializaron equipos con cámaras de vídeo y sistemas de procesamiento de imágenes que automáticamente leen el tamaño de las zonas de inhibición.

Dificultades con la lectura de la zona limítrofe

A veces la zona de inhibición no puede medirse con mucha precisión, ya que la zona de inhibición no se encuentra demarcada con claridad o el borde de la zona de inhibición es irregular. Esto suele ocurrir cuando el aislado es de crecimiento lento o no hay inhibición completa. En estos casos se debe de medir el borde exterior de la zona donde el crecimiento es bien confluyente.

Cuando se va a medir es muy importante que la intensidad y el ángulo de la luz estén estandarizados. Cuando el aislado es de crecimiento lento o no hay inhibición completa, el borde de la zona de inhibición es irregular. Esta situación es frecuente y lo que se debe de medir es el halo más externo.

Interpretación de resultados

Para el género *Candida* se establecieron categorías de sensibilidad, basadas en la respuesta *in vitro* de un organismo frente a un determinado antimicrobiano a una concentración equivalente a la circulante en sangre o tisular.

Las categorías son las siguientes:

Sensible (S): cuando el aislado que causa la infección puede ser tratada con la dosis recomendada para ese tipo de infección y especie.

Sensible dependiente de dosis (SDD): incluye los aislados que poseen CIM aproximadas a los niveles de concentraciones tisulares y en sangre, y la tasa de respuesta de las mismas sería menor que para un aislamiento sensible.

Intermedio (I): incluye los aislados que poseen CIM aproximadas a concentraciones tisulares y en sangre y la tasa de respuesta a las mismas sería menor que para un aislamiento sensible y/o la no disponibilidad de datos hacen que el mismo no permita clasificarlos claramente en sensible o resistente. NOTA: se incluyen aquellos microorganismos que por algún factor técnico causan discrepancias en las interpretaciones de los resultados.

Resistentes (R): son los aislamientos que no son inhibidos por las dosis o concentraciones normales programadas o cuando la eficacia clínica no fue la esperada con el tratamiento.

No sensible (NS): esta categoría incluye a los aislamientos que comúnmente poseen solo aislamientos sensibles, pero no SDD, ni I, ni resistentes.

NOTA: esta categoría es utilizada cuando para un nuevo antimicrobiano no se encontraron, aún, aislados no resistentes.

Estas categorías están basadas en los puntos de corte que se establecieron mediante el método de dilución en caldo, las concentraciones séricas que el antimicrobiano alcanza en suero y la distribución de las CIM para la especie estudiada.

En la tabla 3 se muestran los puntos de corte clínicos vigentes para algunas especies de *Candida* frente a determinados antifúngicos.

Tabla 3. Puntos de corte para *Candida* spp. Diámetro de inhibición de crecimiento y correlación con Concentración Inhibitoria Mínima. Documento M60 del CLSI

Antifúngico	Especies	Diámetro del halo y categoría interpretativa				Categoría interpretativa µg/mL		
		S	I	SDD	R	S	I	R
Caspofungina	<i>C. albicans</i>	17	15-16	--	14	0,25	0,5	1
	<i>C. glabrata</i>	--	--	--	--	0,12	0,25	0,5
	<i>C. guilliermondii</i>	13	11-12	--	10	2	4	8
	<i>C. krusei</i>	17	15-16	--	14	0,25	0,5	>1
	<i>C. parapsilosis</i>	13	11-12	--	10	2	4	8
	<i>C. tropicalis</i>	17	15-16	--	14	0,25	0,5	>1
Micafungina	<i>C. albicans</i>	22	20-21	--	19	0,25	0,5	1
	<i>C. glabrata</i>	30	28-29	--	27	0,06	0,12	0,25
	<i>C. guilliermondii</i>	16	14-15	--	13	2	4	8
	<i>C. krusei</i>	22	20-21	--	19	0,25	0,5	1
	<i>C. parapsilosis</i>	16	14-15	--	13	2	4	8
	<i>C. tropicalis</i>	22	20-21	--	19	0,25	0,5	1
Voriconazol	<i>C. albicans</i>	17	15-16	--	14	0,5	1	2
	<i>C. glabrata</i>	--	--	--	--	--	--	--
	<i>C. krusei</i>	15	13-14	--	12	0,12	0,25-0,5	1
	<i>C. parapsilosis</i>	17	15-16	--	14	0,5	1	2
	<i>C. tropicalis</i>	17	15-16	--	14	0,12	0,25-0,5	1
Fluconazol	<i>C. albicans</i>	17	--	14-16	13	2	--	4
	<i>C. glabrata</i>	--	--	15	14	--	--	32
	<i>C. krusei</i>	--	--	--	--	--	--	--
	<i>C. parapsilosis</i>	17	--	14-16	13	2	--	4
	<i>C. tropicalis</i>	17	--	14-16	13	2	--	4

Tabla adaptada del documento M60 2nd ed. del CLSI. S: sensible; I: intermedio; SDD: sensible dosis dependiente; R: resistente

Los aislados de *C. krusei* son considerados intrínsecamente resistentes o insensibles al fluconazol, por lo que su CIM no deberían ser interpretada utilizando esta tabla.

Control de calidad

El control de calidad tiene un propósito, que es monitorear la precisión y la exactitud del procedimiento, los reactivos utilizados y el personal que realiza el test así como el que interpreta los resultados.

Estos objetivos se logran utilizando microorganismos con sensibilidad conocida. Los microorganismos de referencia para tal fin son:

Candida albicans ATCC 90028.

Candida parapsilosis ATCC 22019.

Candida tropicalis ATCC 750.

Candida krusei ATCC 6258.

Estos microorganismos se utilizan con los mismos reactivos y en el mismo procedimiento en el que se evalúa a las muestras clínicas. Si los halos que generan están dentro de los rangos establecidos, los resultados de los ensayos están validados.

Deben ser conservados por algún mecanismo que minimice la posibilidad de que se produzca alguna mutación. Se aconseja la conservación a -70 °C en solución 50 % glicerol. Un cultivo de trabajo se puede conservar en agar Sabouraud glucosa a 2–8 °C, con repiques una vez por semana, pero no más de tres veces.

En la siguiente tabla se muestran los rangos recomendados para las cepas control de calidad. Documento M60 del CLSI:

Antifúngico	Contenido del disco µg	<i>C. albicans</i> ATCC 90028	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	<i>C. krusei</i> ATCC 6258
Caspofungina	5	18-27	14-23	20-27	19-26
Fluconazole	25	28-39	22-33	26-37	--
Micofungina	10	24-31	14-23	24-30	23-29
Posaconazol	5	24-34	25-36	23-33	23-31
Voriconazol	1	31-42	28-37	--	16-25

ATCC: marca registrada de la Colección Americana de cultivos tipo

Otras técnicas de difusión

Existen varias técnicas estandarizadas que se pueden utilizar en los laboratorios. Las diferencias residen en la elección del medio, concentración del antimicrobiano en el reservorio, inóculo y puntos de corte. También hay otras que son absolutamente diferentes a las propuestas por el "International Collaborative Study". De todas ellas solo vamos a describir las tabletas de antibióticos Neo-Sensitabs™ Rosco (www.rosko.dk), y las tiras de Etest (bioMérieux) (www.biomerieux.com) y Liofilchem (<http://www.liofilchem.net/>).

Tabletas de antibióticos Neo-Sensitabs™ Rosco (<http://www.rosko.dk>)

El antibiótico, en forma cristalina, se mezcla con una sustancia inerte sin actividad antimicrobiana que tampoco interfiere con ningún aspecto del proceso. Es aplicable a aislados de *Candida* spp. y *C. neoformans*. La principal ventaja de este procedimiento es la estabilidad de las tabletas ya que duran 4 años en refrigerador (4-8 °C). Se garantiza que la concentración del antimicrobiano en la tableta es del 90 al 110 %.

El fabricante es Neo-Sensitabs™ Rosco. Con este procedimiento se obtienen resultados cualitativos de sensibilidad ya que las tabletas cargan una concentración fija de antifúngico, p. ej. para fluconazol la carga es de 25 µg por tableta. El fabricante provee una cartilla con recomendaciones para la interpretación de los resultados y los puntos de corte.

Si bien el uso de las tabletas es un recurso útil, económicos y de fácil realización en el laboratorio, es importante mencionar que presenta dificultades para identificar aislados resistentes a fluconazol (> 5 % de discrepancias muy mayores).

1. Inóculo

Se parte de un cultivo puro de la levadura a ensayar con 24 h de incubación a 35 °C en Agar Sabouraud glucosa. Se toma una alícuota de la cepa (3 a 5 colonias) con la punta de asa y se resuspende en un tubo con 5 mL de solución salina estéril (SSE), se homogeniza con vórtex y si se trata de una cepa del género *Candida* se ajusta la turbidez a 0,5 de la escala McFarland (equivalente a $1 \times 10^6 - 5 \times 10^6$ UFC/mL). (Figura 5)

Para *Cryptococcus* spp., se utilizan cultivos con 48-72 h de incubación y ajustar el inóculo a 1 en la escala McFarland.

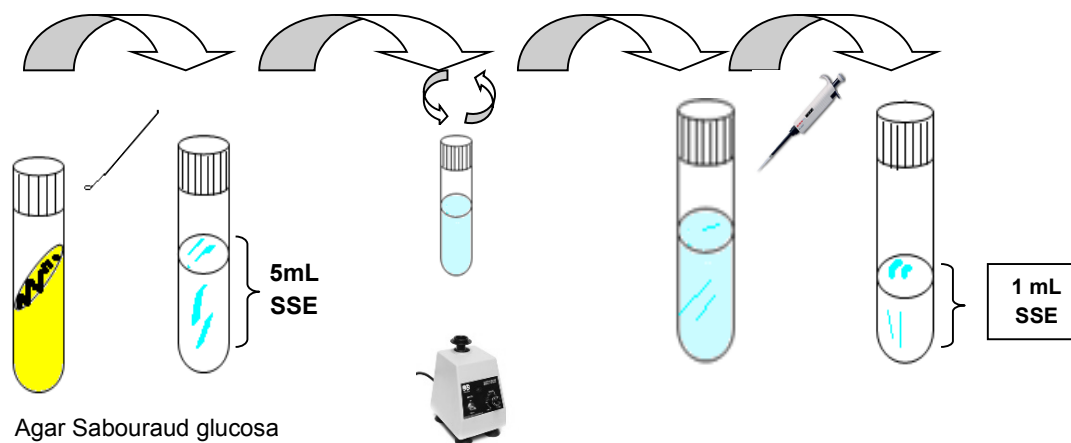


Figura 5. Esquema que muestra el procedimiento de preparación del inóculo

1.1. Inoculación por inundación

Se siembra la paca (placas de 9 cm, con MHm) con 0,5 mL de inóculo, y se esparce por la superficie del agar removiendo el exceso inmediatamente con un puntero de pipeta automática.

Luego se dejan secar las placas con la tapa abierta a 35 °C por 10 minutos antes de colocar las tabletas sobre el agar. (Figura 6)

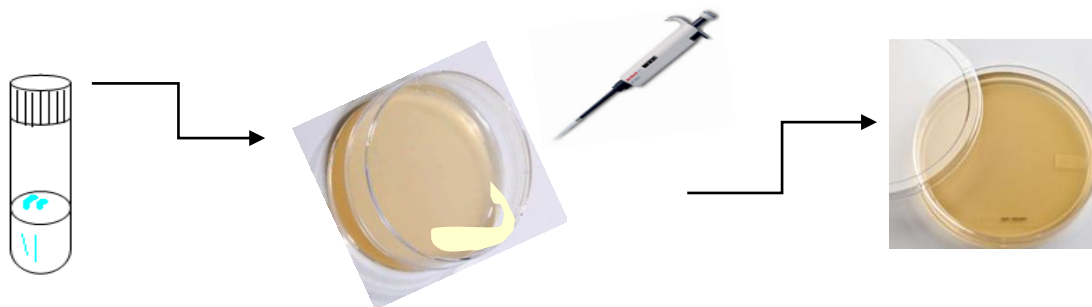


Figura 6. Esquema que muestra el procedimiento de la inoculación por inundación en la placa con Mueller Hinton.

