

Jorge Luis Parodi Rivera

Creación de un portal WEB para el
Autoaprendizaje en el diagnóstico de
Laboratorio de Dermatomicosis



Tesis presentada a la Universidad de la Frontera Facultad de
Medicina para obtener el grado de Licenciado en Ciencias de la
Salud, Con mención en Microbiología

Temuco
2000

Jorge Luis Parodi Rivera

Agradecimientos

Creación de un portal WEB para el
Autoaprendizaje en el diagnóstico de
Laboratorio de Dermatomicosis

A mi tutor, Dr. Carlos Parodi, por su apoyo en la creación de este portal.

A la Unidad de Anatómico, por la inspiración en la creación.

A mi familia, por su apoyo.

Tesis presentada a la Universidad de la Frontera Facultad de Medicina para obtener el grado de Licenciado en Ciencias de la Salud, Con mención en Microbiología

GRACIAS

Temuco
2000

Agradecimientos

INDICE:

A mi tutor, la Doctora Gloria Rodríguez, que me guío y me apoyó en la creación de este portal.

A la Unidad de Anatomía Patológica y Citodiagnóstico, por la inspiración en la creación de este portal.

A mi familia, por su apoyo ahora y siempre.

GRACIAS

Creación de un portal WEB para el Autoaprendizaje en el

Diagnóstico de Laboratorio de Germatológicos

INDICE:

Introducción01

Objetivos.....03

Material y Método.....04

Discusión05

Bibliografía.....07

Anexo Portal WEB.....09

Creación de un portal WEB para el Autoaprendizaje en el Diagnóstico de Laboratorio de Dermatomicosis

La falta de conocimiento y el subdiagnóstico de problemas de salud derivados de infecciones micóticas, así como la arraigada creencia de que el laboratorio de micología es una unidad de alta complejidad, permite que sean las micosis un problema casi desconocido en nuestro medio, lo que lleva a que no se sepa su verdadera realidad ni se pueda tomar medidas a fin de que deje de ser un problema de salud. Experiencias en países desarrollados han llevado a disminuir este tipo de patología, gracias a la pesquisa epidemiológica que se realiza por la presencia de laboratorios capaces de hacer pequeños pero significativos aportes al diagnóstico de micosis. Cabe señalar que el conocimiento de patologías inmunosupresoras, así como la administración de medicamentos que provocan una disminución en las defensas del ser humano han permitido observar un renacer de infecciones oportunistas, donde los hongos tienen un destacado rol patógeno.

Es así, que estas situaciones brevemente expuestas, motivan la creación de un material educativo, interactivo y dinámico que permita a los tecnólogos médicos del área de la microbiología, montar, controlar y ejecutar técnicas de laboratorio conducentes a diagnósticos tentativos de agentes causales de micosis, en forma particular, de dermatomicosis.

Objetivos Específicos

1. Realizar técnicas básicas para el diagnóstico de hongos filamentosos, agentes causales de dermatomicosis.
2. Armar una imágenes de fácil acceso, de elementos diagnósticos de agentes de dermatomicosis.
3. Elaborar un disco compacto, que facilite el aprendizaje de técnicas diagnósticas aplicadas en micología médica.

Objetivo General

- Desarrollar un material educativo interactivo para el autoaprendizaje de técnicas básicas del diagnóstico micológico, en particular las dermatomicosis.

Objetivos Específicos

1. Realizar técnicas básicas para el diagnóstico de hongos filamentosos, agentes causales de dermatomicosis.
2. Almacenar imágenes de fácil acceso, de elementos diagnósticos de agentes de dermatomicosis
3. Elaborar un disco compacto, que facilite el aprendizaje de técnicas diagnósticas aplicadas en micología médica.

Material y Método

Para la creación del portal Web, se usó el software Word 2000, de Office 2000 (MR) de Microsoft y se direccionaron con el software FrontPage 2000, también de Office 2000 (MR) de Microsoft.

La captura de imágenes microscópicas se hizo con un microscopio Olympus y una cámara de video Cannon, se usó un computador Pentium Intel de 300mhz con una tarjeta de captura de video TCVD y su correspondiente software. El trabajo y retoque de las imágenes se logró con el software PhotoPlus 4.0 de Acer (MR) y todos se trabajaron en el formato JPG ; el mismo software se usó para las imágenes obtenidas del scanner Flathead de Acer (MR) así como de la cámara digital Cannon utilizada para las fotos digitales.

