

Micología Médica

Objetivos:

1. Introducir conceptos relacionados a micología médica y parasitología.
2. Proveerle información sobre términos usados en el ambiente clínico.
3. Observar ejemplos de hongos y parásitos que ocasionan enfermedades al humano.

I. Micología médica

A. ¿Qué son los hongos?

Los hongos son organismos heterótrofos que en su mayoría son multicelulares, pero hay unicelulares (levaduras). La unidad estructural de estos organismos es la **hifa** que es en forma de cilindro ya sea **tabicada** (septada) o **cenocítica** (sin septas o división). Las hifas crecen entrelazadas formando el **micelio** que puede tener diversa función en el hongo. Los hongos liberan las enzimas al sustrato donde crecen para luego absorber los componentes necesarios para su desarrollo. La pared celular de los hongos contiene celulosa y quitina. Hay algunos hongos que pueden desarrollar fase micelial (crecen como micelio, produciendo hifa) y fase levaduriforme. A estos hongos se le describe como dimórficos. La fase micelial la desarrollan a temperatura ambiente sin embargo la fase levaduriforme la desarrollan a temperatura corporal (37°C). Los hongos se pueden reproducir asexual como sexual. Cuando el hongo se conoce su reproducción asexual es conocido como la fase **anamorfo** del hongo. La reproducción asexual puede ser por fragmentación de la hifa, producción de conidas o gemación en las levaduras. En cambio, la fase **teleomorfo** es el estado de producción sexual del hongo. En esta etapa sexual los hongos producen esporas a través de la fusión de gametos o hifas especializadas. Las esporas desarrolladas dentro de un saco o asca son conocidas como ascosporas y lo producen los Ascomicetes. Las esporas desarrolladas sobre unas basidias son llamadas basidiosporas y las producen los Basidiomicetes. Los hongos Zygomycetes producen zigosporas. Las esporas son estructuras resistentes a desecación, agentes químicos, altas y bajas temperaturas.

B. Característica Macroscópicas y microscópicas de los hongos

Para la identificación de los hongos se requiere realizar unas observaciones a la colonia a nivel macroscópico como microscópico. Como características macroscópicas, se observa el anverso y el reverso de la colonia, color, si produce exudado, la textura, la elevación de la colonia sobre la superficie del agar. El color puede ser: negro, grisáceo, olivo, blanco, rojo, marrón, negro entre otros. La textura puede ser: algodonosa, aterciopelada, polvorienta o granulada. La presencia de exudado son gotas que se observan sobre la colonia y pueden ser incoloras o con algún color. Algunos hongos imparten color al medio que lo rodea y es un detalle que se indica para su identificación. Por otra parte, la examinación microscópica se requiere un montaje en laminilla y observación bajo el microscopio. Muchas veces se requiere tinción en el montaje ya que muchos hongos son incoloros y se tiñen para ver sus estructuras. Las características microscópicas buscadas son el tamaño de la hifa y los conidios, forma de la hifa y el conidio, arreglo de los conidios, modificaciones de las hifas, si la hifa es tabicada o cenocítica, color de la hifa y los conidios.

C. Identificación de los hongos en muestras clínicas

1. Tipos de muestras

Las muestras clínicas para hongos deben ser procesadas lo más antes posible para evitar que sobrecrezcan las bacterias asociadas a la muestra y afecte el resultado. La colecta de la muestra depende de que hongo se sospecha que esté afectando al paciente (tabla 1).