2. Colocación de las tabletas

Las tabletas se apoyan en la superficie del agar con la ayuda de un dispensador o con ayuda de pinza de punta fina (estéril) y se las ubica equidistantes sobre la placa. (Figura 7).



Figura 7. Colocación de las tabletas sobre la placa con medio de cultivo sólido

3. Incubación

Se incuban las placas a 35 °C por no más de 18-22 h (una incubación más prolongada puede provocar una falsa resistencia a los azoles).

Si luego de la incubación, los halos de inhibición no son correctamente distinguibles, puede prolongarse la incubación 24 h más.

Para *Cryptococcus spp.*, se incuba a 30 °C por 42-44 h.

4. Lectura

Se mide en diámetro de la zona de inhibición.

Para los polienos (anfotericina B y nistatina) la zona libre de crecimiento es la medida. Algunas colonias aisladas dentro de la zona limpia, pueden ser consideradas mutantes resistentes.

Para los azoles la zona a medir es la definida por las colonias con diámetro normal, dentro de esta zona hay colonias con crecimiento inhibido que presentan un diámetro menor al de las colonias externas, estas colonias no deben ser consideradas mutantes resistentes. (Fotos 1 y 2).

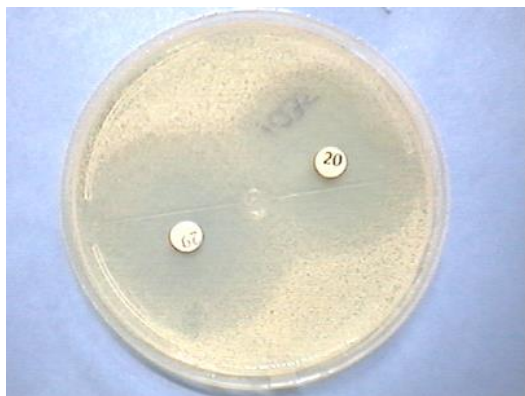


Foto1. *C. albicans* sensible a fluconazol



Foto 2 *C. krusei* resistente a fluconazol

Tiras embebidas en antifúngicos

Etest® (bioMérieux) y Liofilchem (Diagnostic Liofilchem)

Es una técnica cuantitativa. Permite valorar la CIM. Consiste en la utilización de una tira de plástico que, en una de sus caras, lleva un gradiente de concentración del antimicrobiano. Tras la incubación, la intersección entre el crecimiento del microorganismo y la zona de inhibición en forma de elipse indican la CIM.

1. Inóculo

Se parte de un cultivo puro de la levadura a ensayar con 24 h de incubación a 35 °C en Agar Sabouraud glucosa. Se toma una alícuota de la cepa (3 a 5 colonias) con la punta de asa y se resuspende en un tubo con 5 mL de solución salina estéril, se homogeniza con vórtex y si se trata de una cepa del género *Candida* se ajusta la turbidez a 0,5 de la escala McFarland (equivale a $1 \times 10^6 - 5 \times 10^6$ UFC/mL).

Para *Cryptococcus* spp., se utilizan cultivos con 48-72 h de incubación y ajustar el inóculo a 1 en la escala McFarland.

2. Siembra

Se siembra una placa con medio de cultivo RPMI 2 % glucosa. Colocar un hisopo estéril dentro de la suspensión del inóculo, embeber y rotar contra las paredes del tubo para eliminar el exceso de líquido.

Sembrar cuidadosamente la placa en 3 direcciones para obtener crecimiento uniforme en toda la superficie de la misma. Dejar que la humedad se absorba durante 10-15 minutos. (Figura 8)

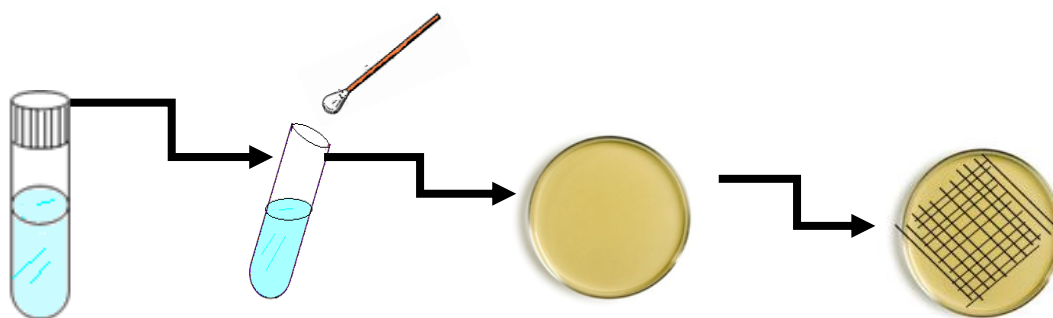


Figura 8. Esquema que muestra el hisopado de las placas

3. Aplicación de las tiras

Aplicar las tiras de Etest/Liofilchem con pinza estéril, apoyando primero sobre el agar la zona de menor concentración de antifúngico. Colocar las dos tiras en forma antiparalela de manera tal que la zona de mayor concentración de antifúngico de una de las tiras coincida con la menor concentración de la otra (para evitar la superposición de los halos). Una vez depositadas, no deben ser removidas, pues el antifúngico se descarga en segundos. (Figura 9)



Figura 9. Colocación de las tiras sobre la placa con medio de cultivo sólido,

4. Incubación

Incubar la placa a 35 °C en cámara húmeda hasta observar desarrollo dentro de las 18-24 h para *Candida* spp, y 48-72 h para *Cryptococcus* spp. Si el crecimiento es débil a las 24-48 h, prolongar la incubación a 48-72 h.

5. Lectura

Leer las placas cuando se observa crecimiento tras 24 h de incubación. Las lecturas tempranas son recomendables para los azoles para evitar el error de lectura debido al sobrecrecimiento en el punto de corte de la CIM.

La CIM se lee donde la elipse de inhibición intercepta la escala de la tira. (Foto 3)

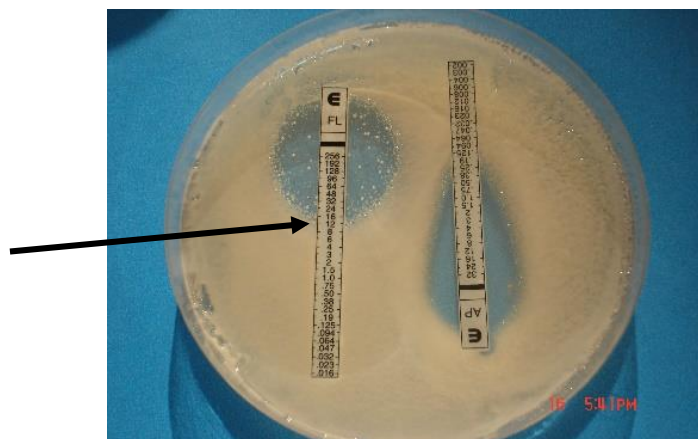


Foto 3. La flecha indica la elipse de inhibición que se forma por la interacción del aislado de levadura con el antifúngico.

Observaciones

- La combinación levadura/antifúngico puede afectar la naturaleza de la zona límite en la interpretación de la CIM.
- Para la anfotericina B, leer la CIM en el punto completo (100 %) o casi completa de inhibición (>90 %).
- Los azoles pueden dar zonas límites difusas sobre ciertos medios de cultivo, especialmente para *C. albicans* y *C. tropicalis*. Leer la CIM en el primer punto de inhibición significativa (marcado descenso en la intensidad del crecimiento), usar el principio del 50 % de inhibición para seleccionar visualmente el punto de corte.
- La densidad del inóculo y el período de incubación pueden afectar la claridad del punto de corte de la CIM, particularmente para los azoles.
- Excesiva humedad o incorrecto hisopado de las placas puede provocar crecimiento no confluyente o zona límite con borde irregular resultando en una distinta intersección a ambos lados de la tira con el consiguiente error en la lectura.
- Cuando no hay inhibición, la CIM se debe reportar como mayor que el máximo valor en la escala de lectura. Cuando la elipse de inhibición está debajo de la tira, la CIM se debe reportar como menor que el mínimo valor en la escala de lectura.

Referencias

- Antibiotics in Laboratory Medicine, 5th Edition Edited by Victor Lorain Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005 832 pp.
- Arendrup, M. C., Meletiadis, J., Mouton, J. W., Lagrou, K., Hamal, P., Guinea, J., and the Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). *EUCAST Definitive Document E.Def. 7.3.2.* (2020). www.eucast.org.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts*. 3rd ed. CLSI guideline M44. Wayne, Pennsylvania, USA, 2018.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*. 2nd ed. CLSI supplement M60. Wayne, Pennsylvania, USA, 2017.

Etest Technical Guide. Antifungal susceptibility testing of yeasts. <http://www.biomerieux.com>.

Goodman & Gilman. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 12ava ed. Bruton L. Chabner BA, Knollmann BC. Editorial Mc Graw. Hill. 2012.

Tabletas Neo-Sensitabs™ Rosco <http://www.rosco.dk>

CAPÍTULO 9

Biología molecular y diagnóstico micológico

Marco A. Tizzano, Francisco J. Reynaldi

Un poco de ciencia aleja de Dios, pero mucha ciencia devuelve a Él.

Louis Pasteur. 1822-1895

La capacidad de identificar a un microorganismo es un paso fundamental para el diagnóstico clínico, para conducir la terapéutica y en muchos casos, para el control biológico del patógeno.

Tradicionalmente, la identificación de las especies fúngicas se realiza mediante el estudio de las características morfológicas, pruebas bioquímicas y fisiológicas o varias combinaciones de estas tres metodologías. Esos estudios insumen largos periodos de tiempo hasta arribar a la identificación definitiva de estos organismos e implican el manejo de materiales infecciosos en forma rutinaria, con el consecuente riesgo para el personal que desarrolla la actividad. Además, con las pruebas fenotípicas no es posible la identificación de especies crípticas, que forman parte de complejos de especies que han sustituido a lo que antes eran consideradas como simples morfoespecies. La descripción de especies crípticas ha ocurrido en diferentes géneros de mucorales, y en especial en Ascomicetes tales como *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Sporothrix* y *Scedosporium*, entre otros. Es frecuente que las especies crípticas difieran en virulencia y en su respuesta a los antifúngicos por lo que su correcta identificación es de especial importancia para el adecuado tratamiento del paciente.

Con el advenimiento de la biología molecular se produjeron importantes avances entre los que se destaca la precisión en la identificación de especies fúngicas basándose en el estudio de los ADN genómicos lográndose resultados confiables, precisos, reproducibles y de calidad en menor tiempo.

Asimismo, las técnicas moleculares son una herramienta útil para estudiar mecanismos moleculares relacionados con la resistencia a las drogas antifúngicas, abriendo el espectro de posibles esquemas terapéuticos.

Por otra parte, a partir del conocimiento del genoma de los hongos en conjunción con la tecnología del ADN recombinante, se desarrollaron distintos sistemas de expresión proteínas recombinantes basados en especies fúngicas.

En este Capítulo se hará una breve mención de las principales técnicas moleculares utilizadas para identificar especies y que permiten un adecuado diagnóstico micológico. Asimismo, se enunciarán los alcances de cada método, sus ventajas y desventajas.

Con el objeto de arribar a la identificación definitiva de una especie fúngica, mediante métodos moleculares, es necesario en una primera instancia extraer el ADN fúngico para luego amplificarlo, de manera parcial (o total), y finalmente realizar la identificación del hongo en cuestión. Entonces, para realizar esta secuencia de trabajo se debe tener en cuenta:

- A. Elección de la muestra.
- B. Método de extracción de ADN.
- C. Elección de la secuencia blanco de ADN.
- D. Método de amplificación de ADN y tipificación molecular.