Para el montaje de las técnicas de laboratorio: cultivos, preparación de directos y tinción con Azul de Lactofenol, se obtuvieron muestras clínicas de pacientes con sospecha clínica de Dermatomicosis derivados por Dermatólogo. Se siguieron los procedimientos y preparación de reactivos descritos en el portal y que son presentados dentro del anexo (el anexo no incluye imágenes del portal WEB).

Discusión

Cuando se planteó la idea de crear un módulo de autoaprendizaje para micología se propuso elaborar un recurso con elementos interactivos, una herramienta de fácil manejo y actualizable que le diera dinamismo al autoaprendizaje.

La creación de este portal no es más que una base sencilla de donde se puede ver lo fácil y entretenido que se hace buscar y correlacionar información y que puede ser periódicamente actualizada. Es importante destacar que este recurso ya ha sido utilizado por otras unidades académicas universitarias como Anatomía Patológica, de la Facultad de Medicina de la Universidad de la Frontera, el cual es posible visitar en el dominio Web de esta Universidad y es permanentemente actualizado por esta unidad.

El portal creado presenta la novedad del tema elegido, el cual espero, logre más difusión con este recurso. Este portal está dirigido tanto para alumnos de las Carreras de Salud con interés en el Diagnóstico Micológico, como profesionales que tienen este mismo deseo. Este portal podría incentivar una nueva forma de interacción entre la Universidad y los alumnos de pre-grado o de cursos de perfeccionamiento de post-título.

Bibliografía

Finalmente es destacable, lo fácil de replicar este portal, con otros temas y que sólo el tiempo que se utilice en la creación de este tipo de material, será el límite para adicionar imágenes, sonidos, videos y cualquier recurso multimedia que se quiera explotar.

El desarrollo de este tipo de recursos instruccionales, permitirá contribuir a la introducción de metodologías innovadoras, en el marco de la Innovación Curricular planteada por todas las Carreras de la Facultad de Medicina de la Universidad de La Frontera y que se plantea como continuación de la Reforma Educacional, en implementación en Chile.

Bibliografía

1. Apt, Patricia et al. **Onicomycosis: técnicas diagnósticas**. Revista Chilena de Dermatología. Santiago, 1999, 2(32) :100-110.
2. Arenas, Roberto. **Micosis superficiales**. En MICOLOGIA MEDICA ILUSTRADA. Interamericana Mcgraw-Hill. México, 1993, p. 55-97
3. Fich, Félix et al. **Eficacia de la terbinafina en solución al 1% (Lamisil m.r.) en el tratamiento de la Tinea pedis interdigital**. Revista Chilena de Dermatología, Santiago. 1999, 2(15) : 94-99.
4. Hernández, Sandra et al. **Efecto del tratamiento con fluconazol oral sobre el crecimiento ungueal en pacientes con onicomycosis**. Revista Chilena de Dermatología. Santiago, 1998, 2(14) : 80-85.
5. Iglesias, Trinidad, Loyola, Aurora. En GUIA LABORATORIO MICROBIOLOGIA II. **Diagnóstico de laboratorio de infecciones micóticas**, Universidad de la Frontera Temuco, 1996.
6. KONEMAN, Elmer, ROBERTS, Glenn. **Micología práctica de laboratorio**. 3ª Ed. Panamericana 1987, p. 221.

7. RIPPON, John. En: TRATADO DE MICOLOGIA MEDICA.
Dermatofitos y Dermatomicosis. Interamericana Mcgraw-Hill.
Chicago, 1990, p.186-299
8. RIPPON, John. En: TRATADO DE MICOLOGIA MEDICA.
Infecciones superficiales, infecciones cutáneas. Interamericana
Mcgraw-Hill. Chicago, 1990, p.169-186

Glosario Técnico

Técnicas básicas para

Diagnóstico

Archivo de imágenes

Bienvenidos al Micro mundo de la Micología Médica!!!!

Glosario Técnico

Técnicas básicas para

Diagnóstico

Archivo de imágenes

Palabras difíciles de comprender

Busca los términos que no conoces, así te será más fácil comprender los procedimientos y las estructuras a observar.

Micología:

Ciencia que se dedica a conocer todo lo referente a hongos.

KOH:

Hidróxido de potasio, sustancia alcalina de amplio uso en laboratorios de microbiología.

Azul de Lactofenol:

Solución que permite teñir y observar muestras de cultivos para observaciones microscópicas.

Agar Sabouraud:

Medio de cultivo de uso en microbiología. Está formulado para permitir el desarrollo de los hongos. Sus características de pH y componentes le permiten ser selectivo.