Tabla 1. Ejemplo de cómo se colecta algunas muestras para examinar hongos

Tipo de infección	Muestra	Colecta
cutáneos	Piel, uña, pelo, oído	1) Se limpia la superficie con alcohol 70%, se raspa o se extrae muestra (uña, pelo, canal oído) del área afectada y se coloca en envase estéril.
Subcutáneo	Piel y tejido subcutáneo	Biopsia, aspirar, corte para extraer muestra del área afectada.
Sistémica	Espujo, aspiración transtraqueal, biopsia del pulmón, cepillado bronquial	1) el espujo se debe tomar temprano en la mañana por varios días consecutivos y colocarlo en envase estéril. 2) La aspiración, el cepillado y la biopsia es un proceso más invasivo y la muestra se coloca en envase estéril con agua salina.
absceso	fluido	Aspirar fluidos y colocarlo en envase estéril con agua salina.
Tejido invadido	Nódulos linfáticos y órganos	Extraer tejido, realizar observación del mismo, hacer examinación microscópica.
Orina	Colecta en envase estéril	Se procesa lo antes posible para evitar sobre crecimiento de otros microorganismos.
Sistema nervioso central	Colecta en envase estéril	Si es mucha muestra se filtra, si es poca muestra se inocular directamente en el medio.

Tabla tomada de: Clinical and pathogenic microbiology, Howard et. al, 1987.

2. Examen directo

Examinar directamente muestras a través de microscopía puede ayudar a deducir que posible hongo está afectando al paciente. Además, aporta información útil para aislar efectivamente el patógeno. Por ejemplo, el medio de cultivo y la técnica que puede ser usada para extraer muestra clínica del paciente. Para una examinación directa se puede: 1) solución de KOH, 2) tinción Schiff-ácido periódico, 3) tinción ácido resistente y 4) tinción “India ink”. La solución de hidróxido de potasio (KOH) degrada las proteínas asociadas a la muestra y aclara el tejido queratinizado (tejido que se compone de células que contienen tiene queratina que es una proteína) permitiendo mejor visibilidad del hongo en la muestra. La observación del hongo en la muestra usando solución de KOH puede ser afectada por: 1) la porción de la muestra colectada, 2) el tamaño del patógeno y 3) los microorganismos asociados a la muestra. Otra técnica para

observar directamente el hongo en una muestra es la tinción Schiff-ácido periódico (ácido yódico) abreviada como PAS (periodic acid-Schiff). A través de esta técnica se oxida los carbohidratos de la pared celular del hongo con el ácido periódico formando aldehídos que interaccionan con el tinte fuchsin básico para producir un color magenta que no es decolorizado por los otros reactivos de la tinción. Se va observar el hongo color magenta en un fondo verde por el contratinte. La tinción ácido resistente que es usada con bacterias se realiza en la micología para teñir ascoporas de levaduras. La tinción tinta India es usada para observar cápsulas producidas por levaduras es el género *Cryptococcus*. Este tinte no interacciona con la capsula observándose bajo el microscopio como una zona clara en un fondo negro.

3. Cultivos

Los medios de cultivos usados para hongos pueden ser enriquecidos, selectivos o diferenciales como ocurre en la bacteriología. Los medios enriquecidos promueven el crecimiento de los organismos. Por ejemplo del agar de Sabouraud, el agar de extracto de malta y el agar de dextrosa con papa son medios enriquecidos que promueven el crecimiento de casi todo los hongos. Muchas veces se usa antibióticos o ácido láctico para inhibir el crecimiento bacteriano. A veces no se recomienda usar antibióticos ya que hay hongos que pueden ser suprimidos su crecimiento por los mismos. Un ejemplo es la ciclohexamida y el cloramfenicol que inhibe algunas levaduras. También se usa el “Brain Infusion Agar” como medio enriquecido para aislar hongos ya que se ha visto que crece bien algunas levaduras de importancia clínica y promueve el cambio dimórfico de hifa a levadura en algunas de ellas. Por otra parte, el “Bird Seed Agar” es un medio selectivo y diferencial usado para aislar *Cryptococcus neoformans* de muestras clínicas. En este medio, las colonias de la levadura *Cryptococcus neoformans* se observa color marrón ya que lleva a cabo síntesis de melanina usando el sustrato del medio para la producción de la misma. Hay medios que tienen suplementos que ayudan a la producción de estructuras claves en la identificación de los hongos. Como es el “Cornmeal agar” que ayuda a la producción de esporas en la levadura *Candida* y el agar V-8 18% que promueve la producción de conidios en algunos hongos.