Elección de la muestra

Las muestras sobre las que se intentará realizar la extracción del ADN fúngico y su posterior identificación pueden provenir de la clínica (sangre, suero, LCR, biopsias, muestras de tejido formolados o embebidas en parafina). Los cultivos puros de especies fúngicas se pueden utilizar como controles para validar la técnica de identificación molecular utilizada (límite de detección, especificidad, sensibilidad).

Además de las muestras de origen clínico, son considerados muestras los alimentos que se encuentren sospechados de estar contaminados con algún patógeno de origen fúngico.

Métodos de extracción del ADN fúngico

Los métodos empleados pueden clasificarse como: *in house* o artesanales y equipos comerciales.

Debido a la resistencia de la pared celular de los hongos, los métodos artesanales utilizan fuerza mecánica tales como: molienda con nitrógeno líquido o perlas de vidrio combinado con vórtex en presencia de detergentes para lograr la lisis celular.

Los detergentes más utilizados son: dodecil sulfato de sodio (SDS), Triton, Tween 80 o bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB). A continuación, se requiere de un paso de separación proteica y lipídica mediante el uso de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico. Posteriormente, el ADN se precipita con etanol absoluto, se seca y se resuspende en agua libre de nucleasas.

Existen diversas adaptaciones para el método artesanal según la muestra a procesar. Por ejemplo, las levaduras, a diferencia los hongos miceliales, no requieren demasiado tratamiento para lisarlas, es suficiente con incubar a 70 °C durante 60 minutos en presencia de un deter-

gente, posteriormente se realiza precipitación del ADN con 2-propanol, lavados y la resuspensión en agua libre de nucleasas.

Para los hongos miceliales, el ADN genómico se puede extraer a partir de los conidios, sin embargo, esta alternativa es útil solo cuando nos encontremos frente a un cultivo puro y a una especie con producción adecuada de conidios.

Si la muestra procesar es tejido fresco, para disgregar el tejido se agrega una enzima (proteínasa K).

Las muestras que han sido tratadas con formol, así como las que se encuentren embebidas en parafina requieren tratamiento con solventes antes de la extracción del ADN. En estos casos el rendimiento de la extracción de ácidos nucleicos es bajo, debido a los diversos tratamientos que sufrieron las muestras y que afectan directamente la integridad del ADN.

Las ventajas de utilizar métodos artesanales para extraer ADN fúngico radican en que son costo-accesible y pueden adaptarse para distintos tipos de muestras. Mientras que, las desventajas radican en que suele existir fraccionamiento indeseado del ADN (*DNA shearing*), producto de fuerzas mecánicas. Además, pueden quedar trazas de inhibidores enzimáticos lo que hace que el escalado en número de muestras se torne dificultoso.

Los equipos comerciales utilizan columnas de sílica o de intercambio iónico para pegar selectivamente el ADN. Además, permiten la eliminación de contaminantes comunes de preparación de ADN, como la guanidina, pigmentos e iones de calcio. Por lo general, se prefieren los equipos comerciales para la purificación del ADN genómico dado que se minimiza el daño en los ácidos nucleicos, en comparación con los métodos artesanales que utilizan fenol-cloroformo-alcohol isoamílico.

A pesar que el costo de los reactivos de los equipos comerciales es más alto que la mayoría de los métodos artesanales, los comerciales aseguran un escalado de muestras de una forma sencilla, segura, y disminuyen notoriamente los tiempos requeridos para las extracciones de ADN.

Cualquiera sea el método para extraer el ADN, se deben corroborar la integridad utilizando un fluorómetro o un espectrofotómetro, y la presencia de contaminantes mediante geles de agarosa. En esos aparatos se estima la concentración de ADN de las muestras extraídas expresadas en ng/μl o en μg/μl. Además, se estima la pureza de los ADN mediante la siguiente relación de absorbancias A₂₆₀/A₂₈₀. Se considera que un ADN de pureza óptima tiene un valor entre 1.8-2.0.

Elección de la secuencia blanco

La condición ideal para detectar una infección fúngica es que exista un marcador en todos los géneros de hongos (además debe contener suficiente variación interna en su secuencia para definir una especie dada), y debe ser un gen copia múltiple para maximizar la sensibilidad del método de detección. Los genes ARNr (ARN ribosómicos) son buenos candidatos ya que

están presentes en alto número de copias (ente 80 a 100 copias por genoma). Esta secuencia blanco llamada unidad transcripcional está compuesta por genes de ARNr 18S, 5.8S y 28S. Entre subunidades del gen del ADN ribosómico (ADNr) 18S y 5.8S y entre 5.8S y 28S se ubican unas regiones espaciadoras intergénicas transcritas (ITS por sus siglas en inglés), ITS1 e ITS2, estas regiones no se traducen en ARNr.

Aunque los genes ribosomales (ARNr) son altamente conservados en todas las especies fúngicas, las ITS fluctúan en tamaño (ITS1, 5.8S, ITS2; aproximadamente de 0.45 0.80 kb) y en su secuencia para la mayoría de los hongos. (Figura 1).

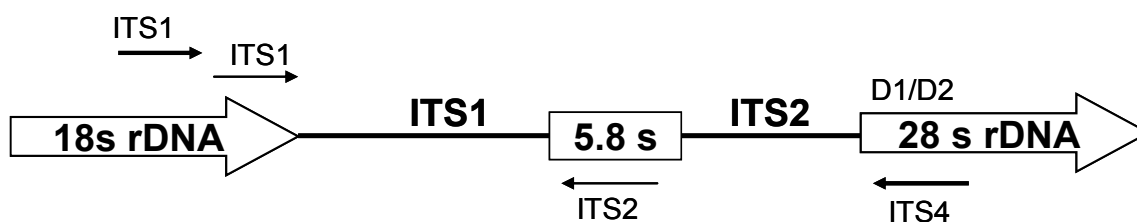


Figura 1. Representación de la región ITS. Los cebadores ITS1 e ITS4 externos, permiten amplificar la región completa. D1/D2 se utilizan para identificar levaduras

Cabe destacar que para la identificación molecular de otras especies fúngicas existen otras secuencias blanco tales como *H. capsulatum* el gen HcP100, para *Coccidioides* el gen Ag2/PRA, para *Paracoccidioides* el gen gp43, se utiliza la región extendida del ARN ribosomal 28s ext., y para *Pneumocystis jirovecii* el gen utilizado para la identificación es mtLSU.

Método de amplificación de ADN y tipificación molecular

Los métodos a emplear en el diagnóstico e identificación de especies fúngicas pueden ser especie-específica, género-específica o panfúngica. Todos involucran la amplificación selectiva de uno o más fragmentos de ADN *in vitro*.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR es una técnica basada en la amplificación selectiva *in vitro* de un fragmento de ADN utilizando cebadores específicos diseñados para tal fin. Estos cebadores se obtienen a partir de alineamientos múltiples de secuencias de ADN de genes completos, promotores de genes, regiones íntergénicas o espaciadoras, que se encuentran en la base de datos del Genbank.

En Genbank, además es posible encontrar un gran número de secuencias de ADN genómicos de animales, plantas y de microorganismos incluyendo virus, bacterias y hongos, los que se encuentran secuenciados total o parcialmente.

En la actualidad existen programas bioinformáticos que permiten realizar el alineamiento de secuencias de ADN y el diseño de cebadores específicos. Además, brindan información sobre las propiedades fisicoquímicas de los cebadores (temperatura de melting), y otras propiedades que pueden alterar el normal funcionamiento de los cebadores, como la formación de dímeros.

La PCR requiere el uso de una enzima ADN polimerasa termoestable (Taq Polimerasa), un molde de ADN, cebadores específicos, dNTPs (nucleótidos), buffers (CL₂Mg) y un termociclador que cíclicamente varía la temperatura para generar los ciclos térmicos necesarios para permitir la síntesis de las cadenas de ADN.

En las últimas décadas se ha extendido la utilización de un tipo específico de PCR en el diagnóstico e identificación de agentes patógenos, por la elevada sensibilidad que presenta la técnica, su sencillez, rapidez y la posibilidad de multiplexarla para detectar más de un patógeno en una misma reacción.

Existen una gran variedad de tipos de PCR: como la Nested-PCR, Multiplex-PCR y Realtime PCR entre otras, que se utilizan en el diagnóstico y en la identificación de especies fúngicas.

PCR panfúngica: amplifica selectivamente fragmentos de ADN de la región de los ITS1, ITS2, 28s y D1-D2. Permite identificar distintos organismos por diferencia en los tamaños de los amplicones, pero solo a nivel de grupo. Para identificar a especies más estrechamente relacionadas se deben secuenciar los fragmentos de ADN obtenidos luego de las PCR (los cuales poseen longitudes en pares de bases muy similares) y compararlos con las secuencias guardadas en las bases de datos del banco de genes.

Esta técnica se ha utilizado para identificar a las especies de *Aspergillus* de las secciones *Flavi*, *Fumigati* y *Nigri*; *Candida albicans* a nivel de complejo, *Candida glabrata* a nivel de complejo, *Penicillium sp.*, *Scedosporium sp.*, *Rhizopus sp.*, *Rhizomucor sp.*, *Saksenaea sp.*, *Mucor sp.*, entre otros.

Nested PCR: involucra dos rondas sucesivas de amplificación de ADN, en donde el producto de la primera ronda se utiliza como molde para la siguiente ronda. Son necesarios 2 pares de cebadores. Unos externos para la primera ronda y unos internos para la segunda ronda. Esta variante mejora notablemente la sensibilidad de la PCR, sobre todo cuando se trata de muestras clínicas con baja carga del microorganismo que se pretende identificar. Se utiliza en el diagnóstico de *H. capsulatum*, *Paracoccidioides*, *P. jirovecii*.

Para la identificación de *Coccidioides* se requiere la secuenciación del producto de la segunda ronda de PCR, lo que permite diferenciar entre las especies crípticas *C. immitis* y *C. posadasii*.

Multiplex PCR: se basa en la utilización de hasta 6 pares en la misma reacción de amplificación de ADN. Permite identificar por presencia, ausencia o por diferencias, en los tamaños de los amplicones, distintos patógenos.

La utilización de esta variante de PCR ha permitido diferenciar 8 especies de levaduras del género *Candida*: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* y *C. dubliniensis*.

Real time PCR: utiliza cebadores y sondas específicas para los distintos organismos a analizar. Si la comparamos con las anteriores PCR, posee una sensibilidad y especificidad muy alta, además nos permite cuantificar la cantidad de ADN genómico en la muestra procesada. La principal desventaja es que se requiere una sonda específica marcada por cada especie a analizar con el consiguiente incremento en el costo de la técnica. Ha sido utilizada en el diagnóstico de enfermedades causadas por *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* y *A. terreus*.

Tipificación molecular

La implementación de las técnicas moleculares en el proceso de diagnóstico marcó un cambio sustancial en el área de salud.

Entre las principales ventajas que aportan estas técnicas se encuentran:

- Brindan una identificación precisa y confiable de los agentes etiológicos, esto es de importancia, no solo para el diagnóstico, sino también para la elección del tratamiento más seguro y eficaz.
- Para algunas especies fúngicas se han descrito los mecanismos de resistencia molecular frente a los antifúngicos de uso habitual.
- Son herramientas que permiten distinguir más de un agente patógeno involucrado en el proceso infeccioso.
- Son técnicas de elección para detectar colonización, episodios recidivantes, brotes, etc.
- La tipificación molecular permite diferenciar entre individuos emparentados al identificar las variaciones genéticas entre ellos.
- Son técnicas confiables para distinguir entre los aislados ambientales de los aislados clínicos, y establecer sus posibles vinculaciones.

En la actualidad, las técnicas basadas en el estudio macro/micromorfológico, pruebas bioquímicas y serología están destinadas principalmente a monitorear la presencia de los agentes fúngicos. Los resultados que se obtienen con estas técnicas nos permiten generar un diagnóstico presuntivo. Pero la tipificación molecular nos permite caracterizar a las especies crípticas descriptas en numerosas familias de hongos, así como conocer los mecanismos de resistencia a los antifúngicos.