Micelio:

Conjunto de hifas, este puede ser aéreo, cuando se expone al ambiente y desarrolla los órganos reproductores o vegetativo cuando está inserto en el huésped o medio que lo sustenta.

Dermatofitos:

Grupo de hongos que son afines con la queratina, pueden ser saprófitos o patógenos, pero conservan su afinidad por esta proteína.

Conidios:

Término genérico que se le da a las esporas asexuadas, específicamente a las que se hallan unidas a las hifas.

Macroconidios:

Tipo de conidia multicelular de gran tamaño que puede tener diferentes formas.

Microconidios:

Tipo de conidia pequeña (8-10um) unicelular que se observa unida a las hifas.

Hifas:

Unidad estructural y fundamental de un hongo es una estructura filiforme de longitud variable, que tiene una pared rígida, por ella fluye el protoplasma. Puede presentar separaciones que se denominan septos.

Dermatomicosis:

Infección de la piel por hongos.

Micosis:

Infección por hongos, que pueden ser, superficiales, subcutáneas o sistémicas.

Endothrix:

Infección del pelo, con la característica que el hongo penetra al cabello con órganos perforadores.

Exothrix:

Infección del pelo, pero que no invade el interior del mismo.

Introducción a Técnicas

- # Toma de Muestra
- # Examen Directo Con KOH
- # Directo con Azul de Lactofenol
- # Cultivo en Agar Sabouraud
- # Otros Medios de Cultivo
- # Micro Cultivo
- # Cultivo de Pelo
- # Auxonograma
- # Utilización de Vitaminas
- # Lámpara de WOOD
- # Tinciones Especiales
- # Test del tubo Germinativo

Toma De Muestra

Es importante realizar antisepsia de la zona con alcohol antes de tomar muestra de las lesiones, esto evita contaminantes que dificultarán la observación microscópica. (no usar soluciones que contengan Yodo, ya que es un antimicótico) En muestras dirigidas a cultivos se suspenderá cualquier tratamiento antimicótico por 30 días antes de tomar la muestra.

Condiciones Generales

- # Debe ser de una cantidad suficientes para preparar varias láminas
- # La extracción varía según el sitio de la lesión
- # Requiere de material adecuado
- # Se debe recibir en placas estériles
- # Además de muestra de la lesión, se debe obtener fundamentalmente muestra de los bordes, para visualizar la actividad del Hongo.

Piel

En el caso de lesiones secas bastará con raspar la piel para obtener escamas, esto se puede realizar con la ayuda de una lanceta o bisturí.

Se recogen las escamas en una placa de petri estéril o dos portaobjetos flameados.

Las lesiones húmedas en la piel se deben tomar con una tórula estéril humedecida con Suero Fisiológico estéril, se debe realizar inmediatamente el extendido y la siembra.

Algunas lesiones pueden tomarse con cinta adhesiva, tocando las zonas de lesiones y bordes, luego se extiende en un portaobjeto y se observa

Pelos

Los cabellos deben de ser observados desde la raíz, para lograr esto se deben arrancar con pinzas estériles y se dejan en una placa petri estéril o entre dos portaobjetos flameados.

* Uñas

Se toman muestra (muy finas de uñas con la ayuda de un bisturí o tijeras, se debe tomar en donde predomine la lesión y sus bordes) por debajo de la uña para obtener material blando del lecho ungueal. Si esto no es posible se raspa la superficie de la uña para recolectar raspados de las porciones más profundas. Depositar en placa de petri estéril o entre dos portaobjetos flameados.

* Líquidos

Usar técnica estéril para su punción, se siembra a lo menos 0.5 ml de muestra en sabouraud o caldo glucosado al 1%, o caldo Sabouraud. En caso de sangre esta debe ser citratada o heparinizada y sembrar a lo menos unos 10 a 20 ml de muestra de sangre.

Líquidos como la orina y el LCR se pueden centrifugar y obtener sedimentos para preparar directos y cultivos.

* Expectoraciones

Se debe obtener una muestra de esputo idealmente un lavado bronco alveolar. Se debe realizar antisepsia de la cavidad oral para evitar contaminantes, se siembra y se pueden realizar extendidos para observación directa.

* Muestras de Tejidos

En las muestras de tejidos deben tomar todas las precauciones de una toma de muestra para biopsia, se conserva el tejido en formalina tamponada al 10% en buffer fosfato.

Otras formas especiales de toma de muestra

Examen Directo con KOH

Preparación del KOH

30gr de KOH y disolverlo en 100ml de agua destilada.