La temperatura usada para incubar hongos son a 30°C o temperatura ambiente (22°C-25°C). Siendo la temperatura de 30°C la favorable para muestras clínicas ya que los hongos patógenos crecen mejor y más rápido. Las temperaturas altas y semejantes a temperatura corporal no son recomendables al momento de tratar de aislar el hongo patógeno de la muestra clínica ya que inhibir o evitar que crezca el mismo. Luego se puede usar pruebas de tolerancia a temperaturas con los aislados para corroborar quien es o para promover dimorfismos.

D. Micosis

Micosis es el término para indicar una infección ocasionada por hongo. Las micosis pueden ser causadas por contaminantes ambientales como por oportunistas. Estas pueden ser clasificadas en: micosis superficial, micosis cutánea, micosis subcutánea y micosis sistémica. La **micosis superficial** afecta el tejido queratinizado como es la piel, el pelo y las uñas. Estas pueden ser asintomáticas en algunos casos, no invasivas en donde el hongo utiliza secreciones del sustrato donde está alojado. Ejemplo de micosis superficiales esta: 1) piedra que son nódulos que afectan

el pelo causados por *Trichosporon beigelii* (piedra blanca) o *Piedraia hortae* (piedra negra); 2) pitiriasis versicolor o paño en la piel que es causado por *Malassezia furfur*; 3) tinea nigra que es manchas oscuras en la palma de la mano causadas por *Phaeoannellomyces werneckii*. Se hace examen directo de las muestras del área afectada para el diagnóstico de las mismas. Se usa tratamientos tópicos para las áreas afectadas y en el caso del cabello remoción de los pelos afectados. Las **micosis cutánea** son enfermedades donde se afecta la capa externa de la piel y son contagiosas adquiridas por contacto directo con el hongo. Estas micosis son causadas por especies de los géneros *Epidermophyton*, *Microsporum* y *Trichophyton*. Está la tinea capitis que es infección en el cuero cabelludo, la tinea unguium que es infección en la uña y tinea pedis conocida como pie de atleta. Para las micosis cutáneas se hace biopsia del tejido afectado y cultivar como examen directo. Para su tratamiento se puede usar ungüentos y productos tópicos que se pasan por las áreas afectadas. Las **micosis subcutáneas** son adquiridas por inoculación traumática y se desarrollan debajo de la piel observándose lesiones en el lugar donde ocurre la inoculación. Lesiones por golpes con clavos, espinas, picaduras de insecto pueden inocular hongos que causen esta micosis. Los agentes causantes varían por infección. Ejemplo de micosis subcutáneas esta cromoblastomicosis y faohifomicosis. Los diagnosticos son a través de biopsias del tejido para ser cultivado. Se puede usar anfoterecina B, fungicidas como el ketaconazol y el yoduro de potasio como tratamientos para estas micosis. Las **micosis sistémicas** son causadas por hongos oportunistas como por hongos patógenos. Muchas de estas son asintomáticas y pueden afectar cualquier parte del cuerpo. Ejemplos de éstas son blastomicosis causado por *Blastomyces dermatitidis*, criptococosis causado por *Cryptococcus neoformans* y histoplasmosis causado por *Histoplasma capsulatum*. Su diagnóstico es a través de examinación directa y cultivo de muestra clínica en medios. Tratamiento para estas tres micosis es la anfoterecina B.

E. Práctica

1. Caracterización del desconocido aislado de la exposición de plato

a. Caracterización macroscópica de la colonia:

Color del anverso: _____

Color del reverso: _____

Textura: _____

Presencia de exudado: ___ Si, color _____ ___No

Elevación: _____

b. Caracterización microscópica:

Instrucciones: Se va a montar un poco del hongo en una laminilla que contiene una gota de lactophenol cotton blue. Luego se le coloca un cubreobjeto.

Observar a 40X.