Técnicas de tipificación molecular

Existen distintas técnicas de uso en el diagnóstico micológico, las principales son:

Técnicas basadas en un patrón:

Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (polimorfismos en la amplificación aleatoria del ADN).

Se utiliza para la identificación de especies para las que no se cuenta con suficientes datos genómicos previamente publicados, o bien para las cuales se quiere obtener información genética de manera rápida y relativamente económica. Se emplean cebadores inespecíficos que amplifican al azar diferentes regiones en el genoma y generan un patrón de productos de PCR o huella genética que se visualizan mediante una electroforesis en geles de agarosa o acrilamida.

PCR-fingerprinting

Utiliza un único cebador cuya secuencia es repetitiva. Luego de la PCR se obtienen perfiles específicos de especies de hongos que no son identificables con técnicas clásicas. Esta técnica se ha utilizado para identificar especies de dermatofitos, *Microsporum canis*, *Nannizzia gypsea*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton ajelloi*, y *Epidermophyton floccosum*, con un único cebador (GACA)⁴.

Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) (polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados).

La técnica de AFLP detecta los cambios de tamaño de las distintas regiones o loci en el genoma y no se requiere conocer su secuencia. Básicamente, en esta técnica se realiza la digestión parcial del ADN utilizando enzimas de restricción. A los fragmentos se les unen en cada extremo adaptadores complementarios y posteriormente se amplifican por PCR, luego los productos son separados por tamaño utilizando electroforesis. La técnica es útil para identificar la variabilidad genética de aislamientos de *Fusarium oxysporum*.

Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP) (polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción)

Se basa en la amplificación selectiva de un fragmento de ADN, que luego se digiere con una endonucleasa de restricción. Permite obtener un patrón de fragmentos de diferente longitud que resulta específico para especies relacionadas estrechamente.

Por ejemplo, el complejo *Sporothrix schenckii* está formado por especies las cripticas *S. schenckii* sensu stricto, *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix globosa* y *Sporothrix luriei* indiferenciables por morfo-fisiología. La identificación de las especies del complejo se realiza mediante PCR/RFLP sobre el gen de la calmodulina con los cebadores CL1 y CL2A, posteriormente se

digieren los productos de PCR con la endonucleasa HhaI. De ese modo se diferencian por los patrones de restricción a *S. schenckii*, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, tal como se puede observar en la siguiente figura:

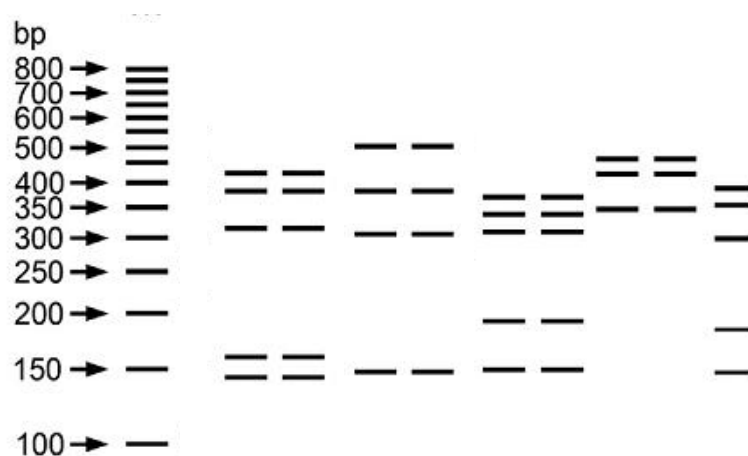


Figura 2. PCR/RFLP de *Sporothrix*. Calle 1 ladder, calles 2 y 3 *S. brasiliensis*, calles 3 y 4 *S. schenckii*, calles 5 y 6 *S. globosa*, calle 7 y 8 (*S. mexicana* o *S. pallida*), calle 9 *S. luriei*.

Técnicas basadas en secuenciación

Single-Locus Sequence Typing (SNP), (secuenciación de un solo locus).

El genotipificado por SNP permite medir las variaciones genéticas de polimorfismos de nucleótido único (SNP) entre miembros de una especie.

Los SNP son uno de los tipos más comunes de variación genética. Un SNP es una mutación de un solo par de bases en un locus específico que generalmente consta de dos alelos (donde la frecuencia de alelos poco común es $> 1\%$). Se ha descubierto que los SNP están implicados en la etiología de muchas enfermedades humanas y están adquiriendo un interés particular en farmacogenética. Debido a que los SNP se conservan durante la evolución, se han propuesto como marcadores para su uso en análisis de loci de rasgos cuantitativos (QTL) y en estudios de asociación en lugar de microsatélites. El uso de SNP se está ampliando en el proyecto *HapMap*, cuyo objetivo es proporcionar el conjunto mínimo de SNP necesarios para genotipar el genoma humano. Los SNP también pueden proporcionar una huella genética para su uso en pruebas de identidad.

Se han desarrollado una amplia gama de métodos de genotipificado de SNP, divididos entre:

- Aquellos que utilizan un paso de hibridación previa *Dynamic allele-specific hybridization* (DASH), *Molecular beacons*, *SNP microarray*.
- Los métodos basados en enzimas, *SNP-RFLP*.
- Los métodos que se basan en PCR, *Tetra-primer amplification refractory mutation system* PCR, *ARMS-PCR*, *Flap endonuclease* (FEN).

Por otra parte, existen otras metodologías *pos*-PCR, tales como Temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) o Denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC).

Multi-Locus Sequence Typing (MLST), (*Tipificación de secuencias multilocus*)

La técnica de tipificación de secuencias multilocus (MLST) se utiliza para caracterizar aislamientos de especies fúngicas utilizando las secuencias de ADN de fragmentos internos de múltiples genes *Housekeeping*. Se utilizan fragmentos internos de varios genes, de 450-500 pares de bases, que posteriormente se secuencian en un secuenciador de ADN automatizado. Para cada gen secuenciado, las diferentes secuencias presentes dentro de una especie fúngica se asignan como alelos distintos y, para cada aislado, los alelos en cada uno de los loci definen el perfil alélico o el tipo de secuencia (ST). Las bases de datos MLST contienen las secuencias de alelos de referencia y los tipos de secuencias para cada organismo, y también aíslan datos epidemiológicos. Los sitios web contienen software de consulta y análisis que permite a los usuarios comparar y consultar sus secuencias de alelos y tipos de secuencias. La técnica MLST se utiliza ampliamente como herramienta para investigadores y trabajadores de la salud pública.

La mayoría de las bases de datos MLST están alojadas en 2 servidores *web* actualmente ubicados en Imperial College, Londres (mlst.net) y en la Universidad de Oxford (pubmlst.org).

Las bases de datos alojadas en cada sitio son diferentes y contienen secuencias de alelos de referencia específicos del organismo y listas de ST para organismos individuales.

Esta técnica se ha utilizado para estudios de genotipificación de aislados clínicos de *C. albicans* y se estudiaron los genes *AAT1a*, *ACC1*, *ADP1*, *MPIb*, *SYA1*, *VPS13*, y *ZWF1b*.

Multi-Locus Microsatellite Typing- Variable Number Tandem Repeat (MLMT, VNTR), (*tipificación de microsatélites multilocus, número variable de tándem repetidos*).

Las repeticiones en tándem de número variable (VNTR) son secuencias de nucleótidos cortas (20 a 100 pb) que varían en número de copias en los genomas de los microorganismos. Se cree que surgen a través del deslizamiento de la cadena de ADN durante la replicación y su función es desconocida. Los loci VNTR separados se identifican a partir de secuencias publicadas y, a menudo, se encuentran en regiones intergénicas y marcos de lectura abiertos anotados. Los cebadores están diseñados para amplificar de cinco a ocho loci y los productos secuenciados para generar un perfil digital. La tipificación VNTR es rápida y reproducible, y relativamente sencilla de realizar. Se puede lograr una mejor discriminación mediante la identificación de más loci, pero existe un debate sobre su estabilidad a lo largo del tiempo. A partir de esta metodología se ha podido realizar el genotipificado de cepas de *Trichophyton interdigitale*.

Whole Genome Sequence Typing (WGST), (*secuenciación de genoma completo*).

Los métodos de tipificación basados en la secuenciación del genoma completo (WGS) han surgido como herramientas epidemiológicas prometedoras y altamente discriminatorias.

La aplicación de WGS proporciona una gran cantidad de información y la resolución más alta posible para la subtipificación de patógenos. Es una herramienta útil que aporta información importante para la detección y caracterización de brotes, además permite vigilar la aparición y propagación de mecanismos de resistencia a los antimicrobianos.

Esta información es crucial para diseñar nuevas estrategias de diagnóstico temprano, así como para el control de infecciones y el uso racional de los antimicrobianos.

En la tabla 1 se resumen las principales características de las técnicas mencionadas

Tabla 1. Principales características de las técnicas moleculares usadas en diagnóstico micológico

	Técnicas					
	RAPD/PCR-fingerprinting	AFLP	SNP	MLMT	MLST	WGST
Alcances	Diferencia aislados no relacionados	ADN genómico	ADN de gen/locus único	Detecta variaciones en microsatélites (2-6 pares de bases)	ADN	Fragmentos de ADN
Especie-especifico	No	No		No	SI	
Sensibilidad	Variable entre especies y con diferentes primers	Muy sensible	Locus dependiente	Muy sensible		
Costo	Accesible	Moderado		Elevado	Elevado	Elevado
Complejidad	Estandarización meticulosa	Requiere programas específicos de análisis	Fácil para comparar datos	Moderada	Muy complejo	Muy complejo
Reproducibilidad	Baja	Dificultad inter-laboratorio	Alta	Alta	Alta	Alta

RAPD: Randomly Amplified Polymorphic DNA; amplificación aleatoria del ADN polimórfico; PCR-fingerprinting

AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism; fragmento amplificado de la longitud de polimorfismo.

SNP: Single-Locus Sequence Typing; secuenciación de un solo locus.

MLST: Multi-Locus Sequence Typing; tipificación multilocus de secuencias.

MLMT: Multi-Locus Microsatellite Typing; tipificación de microsatélites multilocus, número variable de tándem repetidos.

WGST: Whole Genome Sequence Typing; secuenciación de genoma completo

Referencias

- Alcoba Flórez J, Arévalo-Morales MP, Pérez Roth E, Laich F, Rivero Pérez B, Méndez-Álvarez S. *Yeast molecular identification and typing*. www.researchgate.net/publication/237227526.
- García-Effron G, Canton E, Pemán J, Dilger A, Romá E, Perlin DS. (2011). *Assessment of Two New Molecular Methods for Identification of Candida parapsilosis Sensu Lato Species*. J Clin Microbiol. p3257–3261.
- Garner CD, Starr JK, McDonough PL, Altier C. (2010). *Molecular Identification of Veterinary Yeast Isolates by Use of Sequence-Based Analysis of the D1/D2 region of the large ribosomal subunit*. J Clin Microbiol 48(6): 2140-6.
- Gherbawy Y, Voigt K. (2010). *Molecular Identification of Fungi*. <http://www.researchgate.net/publication/221875357>.
- Guarro J. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. (2012). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 30(1):33-39.
- Hay RJ, Morris Jones R. (2010). *New molecular tools in the diagnosis of superficial fungal infections*. Clinics in Dermatology. (28):190–196.
- Hibbett DS, Ohman A, Glotzer D, Nuhn M, Kirk P, Nilsson RH. (2011). *Progress in molecular and morphological taxon discovery in Fungi and options for formal classification of environmental sequences*. Fungal Biology Reviews. 25(1):38-47.
- L'Ollivier C, Labruère C, Jebrane A, Bougnoux M-E, d'Enfert C, Bonnin A, Dalle F. (2012). *Using a Multi-Locus Microsatellite Typing method improved phylogenetic distribution of Candida albicans isolates but failed to demonstrate association of some genotype with the commensal or clinical origin of the isolates*. Infection, Genetics and Evolution, 12(8), 1949–1957.
- Raja HA, Miller AN, Pearce CJ, Oberlies NH. (2017). *Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community*. J. Nat. Prod. (80). p756 770.
- Romeo O, Criseo G. (2008). *First molecular method for discriminating between Candida africana, Candida albicans, and Candida dubliniensis by using hwp1 gene*. Diagn Microbiol Infect Dis. 62(2):230-3. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2008.05.014.
- Wagner K, Springer B, Pires VP, Keller PM. (2018). *Molecular detection of fungal pathogens in clinical specimens by 18S rDNA high-throughput screening in comparison to ITS PCR and culture*. Sci Rep. 8(1): 6964. doi: 10.1038/s41598-018-25129-w

Atlas

Susana B. Córdoba, Romina Della Vedova y Diana E. Rosa

La memoria más fuerte será aquella basada en imágenes.