* Se deposita el material obtenido en un portaobjeto y se le agregan unas gotas de solución de KOH, cuidando de cubrir toda la muestra.

* Se cubre con un cubreobjeto adecuado según tamaño de la muestra y se observa al microscopio.

* Se calienta levemente y con cuidado hasta lograr que se transparente. (La muestra, es recomendable ir mirando al microscopio para ver cuando se logra la transparencia suficiente de la muestra) Además se puede disgregar la muestra Comprimiendo el cubreobjeto sobre el portaobjeto para hacer una correcta observación microscópica.

* Imagen de preparados

* Observaciones microscópicas

Si se trabaja con pelos se puede usar una solución más dirigida para esta muestra, se puede usar Clorolactofenol el cual tiene la siguiente preparación

* 2gr de Hidrato Cloral

* 1gr de Ácido fénico

* 1gr de Ácido láctico

* 100ml de agua destilada

Directo con Azul de Lactofenol

Preparación del Lactofenol

- # 20gr de Ácido láctico
- # 20gr de Fenol
- # 20gr de Glicerina
- # 0,05gr de azul de metileno
- # 20ml de agua destilada

Se deposita el material obtenido en un portaobjeto y se le agregan unas gotas de Azul de Lactofenol, cuidando de cubrir toda la muestra.

Se cubre con un cubreobjeto adecuado según tamaño de la muestra y se observa al microscopio.

Se disgrega suavemente y con cuidado hasta lograr que se extienda la muestra, para hacer una correcta observación microscópica.

Imagen de preparados

Observaciones microscópicas

En directos de Cultivos se obtiene muestra del Micelio y se disgrega con el Lactofenol

Cultivo en Agar Sabouraud

Son siempre indispensables para llegar al diagnóstico de un agente patógeno, el cultivo en agar saboraud es el mas rutinario y presenta fácil modificaciones para aumentar su rendimiento.

Formulas y modificaciones del medio

- * Técnica de siembra por aislamiento, la muestra se debe sembrar en forma inmediata
- * Usar placas o tubos, idealmente usar tubos de boca ancha, son más convenientes que las placas
- * Usar a lo menos unos 5 a 7 fragmentos
- * Por cada punto de donde se obtuvo muestra deberá hacerse una siembra en diferentes medios de cultivos
- * Incubar a 22-27 grados y a 35-37 grados
- * Se debe observar:
 1. Desarrollo de levaduras a partir del segundo día y no descartar hasta una semana.
 2. Desarrollo de dermatofitos, observar al octavo día y no descartar antes de 21 días, todos los dermatofitos crecen en este medio de cultivo y algunos requieren tiempos más largos.

Los contaminantes crecen más rápido y generalmente se observan a la primera semana.

Medio de los Medios Especiales

Medio Lodber Modificado

- * 0.5 gr de sulfato de magnesio
- * 20 gr de gelosa lavada
- * 2 gr de sulfato de amonio
- * 1.5 gr de fosfato mono potásico
- * 0.25 gr de sulfato de magnesio
- * 10^8 ugr de biotina
- * 10^6 ugr de tiamina
- * 10^6 ugr de piridoxina
- * 10^6 ugr de ácido nicotínico
- * 10^6 ugr de panteonato de calcio
- * 10^5 ugr de inositol
- * 10 gotas de Sol. De Berthelot
- * 1000 ml de agua bidestilada

* 20 gr de glucosa tratada con carbón activado

* 1 gr de asparagina sintética

* 20 gr de gelosa lavada

* 10 gotas de Sol. de Berthelot

* 1.5 gr de fosfato mono potásico

* 0.25 gr de sulfato de magnesio

* 1000 ml de agua destilada

Medio de Lodber y bastide

- # 1 gr de fosfato dipotásico
- # 0.5 gr de sulfato de magnesio
- # 5 gr de sulfato de amonio
- # 20 gr de agar-agar
- # 1000 ml de agua destilada

Modificación del Medio Lodber y Bastide para asimilación de nitrógeno.

Al medio original se le reemplaza el sulfato de amonio por 20 gr de glucosa pura.