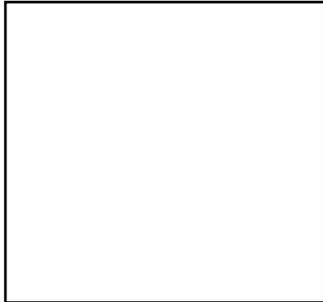
___ hifa tabicada ___ hifa cenocítica

___ hifa dematiacea (con color) ___ hifa hialina (sin color)

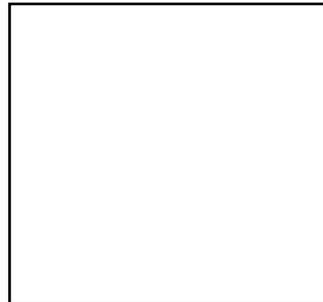
___ Forma de las conidias (dibuje) ___ tiene color las conidias

2. Laminillas permanentes: Dibuje lo que está observando a 40X.

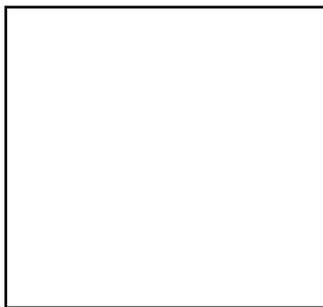
a. *Aspergillus conidiophores*



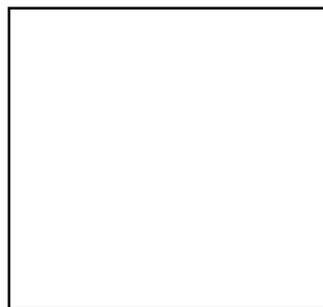
b. *Alternaria* sp.



c. *Rhizopus mycellium sporangia*



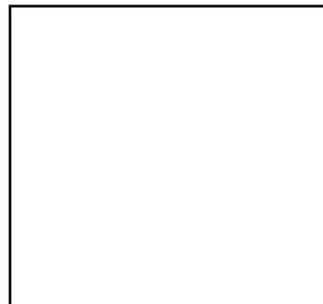
d. *Mucor* sp.



e. Mold types



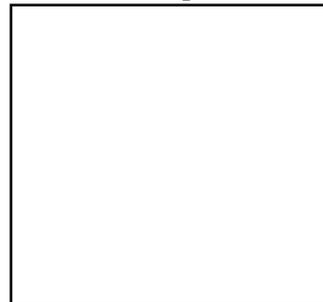
f. *Saccharomyces* sp.



g. *Candida albicans*



h. *Penicillium* sp.



II. Parasitología clínica

A. ¿Qué son los parásitos?

Los parásitos son organismos heterótrofos que requieren conseguir su alimento que es fuente de energía y carbono de moléculas complejas existentes en el ambiente. Se pueden reproducir por fisión múltiple y otros son hermafrodita. Estos organismos viven dependientes de su hospedero y varía el efecto que le puede causar al mismo. Los parásitos que ocasionan una enfermedad a su hospedero se le conocen como patógenos. Hay parásitos que viven en la superficie de sus hospederos como son las garrapatas y las pulgas y se les conoce como **ectoparásitos**. Los **endoparásitos** son los que viven dentro de su hospedero como son los protozoa y gusanos. Los parásitos se pueden clasificar por su dependencia a su hospedero en: 1) obligados y 2) facultativos. Los **parásitos obligados** requieren vivir alguna etapa de su ciclo de vida en el hospedero. Ejemplo de esto es el causante de la malaria que afecta los glóbulos rojos de la sangre. Por otra parte los **parásitos facultativos** son de vida libre en el ambiente no están obligados a depender del hospedero para vivir, pero requieren de ellos para adquirir alimento y le ocasionan una enfermedad. También los parásitos se pueden clasificar en 3) permanentes, 4) temporeros y 5) accidental por el tiempo en que se asocian a su hospedero. Los **parásitos permanentes** son los que invaden al hospedero y se quedan en él. En cambio, los **parásitos temporeros** utilizan al hospedero y luego se van. Cuando se clasifica como **parasito accidental** es porque afecta a un organismo que no es su hospedero usual. Los hospederos que son usados como agentes de transmisión del parasito se conocen como **vectores**. Hay vectores que son usados por el parasito para llevar a cabo parte de su ciclo de vida conocidos como **vectores biológicos**. Además, existen **vectores mecánicos** que son organismos que no son usados por el parasito en alguna etapa de su ciclo de vida. Por ejemplo, las moscas son vectores mecánicos de parásitos que se traen en sus patas cuando se reposan en las heces fecales contaminadas.