Ramón Campayo, 2004. DESARROLLA UNA MENTE PRODIGIOSA

Levaduras del género *Candida*

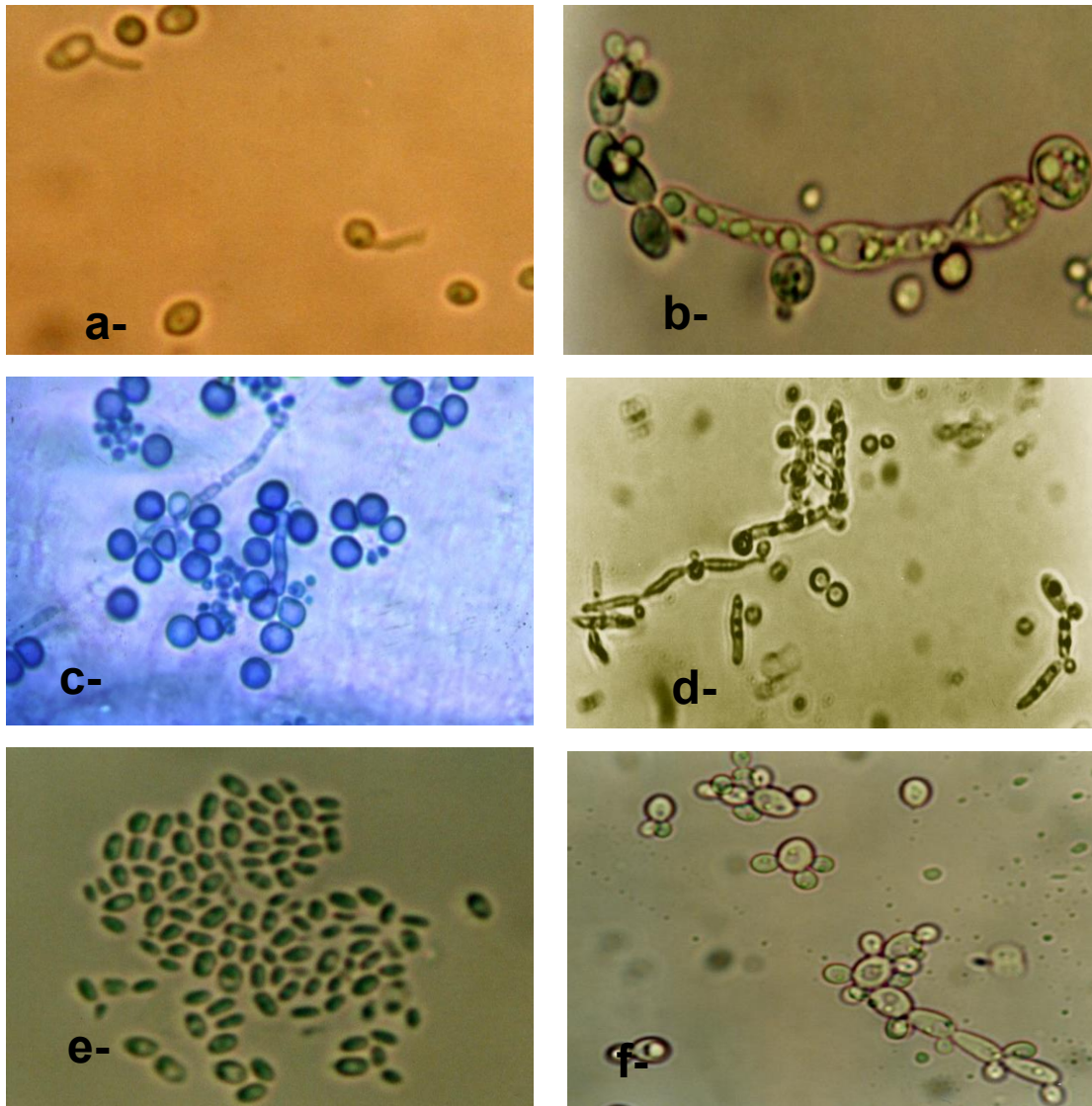


Foto 3.a- *Malassezia* sp., levadura con brotación monopolar; **b-c-** y **d-** *Malassezia* sp., levaduras con micelios cortos en escamas de piel; **e-** y **f-** *Malassezia* sp., en glándula lagrimal.

Hongos dermatofitos

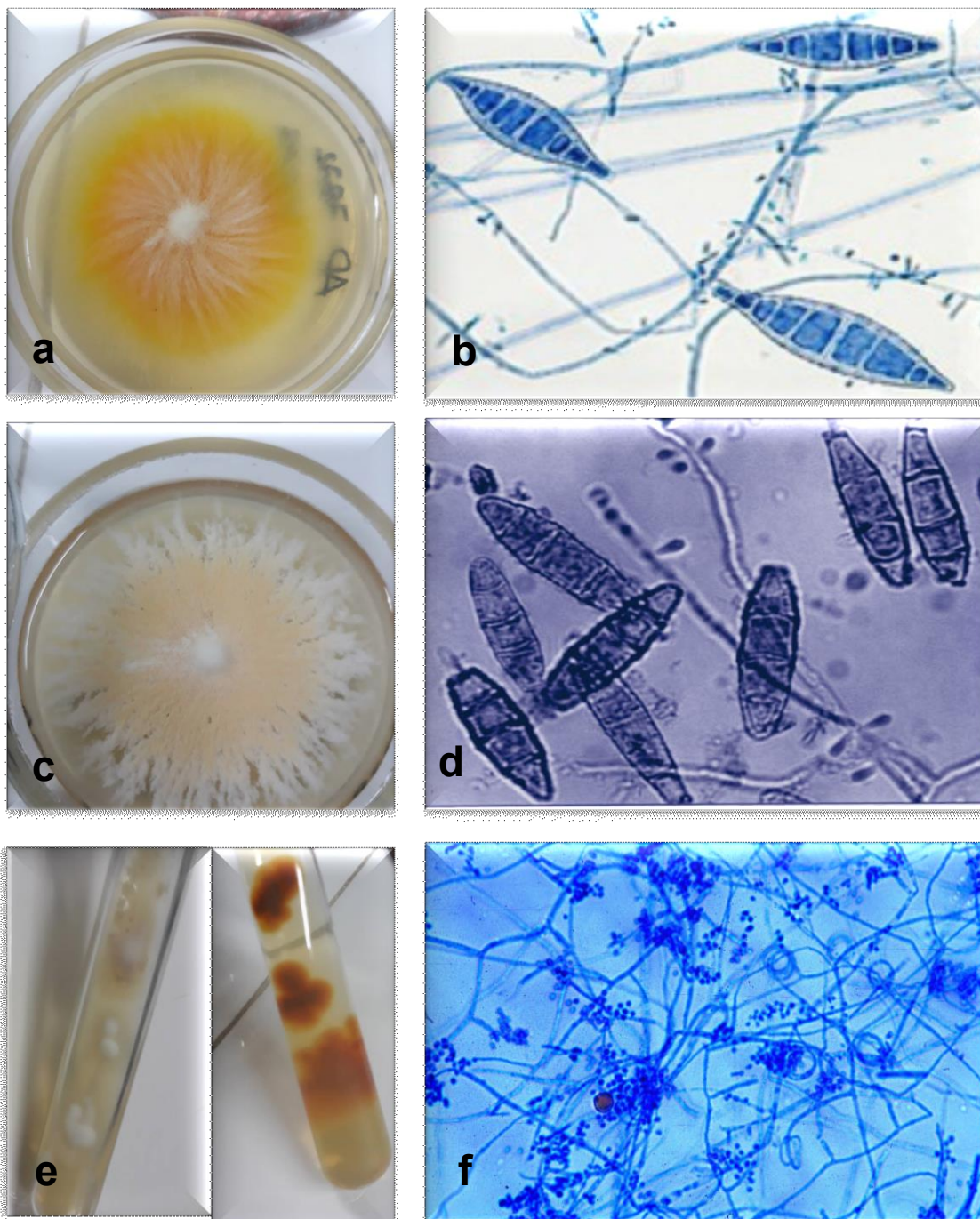


Foto 4. Cultivo de *Microsporum canis* en agar Sabouraud, presencia de pigmento amarillo; **b-** Macroconidias fragmosporadas de *M. canis*; **c-** Cultivo de *Nannizzia gypsea* en agar Sabouraud; **d-** Macroconidias de *N. gypsea*, base trunca; **e-** Cultivo de *Trichophyton* en agar Sabouraud; **f-** *Trichophyton mentagrophytes*, hifas espiraladas, microconidias en racimos.

Aspergillus spp.

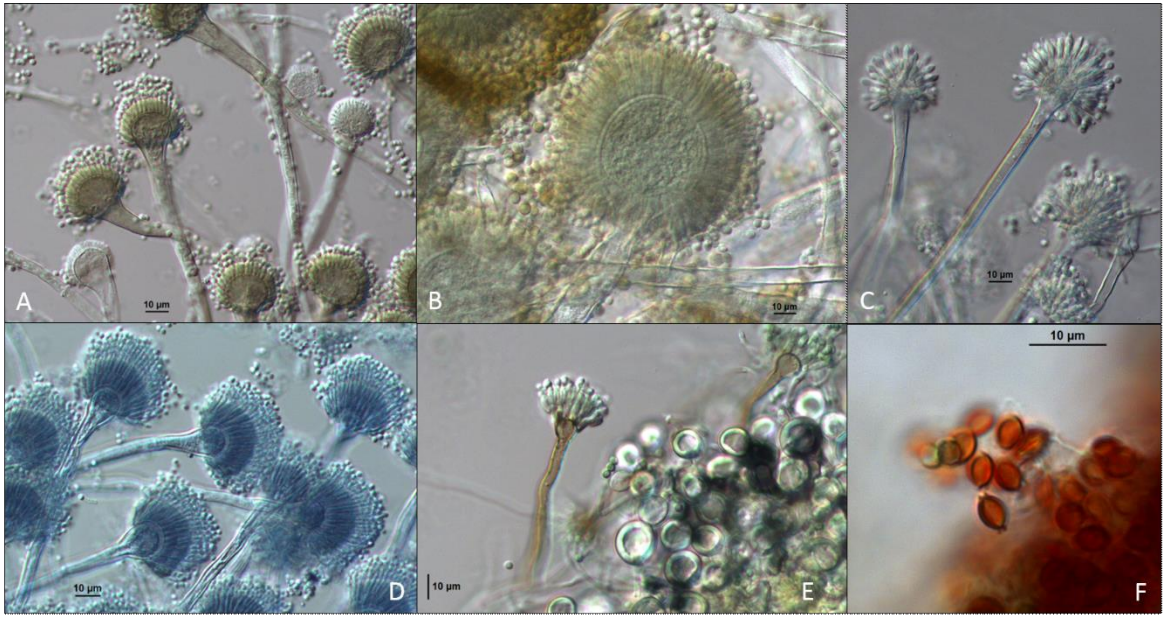


Foto 5- *Aspergillus fumigatus*; B- *Aspergillus flavus*; C- *Aspergillus sydowii*; D- *Aspergillus terreus*; E- *Aspergillus nidulans*; F- Ascosporas de *A. nidulans*. (A-E DIC 400x, F DIC 1000x).