Medio base para estudio de necesidades vitamínicas

- # 20 gr de glucosa tratada con carbón activado
- # 1 gr de asparragina sintética
- # 20 gr de gelosa lavada
- # 10 gotas de Sol. de Berthelot
- # 1.5 gr de fosfato mono potásico
- # 0.25 gr de sulfato de magnesio
- # 1000 ml de agua destilada

Al medio base se le añaden separadamente las vitaminas, estas están en una solución estéril. Se deben agregar entre 20 a 100 ml de estas soluciones a cada medio base. Las vitaminas a agregar son las siguientes:

Biotina; tiamina; ácido nicotínico; inositol; piridoxina; pantenato de calcio

Ver concentraciones en el medio de Lodber modificado.

Microcultivo

El montaje debe realizarse en condiciones de esterilidad

* Preparar en una placa petri estéril una herradura de vidrio, o dos baguetas del mismo grosor, fijadas a la placa de petri

* Sobre estas baguetas o herradura se coloca un portaobjeto estéril con un trozo de agar

* En el trozo de agar se siembra el hongo por las orillas del agar

* Se cubre con un cubreobjeto estéril

* Humedecer el fondo de la placa y permitir que ésta permanezca húmeda

Microcultivos

Algunas estructuras que permiten identificar a los hongos son muy débiles y al ser tomadas o tocadas se pueden romper o deteriorar, con lo cual se pierde la oportunidad de llevar a cabo un diagnóstico de laboratorio del agente causal de la patología, a fin de salvar este problema y hacer una correcta observación de estas estructuras se puede montar un Micro cultivo

Microcultivo

El montaje debe realizarse en condiciones de esterilidad

- * Preparar en una placa petri estéril una herradura de vidrio, o dos baguetas del mismo grosor fijadas a la placa de petri

- * Sobre estas baguetas o herradura se coloca un portaobjeto estéril con un trozo de agar

- * En el trozo de agar se siembra el hongo por las orillas del agar

- * Se cubre con un cubreobjeto estéril

- * Humedecer el fondo de la placa y permitir que ésta permanezca húmeda

* Incubar según las características previas que presentó la colonia, al menos 3 a 7 días con observaciones diarias al microscopio

* Retirar el cubreobjeto y montarlo sobre un portaobjeto con azul de Lactofenol.

* Observar microscopio

Para levaduras usar Corn Meal Agar y sembrar en la superficie.

Para otro tipo de hongos usar Sabouraud y sembrar por picadura.

* Agregar 0.1 gr de extracto de levadura

* Deposite pequeños fragmentos de tela de largo de pelo a fin de tener una mejor observación.

* Se siembra el hongo en estado en Agar Sabouraud.

* Se incuban y periódicamente se estudian los pelos en el cultivo al microscopio.

* Se recomienda usar Azul de Lactofenol a fin de ver los órganos perforadores típicos de los hongos endothrix.

Cultivo de Pelo

La diferenciación de que si un hongo es capaz de atacar desde el interior del pelo, o si solo ataca el exterior del mismo es posible observarla a través de un cultivo de pelo. Con esto, se puede lograr algunas diferencias que sumadas a un examen directo, se ve la parasitación del hongo y permite acercarse mas a su identificación.

* En una placa de petri estéril coloque 25ml de agua estéril.

* Agregar 0.1 gr de extracto de levadura.

* Deposite pequeños fragmentos de 1cm de largo de pelo, a fin de tener una mejor observación.

* Se siembra el hongo en estudio en Agar Sabouraud.

* Se incuba y periódicamente se estudian los pelos en el cultivo, al microscopio.

* Se recomienda usar Azul de Lactofenol a fin de ver los órganos perforadores típicos de los hongos endothrix.

En el caso de **Auxonograma** de nitrógeno se usa una modificación del medio de lobber y bas.

Es una técnica que permite observar como los hongos asimilan o utilizan los compuestos carbonados o nitrogenados. Se utiliza en levaduras y concluyen el diagnóstico de la especie. La técnica es una variación de la ideada por Beijerinck.

Se utilizan placas de petri con medios sin carbono cuando se estudia la asimilación de hidratos de carbonos y medios sin nitrógeno cuando se estudia la asimilación de éste.

Medio de lobber, para estudios de azúcares o medio de lodder y bastide

* Se siembra en toda la placa una suspensión de las colonias a estudiar. (Recuérdese el antibiograma)

* Luego se colocan pequeños disco de papel impregnados con los distintos azúcares a probar.

* Se incuban y se lee el desarrollo alrededor de los discos.

En el caso de la asimilación de nitrógeno se usa una modificación del medio de Lodder y Bastide.

* Se usan disco con sulfato de amonio y nitrato de potasio.

* Se incuban y se lee el desarrollo alrededor de los discos.