B. Técnicas de aislamiento e identificación

La examinación directa bajo el microscopio de la muestra, realizar cultivos y pruebas serológicas son técnicas importantes en la detección e identificación de parásitos. Como se colecta y se procesa la muestra depende la muestra. Están las muestras de parásitos del tracto gastrointestinal, genitourinario y pulmonar como las muestras de parásitos de tejido y sangre.

1. Tracto gastrointestinal, genitourinario y pulmonar

Cuando son muestras del tracto gastrointestinal, genitourinario y pulmonar se hace examinación directa a las secreciones y fluidos de las zonas como son la heces, esputo y orina.

a. Heces fecales

Para colectar heces fecales del paciente con un cuadro clínico de posible infección por parasito, no se debe suministrar agentes antimicrobiales, anti diarreas, aceite mineral, laxante entre otros medicamentos días antes de la colecta de la muestra. Estas sustancias pueden interferir con la detección del parasito y a su vez con el diagnostico. La muestra de heces debe ser colectada de modo que no se contamine con ninguna sustancia como es la orina. La colecta debe ser en un envase limpio sin algún remanente de sustancia y se recomienda que sea

examinada entre los 30 min a 1 hora de tomada. Si la examinación no va hacer rápido, se puede; 1) colocar en la nevera por 2-3 días, 2) añadirle preservativos que sean compatibles con las técnicas que se vayan a usar para la identificación del organismo. A veces se debe tomar muestras de heces por varios días ya que permite detectar la infección. Se puede hacer montaje húmedo de la muestra, concentración de la muestra o montaje permanente teñido para poder examinar la muestra. El montaje húmedo se usa agua salina con la muestra fresca y permite el observar motilidad de algunos parásitos. El método de concentrar la muestra ayuda aumentar la detección del patógeno y observar estado del ciclo de vida del mismo. Se usa cloruro de sodio, azúcar y sulfato de zinc cuando se usa el método de mantener flotando los parásitos en el sobrenadante después de la centrifugación. Para el método de sedimentación se usa formalin-eter y acetato de etilo para ocasionar que los parásitos se precipiten y debrís de la muestra queden en el sobrenadante. La tinción de “trichrome” y la tinción “iron-hematoxylin” son ejemplos de montaje permanente teñido usados para ver parásitos en muestras. También se hace “swab” de la parte anal cuando se cree que hay infección por parásitos que no liberan sus huevos en el intestino sino que emigran a depositar los huevos en la piel del ano. De esta muestra se hace montaje directo para observar los huevos.

b. Orina

Para muestras de orina, se usa la primero descarga para ver si hay afección por *Trichomonas vaginalis*. Esta muestra se centrifuga y el precipitado formado es observado por montaje directo bajo el microscopio. También se puede encontrar *Schistosoma hematobium* ya que afecta las venas asociadas a la vejiga.

c. Esputo

En la muestra de esputo se busca huevos o estados larva de algunos parásitos como *Ascaris*, *Entamoeba histolytica*. Se realiza montaje húmedo de la muestra y en algunos casos centrifugación.

d. Aspirados y biopsias

En casos que la muestra obtenida no provee para llegar a un diagnóstico, entonces se realiza aspirados y biopsias. Estas técnicas ayudan a tomar muestras directamente de los órganos y de los tejidos afectados. Por ejemplo, extraer mucosa del intestino, aspirar muestra de un absceso, tomar una porción del tejido muscular.

2. Tejido y sangre

a. Sangre

La sangre puede ser usada para examinación directa bajo el microscopio pero en algunos casos que es observar el parásito se usa la muestra para pruebas serológicas. La sangre debe ser colecta en envases sin anticoagulante o con poco para que se pueda usar en examinación directa. La examinación puede ser por montaje húmedo o montaje permanente.

b. Cultivo

Para algunos parásitos es efectivo cultivar en medios especiales que no utilizan todos los laboratorios. El medio base para de agar de sangre es usado para confeccionar medios que son usados para cultivar hemoflagelados pero se incuban a temperatura ambiente y no temperatura corporal. También hay amebas que afectan el sistema nerviosos central que son cultivables.