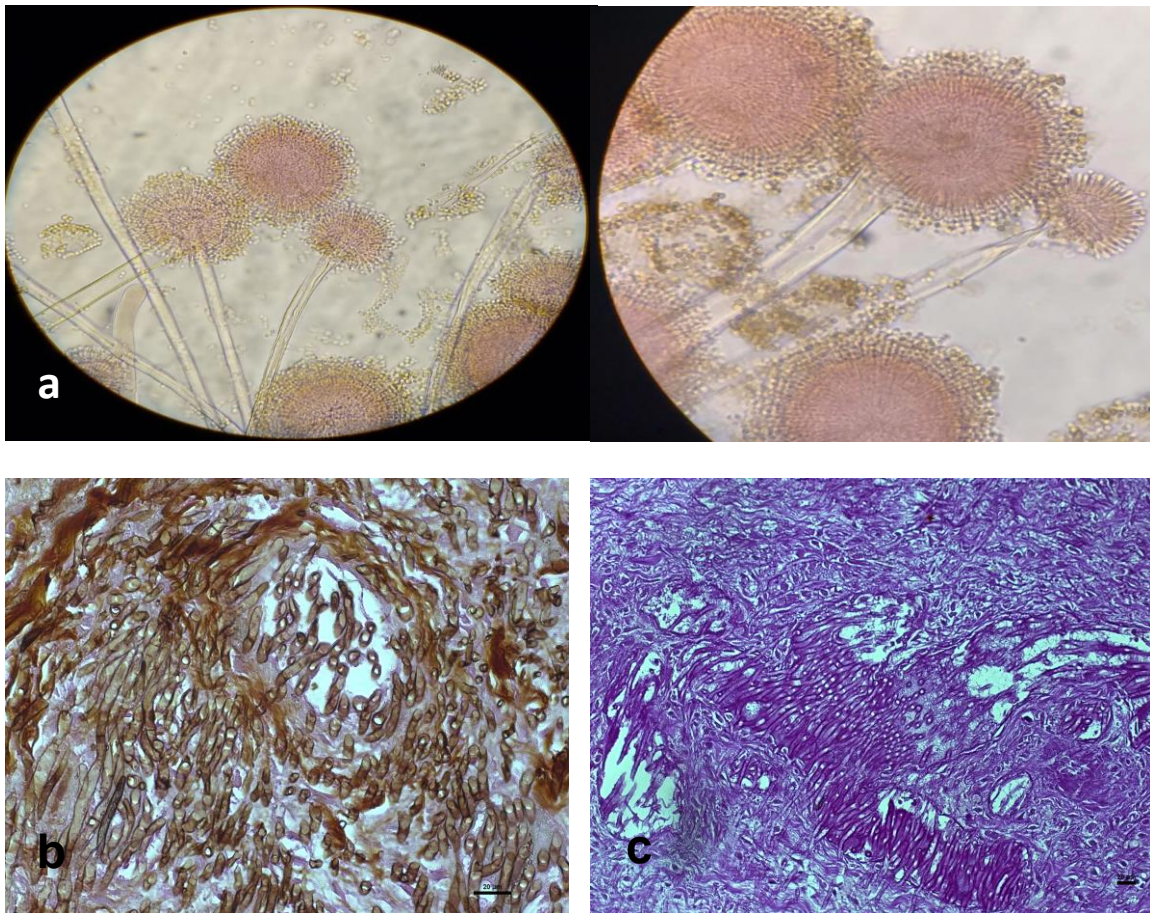


Foto 6. a- *Aspergillus flavus*, observación directa a partir de cultivo en agar Sabouraud; b- *Aspergillus sp.*, hifas tabicadas en tejido pulmonar, tinción Grocott; c- *Aspergillus sp.*, hifas tabicadas en tejido pulmonar, tinción PAS.

Mucorales

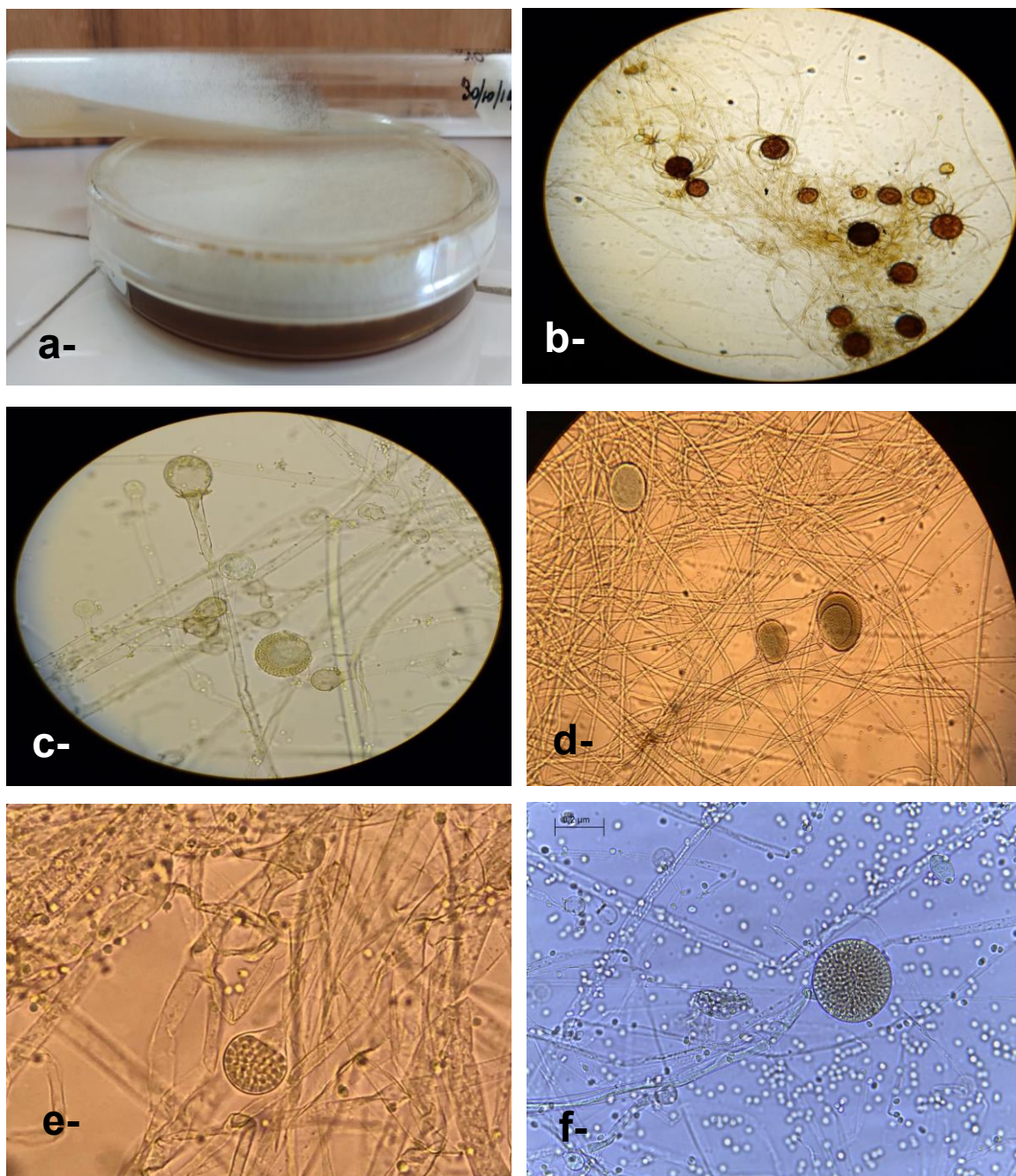


Foto 7.-a- Cultivo de hongos Mucorales en agar Sabouraud; **b-** Zigospora de *Absidia* sp., observación directa a partir del cultivo; **c-** *Rhizomucor* sp., observación directa a partir del cultivo; **d-** *Rhizopus* sp. observación directa a partir del cultivo; **e-** *Lichtheimia* sp., observación directa a partir del cultivo; **f-** *Mucor* sp., observación directa a partir del cultivo.

***Sporothrix* spp.**

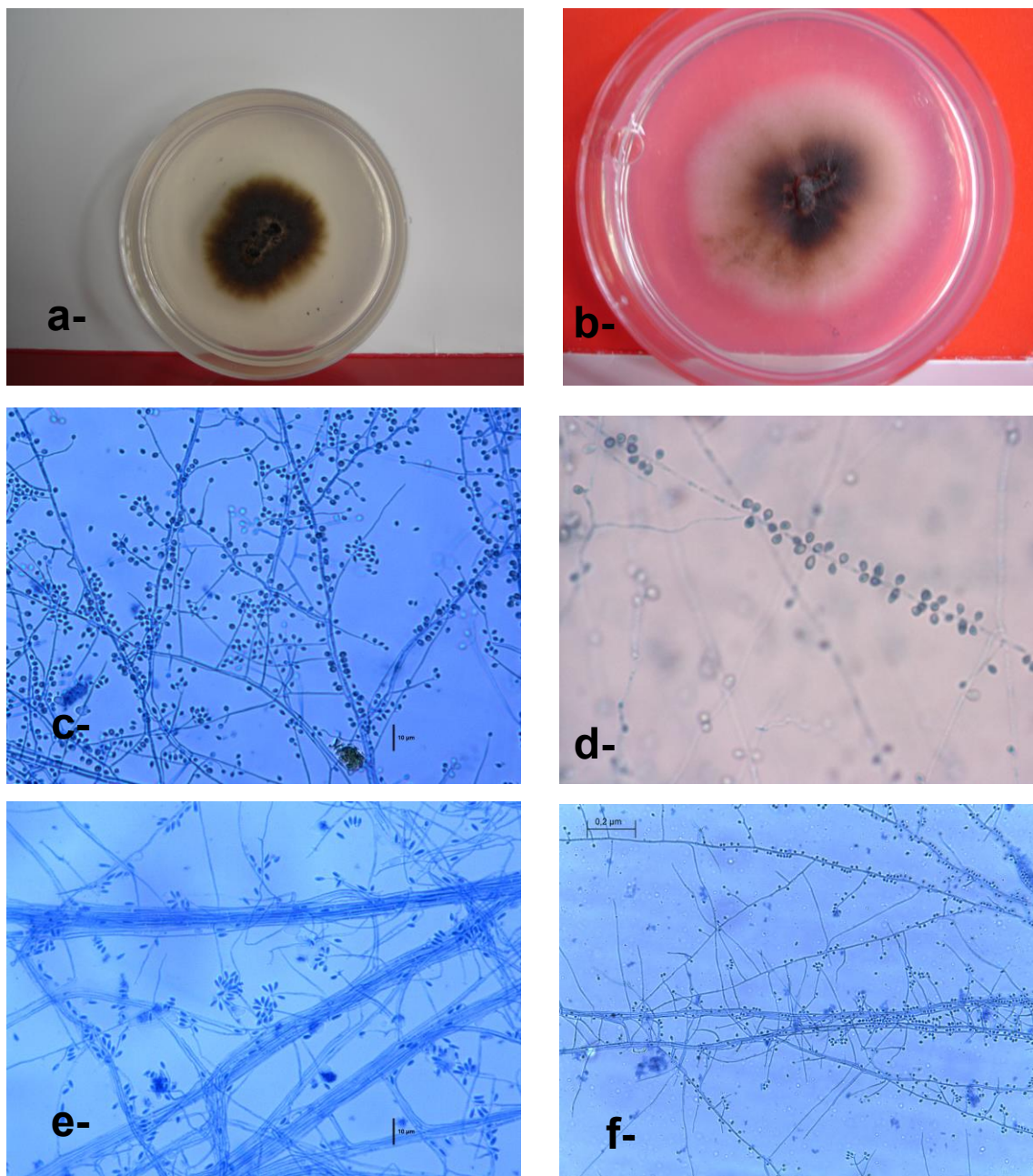


Foto 8.-a y b- Cultivo de *Sporothrix* sp., en agar Sabouraud, presencia de pigmento oscuro; **c-** *Sporothrix* sp., observación directa a partir del cultivo; **d-** Rhabdoconidios de *Sporothrix* sp.; **e y f-** *Sporothrix* sp., formación de empalizadas (sinemas) y agrupación de conidios en rosetas o margaritas.