* A un medio base se le agregan las diferentes vitaminas a probar, cada vitamina en un medio base distinto.

* Se toman fragmentos de colonias o se prepara una suspensión de las mismas.

* Se siembra en los diferentes medios con las diferentes vitaminas.

* Se incuban los medios a 25°C, durante el tiempo necesario para el desarrollo del hongo en estudio. La ausencia de desarrollo permite concluir que falta una vitamina indispensable para el desarrollo del hongo.

Utilización Vitaminas

Estudio que permite reconocer las necesidades de ciertas vitaminas en el hongo, lo cual hace posible llegar a una identificación, dependiendo de cómo se comporte, frente a una batería de vitaminas, el desarrollo del hongo.

* A un medio base se le agregan las diferentes vitaminas a probar, cada vitamina en un medio base distinto.

* Se toman fragmentos de colonias o se prepara una suspensión de las mismas

* Se siembra en los diferentes medios con las diferentes vitaminas.

* Se incuban los medios a 25°C, durante el tiempo necesario para el desarrollo del hongo en estudio. La ausencia de desarrollo permite concluir que falta una vitamina indispensable para el desarrollo del hongo.

Lámpara de WOOD

Este es un estudio que se puede practicar antes del estudio micológico, se requiere de un equipo especial, pero no llega a sustituir al estudio micológico. Es útil en algunas micosis superficiales.

En un cuarto oscuro se usa una lámpara de luz ultravioleta que emita radiaciones a 366 nm, lo cual provoca una fluorescencia en ciertas especies de hongos que permite su reconocimiento.

Imagen, espalda de un paciente con Pitiriasis versicolor, diagnóstico rápido gracias a la imagen con la lámpara de Wood

(Micología Médica Ilustrada, Roberto Arenas. Editorial Intera-mericana - McGraw-Hill)

** Lavar* Tinciones Especiales

La tinción de Gram es por excelencia la tinción mas usada en microbiología y en micología no es la excepción, pero también existen otros procedimientos de tinción, que si bien son de difícil preparación y de montar, es recomendable que se les conozca.

Tinción de Gram

Reactivos

- # Cristal Violeta
- # Solución de Lugol
- # Alcohol acetona
- # Fucsina

Técnica de tinción

Extender la muestra en el portaobjeto, secar y fijar la muestra al calor suave.

Colorear con Cristal Violeta por un minuto.

Lavar al chorro de agua.

Cubrir con solución de lugol, por un minuto.

Lavar al Chorro de agua.

Decolorar con alcohol acetona, unos segundos.

- # Lavar al chorro de agua.
- # Contrastar con fucsina fenicada por unos 10 segundos.
- # Lavar al chorro de agua.
- # Secar y observar con inmersión.

Tinción de Gram, método Maccallum-goodpasteur

Tinción de biopsias y muestras que no provengan de colonias.

Reactivos

Goodpasteur:

- # 0.59gr de Fucsina Básica
- # 1ml de Anilina
- # 1ml de Fenol
- # 98ml de alcohol al 30%

Ácido Picrico al 1.2% en alcohol de 95%

Violeta Genciana al 5%:

- # 5gr de Violeta Genciana
- # 10ml de alcohol absoluto
- # 2ml de Anilina
- # 8ml de agua destilada

Lavar en agua corriente.

Descolorar con Anilina-Nalol hasta un tono lavanda.

Deshidratar y montar la muestra.

Gram:

- # 1gr de Yodo
- # 2gr de yoduro de potasio
- # 300ml de agua destilada
- # Nota. Disuelva el yoduro en agua a 37°C, luego agrega el yodo

Anilina-Xilol:

- # 50ml de Anilina
- # 50ml de Xilol
- # Formalina al 38%

Procedimiento

- # Dejar en agua corriente por 5min
- # Cubrir con sol de Goodpasteur por 5min.
- # Lavar con agua corriente.
- # Diferenciar con formalina, hasta un color rosado claro.
- # Contrastar con ácido pícrico por 5min.
- # Lavar con alcohol de 95% por 5min.
- # Cubrir con Violeta genciana por 3min.
- # Lavar en agua corriente.
- # Descolorar con Anilina-Xilol hasta un tono lavanda.
- # Deshidratar y montar la muestra.

Tinción Gocott's

Permite hacer una excelente observación de muestras de hongos, ya que las tiñe de un fuerte color negro contraste más bien débil, es caro en sus reactivos y engorrosa en su procedimiento pero muy específica, generalmente se usa en biopsias pero también se puede hacer en extendidos de muestra que no vengan de colonias.