C. Ejemplo de parásitos patógenos

1. *Trypanosoma* sp.

Esta *Trypanosoma brucei brucei*, *T. brucei gambiense* y *T. brucei rhodesiense*. El *T. b. brucei* es parásito de antílopes y otros rumiantes en África. Puede causar enfermedad a otros mamíferos pero a humanos no. *T. b. gambiense* y *T. b. rhodesiense* son causantes del “African sleeping sickness”. Siendo *T.b. gambiense* el que causa la forma crónica de la enfermedad y *T.b. rhodesiense* causante la forma aguda. Su vector es la mosca Tse-Tse del género *Glossina*. Se aloja en el hígado, vesícula, sangre, nódulos linfáticos y fluido cerebroespinal de sus hospederos vertebrados. Puede causar fiebres intermitentes, dolor generalizado, dolor de cabeza, debilidad y calambre hasta llegar a convulsiones, problemas de coordinación, parálisis. Se le conoce como la enfermedad del sueño porque ocasiona que el hospedero se duerma aunque este realizando alguna actividad llegando a la coma y muerte.

Otra enfermedad causada por un parasito de este género es la enfermedad de Chaga. El parásito *T. cruzi* es transmitido por invertebrado que al picar también defeca dejando parasito que puede entrar por la herida de la picada. También tiene hospederos alternos que son reservorios como son perros, gatos, armadillos, ratas. Estos hospederos se infectan ya sea por picadas o porque consumen el insecto infectado. Afecta la vesícula, hígado, células cardiacas y linfáticas, músculos esquelético como liso. Puede afectar la piel, sistema nervioso, mucosa intestinal y medula ósea.

2. *Giardia lamblia*

Este parasito es flagelado de la familia Hexamitidae y fue descubierto por Antony van Leeuwenhoek en el 1681. Tiene una distribución cosmopolita pero tiende a ocurre en zonas con clima caliente. *Giardia lamblia* tiene dos núcleos iguales alineados uno al lado del otro. Tiene 8 flagelos distribuidos en diferentes partes del cuerpo y puede medir de 12-15µm. Tiende a vivir en el sistema digestivo del humano adherido a las células epiteliales. Se ha observado que algunas personas son más susceptibles que otras al parasito. *G. lamblia* ocasiona un aumento de la producción de mucosa en los intestinos, diarrea y pérdida de peso. Promueve que el hospedero produzca heces fecales grasosas ya que al estar adherido al epitelio del intestino no permite la absorción de nutrientes y grasas. También puede afectar la vesícula. Para su diagnostico se busca quiste (parte de su ciclo de vida) en las heces fecales a través de examinación directa por montaje teñido. En algunos casos hay que hacer aspiración en el duodeno para buscar trofozoitos que son otra etapa de su ciclo de vida. La giardiasis es muy contagiosa y se debe ser precavido en la desinfección para evitar el contagio en las familias con pacientes infectados. Gatos, perros, venados y ovejas pueden ser reservorios.

3. *Trichomonas vaginalis*

Ocasiona secreciones por el tracto urogenital dl hombre y secreciones vaginales ya que se pueden encontrar en el tracto reproductivo de ambos. Puede vivir en la vagina y uretra de la mujer como en la próstata, vesícula seminal y uretra del hombre. Se clasifica como parasito cosmopolita por su distribución amplia. Es un parasito que se transmite sexualmente como por ropa contaminada con el parasito. En algunas personas puede ser una infección asintomática, pero hay casos en que la inflamación es intensa con picor y mucha secreción. La secreción vaginal puede llegar hacer abundantes de color blancuzca a verdosa acompañada con una inflamación severa. Usualmente es asintomática en hombre ocasionando irritación de la uretra y la próstata. Su diagnóstico es a través de examinación directa de secreciones y en casos que hay poco se hace cultivo.