Anexo

Medios de cultivo

Verónica A. Amor, Francisco J. Reynaldi y Marco A. Tizzano

Una comida bien equilibrada es como un poema al desarrollo de la vida.

Anthony Burgess

En esta sección se incluye la formulación y preparación de los medios de cultivo usados en el laboratorio para el estudio de la morfofisiología de las levaduras y hongos miceliales de importancia clínica. Para la realización de estas pruebas es necesario contar con el cultivo puro de los microorganismos en estudio.

Además, se describen pruebas bioquímicas que se utilizan para evaluar la actividad metabólica de levaduras de importancia clínica.

Agar acetato (Medio de esporulación de KLEIN`S)

Este medio se utiliza para inducir la formación de ascosporas en levaduras.

Bacto-triptosa	0,25 g
Glucosa	0,062 g
Cloruro de sodio	0,062 g
Acetato de Sodio. 3 H ₂ O	0,5 g
Agar	2 g
Agua destilada	100 mL

Preparación

- Disolver el agar por separado, una vez disuelto agregar las sales.
- Fraccionar a razón de 3 mL en tubo de vidrio de 13 x 100 mm.
- Esterilizar a 121° C durante 15 minutos. Estriar en pico de flauta.

Almacenamiento

- Máximo de 8 semanas en heladera entre 4-8° C.

Agar Czapeck

Hidrógeno fosfato de potasio	1 g
Sacarosa	30 g
Agar	15 g
Solución Czapeck	10 mL
Agua destilada c.s.p.	1000 mL

Preparación

- Mezclar los reactivos sólidos en una porción de agua, calentar en baño María hasta obtener una mezcla homogénea.
- Agregar la solución Czapeck, llevar a volumen y homogenizar.
- Evaluar el pH sobre una alícuota de 10 mL, en caso necesario ajustar a pH 6,5 +/- 0,3 antes de fraccionar.

Esterilización

- Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Distribución

- Dispensar 25 mL por placa de Petri de 10 cm de diámetro o 5-10 mL en tubos de ensayo.

Almacenamiento

- Máximo de 6 semanas en heladera entre 4-8° C.

Solución Czapeck

Nitrato de sodio	30 g
Cloruro de potasio	5 g
Sulfato de Magnesio heptahidratado	15 g
Sulfato ferroso heptahidratado	0.1000 g
Sulfato de Zinc heptahidratado	0.1000 g
Sulfato cúprico pentahidratado	0.0500 g
Agua destilada c.s.p.	100 mL

Preparación

- Mezclar los reactivos, llevar a volumen y mantenerlos en agitación constante hasta que todas las sales se hallan solubilizado.

Esterilización

- No aplica

Distribución

- Botella adecuada según el volumen preparado

Almacenamiento

- Máximo de 16 semanas en heladera entre 4-8° C.

Agar extracto de malta 2% con cloranfenicol 250 mg/L

Se utiliza para observar el desarrollo y la micromorfología de levaduras y hongos miceliales. El cloranfenicol inhibe el desarrollo de biota bacteriana que pueda estar asociada a la muestra clínica.

Extracto de malta	10 g
Agar	7,5 g
Agua destilada c.s.p.	500 mL
Solución cloranfenicol*	5 mL

***Solución de cloranfenicol**

Cloranfenicol*	125 mg
Alcohol 96° *	5 mL

Preparación

- Disolver el cloranfenicol en etanol.
- Mezclar bien el resto de los componentes, añadir el cloranfenicol con el etanol y calentar hasta su completa disolución.

Esterilización

- Esterilizar en autoclave a 121° C y a 1 atmósfera de presión, durante 15 minutos.

Distribución

- Dispensar 5 mL en tubos de vidrio de 150 x 16 mm, con tapa a rosca, o 20 mL por placa de Petri de 10 cm de diámetro.

Almacenamiento

- Máximo de 8 semanas en heladera entre 4-8° C.

Agar Gorodowka (medio para formación de ascosporas)

Se utiliza para estimular la producción de esporas.

Glucosa	0,1 g
Peptona	1 g
Cloruro sódico	0,5 g
Agar	2 g
Agua del grifo	100 mL

Preparación

- Mezclar y calentar los componentes hasta su completa disolución.

Esterilización

- Autoclave a 121° C y a 1 atmósfera de presión durante 15 minutos.

Distribución

- Dispensar 20 mL en placas de Petri estériles.
- Dispensar 10 mL en tubos de ensayo con tapón de rosca dejándolos solidificar en pico de flauta.

Almacenamiento

- Máximo de 8 semanas en heladera entre 4-8° C.

Agar harina de maíz

Este medio de cultivo se utiliza para la observación microscópica del desarrollo de la levadura formando micelio,seudomicelio y la disposición de blastoconidias sobre el soporte sólido del agar.

Harina de maíz amarillo	12,5 g
Agar	3,8 g
Agua destilada c.s.p.	300 mL

Preparación

- Disolver la harina en 300 mL de agua destilada, calentar en baño María a 60 °C durante 1 h.
- Filtrar a través de papel y llevar a volumen con agua destilada.
- Agregar el agar y autoclavar a 121 °C, 5 minutos.
- Sin dejar enfriar refiltrar a través de algodón y fraccionar.
- Esterilizar en autoclave, durante 15 minutos a 121 °C.

Almacenamiento

- Máximo de 8 semanas en heladera entre 4-8° C.

Agar papa dextrosa

Se utiliza para cultivo de hongos miceliales en general. Dependiendo la especie en estudio puede variar la concentración de glucosa en 1 %, 2 % o 4 %.

Papa	75 g
Glucosa	20 g
Agar	15 g
Agua destilada c.s.p.	1000 mL

Preparación

- Pelar una papa y cortarla en pequeños cubos. Seleccionar 75 gramos de la papa y hervirlos con una mínima cantidad de agua corriente hasta que se deshaga.
- Utilizar capas superpuestas de gasa para filtrar la papa cocinada, y recolectar el líquido en el que fue cocinada, escurrir el filtrado.
- Mezclar en una porción de agua el agar y la glucosa, calentar en baño de María hasta la obtener una mezcla homogénea.
- Mezclar ambas soluciones, llevar a volumen y mantener en baño de María hasta que el agar termine de fundirse y homogenizarse.
- Controlar y ajustar el pH antes de fraccionar a 5,6 +/- 0,3.

Esterilización

- Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Distribución

- Dispensar 5 mL en tubos de 16 x 100 mm con tapa a rosca o tubos de 16 x 150 mm, o 25 mL por placa de Petri de 10 cm de diámetro.

Almacenamiento

- Máximo de 6 semanas en heladera entre 4-8° C.

Agar Sabouraud 2 % + cloranfenicol + cicloheximida

Se utiliza para cultivo de hongos miceliales. Si la muestra se obtiene de sitios no estériles (piel, abscesos abiertos, fístulas, etc.) se agrega cloranfenicol + cicloheximida para inhibir el desarrollo de bacterias o de hongos que puedan estar presentes.

Glucosa	20 g
Bacto Peptona	10 g
Agar	20 g
Agua destilada c.s.p.	1000 mL
Solución de cloranfenicol*	10 mL
Solución de cicloheximida**	10 mL

***Solución de Cloranfenicol**

Cloranfenicol	250 mg
Alcohol 96	10 mL

****Solución de Cicloheximida**

Cicloheximida	400 mg
Acetona	10 mL

Preparación

- Fundir el agar en el agua en baño María. Luego agregar la glucosa y la peptona y homogeneizar.
- Agregar la solución de cloranfenicol y /o cicloheximida.
- Controlar y evaluar el pH sobre una alícuota y, de ser necesario, ajustar a 5.6 +/- 0,2.

Esterilización

- Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Distribución

- Dispensar 5 mL en tubos de 16 x 100 mm con tapa a rosca.
- Dispensar 25 mL por placa de Petri de 10 cm de diámetro.

Almacenamiento

- Máximo de 8 semanas en heladera entre 4-8° C.

Extracto de malta líquido

Es un medio de cultivo líquido. Se utiliza para la observación de la micromorfología de las levaduras.

Extracto de malta	30	g
Agua destilada c.s.p	1000	mL

Preparación

- Ajustar el pH a 5,4.
- Fraccionar a razón de 5 mL.
- Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Procedimiento

- Inocular en el extracto de malta líquido un cultivo en crecimiento activo (24-48 h) de la cepa en estudio.
- Incubar de 2 a 3 días a 25-28 °C y luego observar los cultivos en el microscopio teniendo en cuenta:
- Forma y tamaño de las células, modo de reproducción vegetativa, disposición de las células, aisladas, en pares, en racimos, en cadenas, presencia y forma de pseudomicelio y/o micelio verdadero.

Pruebas fisiológicas

A continuación, se describirán pruebas destinadas a evaluar la actividad fisiológica de levaduras de importancia clínica.

Pruebas fisiológicas para levaduras del género *Candida*

Producción de clamidoconidios

La formación de clamidoconidios es característica de *C. albicans* y *C. dubliniensis*. Son esporas de resistencia, redondas, refringentes, de pared engrosada y ricas en lípidos. Se pueden observar en medio semisólido de Bilis de Feo.

Medio de Bilis de Feo

Bilis de buey (Bacto Oxgall)	20 g
Agar	1 g
Cloranfenicol	250 mg
AD c.s.p.	1000 mL

- Disolver los 250 mg de cloranfenicol en 10 mL de alcohol etílico 96°.
- Mezclar los componentes y fundir en baño de María.
- Ajustar el pH a 6-7.
- Fraccionar a razón de 3 mL por tubo de 13 x 100 mm.
- Esterilizar en autoclave a 121 °C, durante 15 minutos.

Procedimiento

- Inocular con un cultivo en crecimiento activo de 24-48 h un tubo de medio semisólido de Bilis de Feo.
- Incubar a 25-28 °C durante 48 h y observar; si es negativo incubar hasta 5 días.

Producción de tubo germinativo

Se utiliza para identificar presuntivamente a las levaduras del complejo *C. albicans*.

Procedimiento

- Tomar una ansada de un cultivo fresco (incubación de 24 h) de la cepa en estudio y re-suspender en 0,5 mL de suero bovino o suero de personas controlado.
- Incubar a 37 °C y observar en microscopio óptico cada media hora, hasta las tres horas. Esta prueba debe realizarse con un control positivo (*C. albicans*) y uno negativo (*C. guilliermondii* u otra levadura que no forme tubo germinativo).

Lectura

Se observa una proyección digitiforme delgada, sin constricción en el punto de origen.

Pruebas fisiológicas para levaduras del género *Cryptococcus***Producción de fenoloxidasa: agar semillas de girasol (para identificación presuntiva del complejo *Cryptococcus neoformans/C. gattii*)**

Este medio es equivalente al de ácido cafeico o al de semillas de Niger (Staib).

Creatinina	780 mg
Cloranfenicol	50 mg
Difenilo	100 mg
Extracto de semillas de girasol*	200 mL
Glucosa	10 g
Agar	20 g
Agua destilada c.s.p.	1000 mL

Preparación

- Disolver el agar en 800 mL de agua destilada a baño de María, una vez fundido agregar el resto de los componentes y homogeneizar.
- Autoclavar a 121 °C 15 minutos y distribuir en placas de Petri a razón de 20 mL.

*** Extracto de semillas de girasol:**

- Moler 140 gramos de semillas de girasol en mortero o molinillo y agregar 350 mL de agua destilada, autoclavar 10 minutos a 121 °C y filtrar a través de gasas.

Solo *C. neoformans* y *C. gattii* producen un pigmento marrón en el agar semillas de girasol a temperatura ambiente. Este efecto también se observa en el medio de ácido cafeico debido a la actividad fenoloxidasa localizada en la pared celular de este hongo.

Ninguna otra especie de *Cryptococcus*, ni otras levaduras, poseen esta propiedad y por lo tanto, no producen color marrón en estos medios.