Esta especialmente indicado en muestras de tejidos.

Soluciones

- # Ácido crómico al 4%
- # Nitrato de Plata 5%
- # Metionamina al 3%
- # Borato de Sodio al 5%
- # Bisulfito de sodio 1%
- # Cloruro de oro al 0.1%
- # Tiosulfito de sodio al 2%
- # Verde luz al 0.2%

* Lavar en agua destilada.

* Colocar las láminas en solución de trabajo de metionamina plata fresca por una hr a 60°C.

* Lavar en agua destilada con varios cambios.

* Potenciar la tinción en el dorado de oro por 5 min.

Metionamina-Nitrato de plata Stock

* Colocar con el contenido de soda por 5 min.

Nitrato de plata al 5% 5: 2.5: 1.5 ml

* Lavar en agua destilada

Metionamina al 3% 100: 50ml

con hematoxilina.

El precipitado blanco que se forma debe desaparecer, guardar en refrigerador

Metionamina-nitrato Plata solución de trabajo

Metionamina nitrato de plata en stock 25ml

Agua destilada 25ml

Borato de sodio 5% 2ml

Procedimiento

Oxidar en ácido crómico por una hora.

Lavar en agua destilada por algunos segundos.

Aclara con bisulfito de sodio por 1 min.

Lavar en agua destilada.

Colocar las láminas en solución de trabajo de metenamina plata fresca, por una 1hr a 60°C.

* Lavar en agua destilada, con varios cambios.

* Potenciar la tinción en cloruro de oro por 5 min.

* Lavar en agua destilada.

* Colocar con tiosulfato de sodio por 3 min.

* Lavar en agua destilada.

* Contrastar con verde luz, por 90 seg o con hematoxilina.

* Deshidratar, y montar.

Incubarla durante 2 horas a 37°
Tomar una gota y ponerla entre portaobjeto y cubreobjeto y observar al microscopio.

La presencia de cubos germinales o germinativos, como dedo aplomado en su extremo, permite el diagnóstico presuntivo de *Candida albicans* (Microbiología Clínica de laboratorio, Rosenman y Roberts, editorial Panamericana)

Test del Tubo Germinativo

Las cepas de *Candida albicans* son capaces de formar filamentos, en condiciones de laboratorio, que permiten una fácil y rápida identificación.

Test del Tubo Germinativo.

Tomar una muestra de la cepa en estudio.

Emulsionarla en 0.5 ml de plasma, obteniendo una opalescencia.

Incubarla durante 3 horas a 37°.

Tomar una gota y ponerla entre portaobjeto y cubreobjeto y observar al microscopio.

La presencia de tubos germinales o germinativos, como dedo "aglobonado" en un extremo, permite el diagnóstico presuntivo de *Candida albicans* (Micología Práctica de Laboratorio. Koneman y Roberts, editorial Panamericana)

Lista de imágenes para consultar

Desde aquí puede buscar las imágenes capturadas desde microscopio óptico, obtenidas de libros y de fotografías de pacientes con lesiones. Esto le servirá de referencia para cuando haga sus propias observaciones macroscópicas y microscópicas.

Imágenes Macroscópicas.

Macro Lesión de Piel y cabello

Macro de cultivos

Microscopias de exámenes directos frescos.

En KOH

Micro de elementos diagnóstico, en muestra de cultivos.

En Azul de Lactofenol

Índice de imágenes de lesiones

Consulta algunas de las patologías más comunes, en imágenes, que te permitirán conocer como es su aspecto en el paciente.

Tiña de Placa Gris, lesión por *Microsporum audouinii*.

(Tratado de Micología Médica, John Rippon, editorial interamericana McGraw-Hill)

Síndrome dermatofítico, en mano y pies, onícomicosis.

(Micología Práctica de Laboratorio, Koneman y Roberts, editorial Panamericana)

Lesión extensa en espalda de un paciente con Pitiriasis versicolor, acromiante

(Micología Práctica de Laboratorio, Koneman y Roberts, editorial Panamericana)

Cultivo de *Microsporum canis*, notarse el pigmento característico por el reverso, su aspecto algodonoso por el anverso.

(Original, Fotografías de muestras clínicas)

Índice de Imágenes de cultivo

Es de un gran costo el montar medios de cultivos y por eso no es habitual que se implementen. Este índice le permitirá tener la imagen de cómo son los patógenos más habituales cuando se desarrollan en medios de cultivos. En los cultivos de hongos se debe observar:

- # Forma del micelio
- # Color del micelio
- # Color del anverso del cultivo

Estas características pueden orientar el diagnóstico micológico diferencial y son claves para saber si es un contaminante o patógeno.

6 muestras de hongos obtenidas de diferentes lesiones, visión por el reverso de la placas, nótese los pigmentos.

(Original, Fotografías de muestras clínicas)

Cultivo de *Microsporus canis*, nótese el pigmento característico por el reverso, su aspecto algodonoso por el anverso.

(Original, Fotografías de muestras clínicas)

Trichophyton rubrum con su fuerte pigmento rojo y su anverso algodonoso. Véase el contaminante en la placa claramente identificable por su anverso y reverso más oscuro.

(Original. Fotografías de muestras clínicas)

Muestra de escama para su observación directa y cultivo.

(Original. Fotografías de muestras clínicas)

Pigmento similar al del *Trichophyton rubrum* pero menos intenso, correspondiente al *Trichophyton mentagrophytes*.

(original. Fotografías de muestras clínicas)

Muestra de *Epidermophyton floccosum*. Obsérvese el hongo contaminante, y la diferencia con el hongo patógeno que se observa blanco y algodonoso.

(Original. Fotografías de muestras clínicas)

Un acercamiento al fuerte pigmento de *Microsporum canis*, por el reverso.

(original. Fotografías de muestras clínicas)

La Pitiriasis Versicolor, producida por Malassezia furfur, es una de las pocas patologías identificable por examen directo. obsérvese las hifas cortas y el grupo de levaduras en racimo.

(Original 400x)

Índice de imágenes de directos

Todas estas imágenes son tomadas de exámenes directos frescos y aclaradas con KOH, con lo cual no sólo se pretende mostrar imágenes para que sean comparadas con sus observaciones, si no que se propone una forma fácil y barata de empezar a identificar patologías por hongos.

En el examen directo de hongos, es muy raro que se encuentren estructuras diagnóstica, salvo en algunas dermatomicosis, por lo que el diagnóstico directo solo orienta el origen micótico de una lesión en piel y cabello y no al diagnóstico definitivo, que se obtiene a través del cultivo.

La presencia de hifas en un directo, es un claro indicador de una infección por hongos.

(Original 400x)

La Pitiriasis Versicolor, infección por *Malassezia furfur*, es una de las pocas patologías identificable por examen directo, obsérvese las hifas cortas y el grupo de levaduras en racimo.

(Original 400x)

Presencia de hifas de longitud variable en una muestra de uña.
(Original 400x)

Presencia de hifas y artrosporas en muestra de escamas de piel.
(Original 400x)

Estructura, que se puede confundir con hifas septadas, obsérvese lo continua que es, así como los bordes muy regulares.
(Original 400x)

excelencia la mejor observación se logra con microcultivos de hongo.

En estos preparados se observan conidios, macroconidios, microconidios e hifas, que son características de cada especie de hongo.

Trichophyton mentagrophytes, no se observa su característica hifa en espiral, pero se pueden apreciar sus hifas con microconidias y cruz de hifas.

No siempre es posible recuperar los órganos reproductores que permiten clasificar al hongo, de ahí que se recomienda el estudio con microcultivo. En la foto, se observan hifas de un cultivo de Epidermophyton floccosum.

Índice de imágenes de estructuras diagnósticas con Azul de Lactofenol

Estas imágenes fueron obtenidas del micelo de cultivos, tocando con cinta adhesiva el micelo y montando las muestras en un portaobjeto con Azul de Lactofenol, este procedimiento puede permitir acelerar la observación de estructuras que son diagnósticas para cada tipo de hongo, pero por excelencia la mejor observación se logra con microcultivo de hongo.

En estos preparados se observan conidios, macroconidios, microconidios e hifas, que son características de cada especie de hongo

Trichophyton mentagrophytes, no se observa su característica hifa en espiral, pero se pueden apreciar sus hifas con microconidias y cruz de hifas.

No siempre es posible recuperar los órganos reproductores que permiten clasificar al hongo, de ahí que se recomienda el estudio con microcultivo. En la foto, se observan hifas de un cultivo de *Epidermophyton floccosum*.

Microconidios de un cultivo de *Trichophyton rubrum*. No se observa en esta imagen, los macroconidios "salchicha" típicos de estos hongos.

En esta imagen se recuperó hifas y macroconidios típicos para el *Microsporum canis*, véase que los macroconidios poseen más de 6 divisiones, lo que es característico de ellos.