4. *Entamoeba hystolitica*

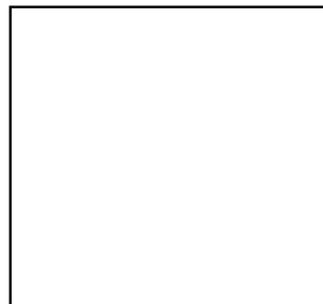
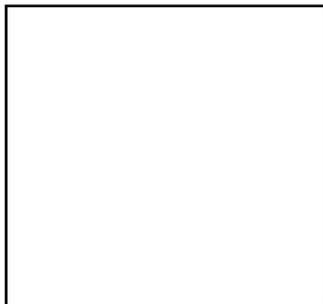
Las personas se contagian al ingerir agua y comida contaminada con quiste de la ameba. Los quiste pueden durar día en ambientes con una temperatura fresca y en el agua más todavía. Cuando se ingiere el quiste pasa bien por el estómago sin ser afectado y eclosiona cuando llega al intestino delgado por el ambiente favorable alcalino. Se aloja en la mucosa del intestino grueso y ocasiona ulceras y lesiones intestinales porque dañan la mucosa. En ocasiones puede infiltrarse y llegar al torrente sanguíneo u fluido linfático llegando a otras partes del cuerpo y siendo ectópico. Hay casos que ocasiona obstrucción del intestino por masas granulomatosas conocido como ameboma. Puede afectar el hígado ocasionando amebiasis hepática, al pulmón conocida como amebiasis pulmonar. Otros sitios ectópicos son el cerebro, la piel, el pene, riñones, pericardio entre otros. Ocasiona disentería, dolor de cabeza, fiebre, dolor abdominal. Las diarreas pueden ser liquidas con mucosa y sangre. Para su diagnóstico se buscar fase de su ciclo de vida (quistes y trpzoitos) en la examinación directa de las heces fecales.

III. Práctica

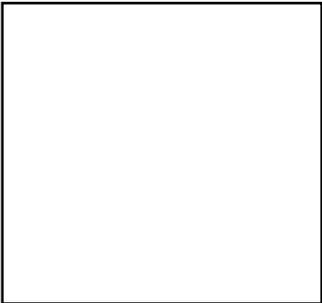
Laminillas permanentes: Dibuje lo que está observando.

1. _____

2. _____



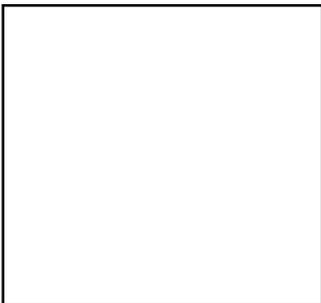
3. _____



4. _____



5. _____



6. _____



7. _____



8. _____



Referencia:

Black, J.G. (2012). Eukaryotic microorganisms and parasites. In: *Microbiology: Principles and explorations* (8^{va} ed., pp. 308-337). E.U.: John Wiley & Sons.

Klaas II, J. (1987). Laboratory methods in medical parasitology. In: *Clinical and pathogenic microbiology* (pp. 635-656). St. Louis, Missouri: The C.V. Mosby Company.

Lozada, Chad, Ortiz, B & Betancourt C. (1998). *Introducción a la micología médica*. Mayagüez, P.R.: Imprenta Universitaria.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Stahl, D.A. & Clark, D.P. (2012). Eukaryotic cell biology and eukaryotic microorganisms. In: *Brock biology of microorganisms* (13^{era} ed., pp. 585-612). San Francisco, CA: Benjamin Cummings.

Roberts, L.S & Janovy, J. (2000). *Foundations of parasitology* (6^{ta} ed.). E.U.: McGraw-Hill Higher Education.

Tilton, R.C. & McGinnis, M.R. (1987). General approaches to the isolation and identification of clinically significant fungi. In: *Clinical and pathogenic microbiology* (pp. 535-552). St. Louis, Missouri: The C.V. Mosby Company.