Procedimiento

- Dividir la placa del medio de cultivo en dos sectores, sobre uno de ellos estriar la cepa incógnita y sobre el otro la cepa control positivo.
- Incubar la placa a 25-28 °C durante tres días o hasta que el testigo adquiera color marrón.

Interpretación

El ensayo se considera positivo cuando la cepa en estudio adquiere color marrón y es más oscuro que el del que desarrolló sobre el agar Sabouraud.

Producción de ureasa por *Cryptococcus* sp

C. neoformans, *C. gattii*, otras especies de *Cryptococcus*, las especies de *Trichosporon*, *Malsessezia* y *Rhodotorula* producen ureasa, sin embargo, la mayoría de las especies del género *Candida* no la producen.

El medio de urea que se usa contiene rojo de fenol, que vira al color rojo cuando se hidroliza la urea y se libera amonio alcalinizando el medio de cultivo.

Agar urea de Christensen

Peptona	1 g
Cloruro de sodio	5 g
Glucosa	5 g
Fosfato diácido de potasio	2 g
Urea	20 g
Rojo de fenol	12 mg*
AD c.s.p.	100 mL

Solución A

- Disolver todos los componentes en los 100 mL de agua destilada y esterilizar por filtración.
- Disolver 20 gramos de agar en 900 mL de agua destilada y esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 minutos.
- Dejar enfriar a 55-60 °C el agar y agregarle la solución A. Mezclar y distribuir en condiciones estériles a razón de 3 ml por tubo de 13 x 100 mm con tapa a rosca.
- *Se puede preparar 1:500 de Rojo de Fenol y agregar 6 mL (disolver el colorante en alcohol 50%).

Procedimiento

- Estriar la cepa incógnita en el medio de cultivo y en el mismo momento sembrar una cepa testigo.
- Incubar a 25-28 °C durante tres días y observar el cambio de color del indicador.

Interpretación

Se interpreta como positiva la aparición de color rojo magenta en el medio de cultivo donde se inoculó la cepa. Si el color original no se modifica o se torna amarillo la prueba es negativa.

Es necesario asegurar la pureza de la cepa en estudio ya que las bacterias pueden producir ureasa.

Medio para la diferenciación presuntiva de *C. neoformans* y *C. gattii*

Agar Canavanina-Glicina-Azul de Bromotimol (CGB)

Solución A		Solución B	
Glicina	10 g	Sodium Bromotimol blue	0,4 gr
KH ₂ PO ₄	1 g	Agua destilada	100 mL
MgSO ₄	1 g		
Tiamina- HCl	1 mg		
L- Canavanina sulfato	30 mg		
Agua destilada	100 mL		

Ajustar a pH 5.6 y esterilizar por filtración.

Para preparar un litro de medio, mezclar 880 mL de agua destilada, 20 mL de **solución B** y 20 gr de agar. Autoclavar durante 15 minutos a 121 °C. Con el agar aún caliente, agregar 100 mL de **solución A** y homogeneizar. Dispensar en tubos estériles y estriar.

Para preparar 100 mL

Solución B	2 mL
Agar	2 gr
Agua destilada	88 ml pH= 7
Autoclavar	15 minutos a 121°C
Luego agregar:	
Solución A	10 mL

Procedimiento

- Inocular e incubar durante 24 h a 5 días.

Interpretación

C. neoformans no desarrolla en presencia de canavanina, el medio de cultivo mantiene el color verde amarillento y la reacción es negativa. En cambio, *C. gattii* desarrolla en presencia de canavanina y vira al color azul.

En cada determinación se debe incluir control positivo y un control negativo con cepas *C. gattii* y *C. neoformans* de referencia.

Medios de cultivo utilizados para la identificación de especies de *Malassezia*

Las especies de *Malassezia* son lipofílicas, a excepción de *M. pachydermatis* que puede desarrollar sin el agregado de lípidos. Los medios de cultivo para *Malassezia* llevan lípidos en su composición.

Medio de Dixon

Extracto de malta	3,6 g
Peptona	0,6 g
Bilis de buey (Bacto Oxgall)	2 g
Tween 40	1 g
Glicerol	0,5 g
Agar	1,5 g
Agua destilada c.s.p.	100 mL

Preparación

- Fundir el agar en el agua en baño de María. Agregar la glucosa, la peptona, la bilis de buey, el tween y el glicerol. Homogeneizar.
- Fraccionar a razón de 7 mL por tubo y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

Agar Sabouraud adicionado con bilis de buey (para *Malassezia* spp.)

Glucosa	20 g
Peptona	10 g
Agar	15 g
Cicloheximida	400 mg
Cloranfenicol	250 mg
Bilis de buey (Bacto Oxgall)	20 g
Agua destilada c.s.p.	1000 mL

Preparación

- Fundir el agar en el agua a baño de María.
- Agregar la glucosa, la peptona y la bilis de buey. Homogeneizar.
- Fraccionar a razón de 7 ml por tubo y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

Los autores

Coordinadores

Córdoba, Susana Beatriz

Doctora en Bacteriología Clínica e Industrial (UNLP). Magister en Microbiología Molecular (UNSAM). Bacterióloga Clínica e Industria y Médica Veterinaria (UNLP). Profesora Titular de la Cátedra Micología Médica e Industrial, carrera de Microbiología Clínica e Industrial, UNLP. Coordinadora del Módulo Micología, carrera de la Especialización en Diagnóstico de Laboratorio Veterinario de la UNLP. Docente–Investigador (categoría II). Responsable del Laboratorio Antifúngicos, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas “Dr. C. G. Malbrán”, Centro Colaborador de la Organización Panamericana de la Salud. Directora de proyectos nacionales e internacionales de vigilancia de la resistencia a los antifúngicos. Miembro de GLASS-WHO (Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System. World Health Organization). Autora/coautora de más de 75 trabajos científicos en revistas nacionales e internacionales.

Reynaldi, Francisco José

Doctor en Ciencias Naturales (UNLP). Licenciado en Biología (UNLP), Bacteriólogo Clínico e Industrial (UNLP). Profesor adjunto de la Cátedra de Micología Médica e Industrial de la Carrera de Microbiología Clínica e Industrial, Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP y Docente de los Cursos de Microbiología I y Microbiología II, Facultad de Ciencias Veterinarias UNLP. Investigador Independiente del CONICET y docente investigador de la UNLP. Director y/o codirector de becarios de grado, becarios doctorales, becarios posdoctorales e Investigadores. Director y/o codirector de proyectos de investigación nacionales (UNLP, CONICET, CIC-PBA, ANPCyT, CFI y Min. Agri. Prov .de Buenos Aires) e internacionales (Francia, Ecuador, Perú). Ha realizado más de 100 presentaciones a congresos y publicado más de 60 trabajos científicos en revistas nacionales e internacionales.

Rosa, Diana Esther

Doctora en Ciencias Veterinarias (UNLP). Bacterióloga Clínica e Industrial (UNLP). Médica Veterinaria (UNLP). Docente de la Cátedra de Micología Médica e Industrial y Jefa de trabajos prácticos de la Cátedra de Fisiología, Fac. Cs. Veterinarias, UNLP. Docente –Investigador (ca-

tegoría III). Miembro del Laboratorio de Nutrición Mineral, donde se realizan tareas de extensión, colabora en el diagnóstico de alteraciones de la nutrición mineral en bovinos, codirige las Prácticas Pre-Profesionales de la Carrera de Ciencias Veterinarias, UNLP. Vinculada con los Servicios a Terceros Área Médica: “Diagnóstico de Micosis superficiales”, (Ord. 219 - UNLP). Tutora de pasantes profesionales y alumnos de la carrera de Microbiología. Autora/coautora de trabajos científicos en revistas nacionales e internacionales. Autora/coautora de capítulos de libros (Microbiología Veterinaria (3ra Edición). Editorial Intermédica, 2019. Buenos Aires.

Autores

Amor, Verónica Andrea

Microbióloga Clínica e Industrial, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. Licenciada en Biología Orientación Zoología, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP. Graduada en el Tramo de Formación Pedagógica, realizado en el Instituto Superior de Formación Docente N° 9 de la Prov. de Bs. As. Ayudante Diplomada en Micología Médica e Industrial y en Micología General (Carrera de Microbiología, UNLP), y en los cursos Microbiología I y II de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP). Es docente en la Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP en el curso Unidad Pedagógica de Matemática y Elementos de Matemática, y en el Curso Introductorio a la FCNyM. Autora/coautora de capítulos en los Libros de Cátedra: Antromática. Aporte para la formación en Matemáticas...(2017), y en Matemática en Ciencias Naturales (2019). Editorial de la Universidad de La Plata (EDULP).

Della Vedova, Romina

Microbióloga Clínica e Industrial (UNLP). Médica Veterinaria (UNLP). Docente de los cursos de Microbiología I y II (Ciencias Veterinarias), curso Microbiología General y curso Micología Médica e Industrial (Microbiología) desde el año 2010. Docente del Módulo del Módulo Micología, carrera de la Especialización en Diagnóstico de Laboratorio Veterinario de la UNLP. Tutora de pasantes profesionales y estudiantes de la carrera de Microbiología. Tutora de Prácticas Pre-Profesionales de la Carrera de Medicina Veterinaria, UNLP. Profesional del servicio de Micosis superficiales y profundas (FCV-UNLP). Integrante titular de la Dirección de Derechos Humanos de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. Autora/coautora de trabajos científicos en revistas nacionales e internacionales. Autora/coautora de capítulos de libros (Microbiología Veterinaria (3ra Edición). Editorial Intermédica, 2019. Buenos Aires, Argentina. ISBN 978-950-555-474-4).

Tizzano, Marco Antonio

Doctor en Ciencias Veterinarias (UNLP). Licenciado en Biotecnología (UNQ). Jefe de Trabajos Prácticos de la Cátedra de Virología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. Participa en proyectos biotecnológicos aplicados al diagnóstico y prevención de enfermedades virales en animales. Docente en la Cátedra de Micología Médica e Industrial de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP, participa en el diagnóstico de infecciones fúngicas mediante técnicas moleculares. Participa en proyectos de Investigación, Desarrollo y Transferencia (CIC, Prov. de Buenos Aires), Agencia de Promoción Científica y Tecnológica (FONCYT). Tutor de pasantes profesionales y estudiantes, Fac. Cs Veterinarias, UNLP. Autor/coautor de trabajos científicos en revistas nacionales e internacionales. Autor/coautor de capítulos de libros (Microbiología Veterinaria (3ra Edición). Editorial Intermédica, 2019. Bs As, ISBN 978-950-555-474-4).

Della Vedoba, Romina

Micología en medicina veterinaria : guía de laboratorio para el diagnóstico de las micosis / Romina Della Vedoba ; Verónica Andrea Amor ; Marco Antonio Tizzano ; coordinación general de Susana Beatriz Córdoba ; Diana Esther Rosa ; Francisco José Reynaldi. - 1a ed. - La Plata : Universidad Nacional de La Plata ; EDULP, 2021.

Libro digital, PDF - (Libros de Cátedra)

Archivo Digital: descarga

ISBN 978-950-34-2009-6

1. Micología. 2. Medicina Veterinaria. 3. Infecciones. I. Amor, Verónica Andrea. II. Tizzano, Marco Antonio. III. Córdoba, Susana Beatriz, coord. IV. Rosa, Diana Esther, coord. V. Reynaldi, Francisco José, coord. VI. Título.

CDD 636.089

Diseño de tapa: Dirección de Comunicación Visual de la UNLP

Universidad Nacional de La Plata – Editorial de la Universidad de La Plata

48 N.º 551-599 / La Plata B1900AMX / Buenos Aires, Argentina

+54 221 644 7150

edulp.editorial@gmail.com

www.editorial.unlp.edu.ar

Eduulp integra la Red de Editoriales Universitarias Nacionales (REUN)

Primera edición, 2021

ISBN 978-950-34-2009-6

© 2021 - Eduulp

n
naturales


EDITORIAL DE LA UNLP



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA