

Universidad de Costa Rica
Facultad de Microbiología

Trabajo final de graduación
para optar por el grado de
Licenciatura en Microbiología y Química Clínica

BASIDIOBOLUS SP, UN ZIGOMICETE DE
IMPORTANCIA MÉDICA Y SU RELACIÓN CON EL
GECO DOMÉSTICO (*HEMIDACTYLUS FRENATUS*)
EN COSTA RICA

Wendy Villalobos Meléndez

Cuidad Universitaria Rodrigo Facio

Julio del 2007

AGRADECIMIENTOS

Al personal del departamento de Micología de la Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica; a la doctora Ingrid Salas y al doctor Francisco Hernández por toda la ayuda y el apoyo brindado durante la elaboración de este trabajo.

Al doctor Pedro Carrillo y al señor Juan Diego Castro, por su colaboración y aporte tan valiosos.

A la familia Elizondo Gómez que tan amablemente me recibieron en repetidas ocasiones en sus hogares durante los períodos de recolección de muestras.

A mi novio, el señor Mauricio Segura, por su ayuda, paciencia y compañía durante mis giras.

A mis padres, mis abuelitos Abel y Nena, y a toda mi familia, tanto a los que están presentes como a los que han partido durante tiempo de elaboración de este proyecto que siempre estuvieron conmigo brindándome su apoyo.



UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
VICERRECTORÍA DE DOCENCIA

FACULTAD DE MICROBIOLOGÍA
CIUDAD UNIVERSITARIA RODRIGO FACIO

Acta de presentación de Requisito Final de Graduación

Sesión del Tribunal Examinador celebrada el miércoles 04 de julio del año 2007 con el objeto de recibir el informe oral de la estudiante **WENDY VILLALOBOS MELENDEZ**, carné 994344, quien se acoge al Reglamento de Trabajos Finales de Graduación bajo la modalidad de PRACTICA DE GRADUACIÓN, para optar por el grado académico de LICENCIADA EN MICROBIOLOGÍA Y QUÍMICA CLÍNICA y el título profesional de DOCTORA EN MICROBIOLOGÍA Y QUÍMICA CLÍNICA.

Están presentes los siguientes miembros del tribunal:

Dr. Carlos Cordero **PRESIDENTE**
Dra. Ingrid Salas
Dr. Pedro Carrillo
Dr. Francisco Hernández
Dr. Adrián Avendaño

ARTICULO 1

El presidente informa que el expediente de **WENDY VILLALOBOS MELENDEZ**, contiene todos los documentos de rigor, incluyendo el recibo de pago de los derechos de graduación. Declara que la postulante cumplió con todos los demás requisitos del plan de estudios correspondientes, y por lo tanto, se solicita que proceda a hacer la exposición.

ARTICULO 2

La postulante **WENDY VILLALOBOS MELENDEZ**, hace la exposición oral de su trabajo de graduación titulo "*Basidiosbolus sp.*, un zigomicete de importancia medica y su relación con el geco domestico (*Hemidactylus frenatus*) en Costa Rica".

ARTICULO 3

Terminada la disertación, los miembros del Tribunal Examinador interrogan a la Postulante durante el tiempo reglamentario y, una vez concluido el interrogatorio, el Tribunal se retira a deliberar.

ARTICULO 4

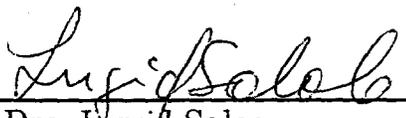
El tribunal considera el trabajo final de graduación satisfactorio y le confiere la calificación de: 10 con mención honorífica.

ARTICULO 5

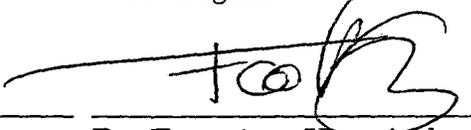
El presidente del Tribunal comunica a la Postulante el resultado de la deliberación y la declara acreedora al grado de **Licenciada en Microbiología y Química Clínica** y al título profesional de **Doctora en Microbiología y Química Clínica**.

Se le indica la obligación de presentarse al acto público de juramentación al que será oportunamente convocada. Se da lectura al acta que firman los Miembros del Tribunal Examinador y a la Postulante, a las 10:50 horas.

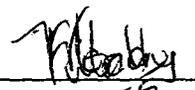

 Dr. Carlos Cordero
 Presidente


 Dra. Ingrid Salas


 Dr. Pedro Carrillo


 Dr. Francisco Hernández


 Dr. Adrian Avendaño


 Wendy Villalobos Meléndez
 Postulante

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	ii
HOJA DE FIRMAS	iii
ÍNDICE DE CONTENIDOS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	viii
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	2
ZIGOMICOSIS Y LAS MICOSIS EMERGENTES	2
INFECCIÓN POR <i>BASIDIOBOLUS SP.</i> EN HUMANOS	3
INFECCIÓN POR <i>BASIDIOBOLUS SP.</i> EN ANIMALES	6
CARACTERÍSTICAS DE <i>BASIDIOBOLUS</i>	6
DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE <i>BASIDIOBOLUS SP.</i>	8
CICLO DE VIDA	9
EL GECO DOMÉSTICO <i>HEMIDACTYLUS FRENATUS</i>	9
GECOS Y SU DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA	10
<i>SALMONELLA</i> Y SU RELACIÓN CON REPTILES	11
JUSTIFICACIÓN	14
OBJETIVOS	15
OBJETIVO GENERAL	15
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
MATERIALES Y MÉTODOS	16
ÁREA DE ESTUDIO	16
RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE HECES DE <i>HEMIDACTYLUS FRENATUS</i> EN CASAS COLONIZADAS POR ESTE REPTIL	16
AISLAMIENTO INICIAL DE <i>BASIDIOBOLUS SP.</i>	16
EVALUACIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA	17
DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE CRECIMIENTO DEL HONGO A DISTINTAS TEMPERATURAS	17
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	17
RESULTADOS	18
DISCUSIÓN	21
REFERENCIAS	28

ÍNDICE DE CONTENIDOS (continuación)

ANEXO 1

ANEXO 2

ANEXO 3

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Lesiones causadas por <i>Basidiobolus sp.</i>	4
Figura 2. Fenómeno de Splendore-Hoeppli	5
Figura 3.	
A. Aspecto de la colonia de <i>Basidiobolus sp.</i>	8
B. Zigosporas de <i>Basidiobolus</i>	8
Figura 4. <i>Hemidactylus frenatus</i>	10
Figura 5. Distribución del género <i>Basidiobolus sp.</i> en Costa Rica	11
Figura 6. Aislamiento de <i>Basidiobolus sp.</i> a partir de muestras analizadas según lugar de origen	18
Figura 7. Crecimiento promedio del hongo en milímetros a distintas temperaturas de incubación	19
Figura 8. Hemólisis en agar sangre	25
Figura 9. Degradación de proteínas en el agar caseína	25

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Análisis de muestras pareadas de Mann-Whitney	20
--	----

INTRODUCCIÓN

Los zigomicetes son un grupo de hongos aerobios, filamentosos, relativamente primitivos, que se reproducen asexualmente por endosporas y sexualmente por zigosporas (Ripon 1990; Rodríguez 1998). Son hongos omnipresentes y se encuentran usualmente en suelos húmedos con un alto contenido de nitrógeno y en alimentos en descomposición, como el pan y vegetales (Arenas 1993). Se comportan como saprófitos; sin embargo, algunas especies son potencialmente patógenas, las que se han clasificado en dos órdenes de importancia médica, que se diferencian por su forma de esporular; estos son el orden Mucorales y el orden Entomophthorales y las entidades clínicas asociadas son denominadas zigomicosis.

La primera relación de los Zigomicetes con patología, data de inicios del siglo XIX (Ribes *et al* 2000), cuando en 1925, Van Overeen informó de la primera infección por Entomophthorales en un caballo. En 1956, Lei-Kian Joe y Njo-Imjo, en Indonesia, describieron los tres primeros pacientes con zigomicosis subcutánea, debida a *Basidiobolus ranarum*. En Brasil, la entomophthoromicosis en seres humanos se conoce desde 1966 y hasta 1988 se habían registrado 17 enfermos, procedentes del noroeste de este país. En México en 1988, De Jean-Bojoge *et al* comunicaron el primer caso de basidiobolomicosis por *B. haptosporus* (citado por Arenas 1993). En Costa Rica, no se han descrito pacientes con infecciones debidas a este hongo, sin embargo, está presente en nuestro ambiente; por lo que es necesario estudiarlo a fin de familiarizarse más con éste y las entidades clínicas a las cuales se relaciona; pues es posible que algunos casos hayan pasado desapercibidos o se hayan diagnosticado erróneamente, por falta de un método de reconocimiento adecuado del agente causal.

ANTECEDENTES

Zigomicosis y las micosis emergentes

Los zigomicetes han cobrado mayor importancia médica en las últimas décadas, al igual que ha ocurrido con una amplia gama de hongos, que otrora eran considerados solo como agentes saprófitos y cuya importancia en biomedicina se reducía a la de simples contaminantes de laboratorio. El panorama etiológico en micología ha ido cambiando paulatinamente con los avances en salud, que han logrado una mayor sobrevivencia de los pacientes con patologías crónicas anteriormente consideradas terminales, a la vez, los adelantos en biomedicina que implican intubaciones y métodos diagnósticos invasivos, cada vez más frecuentes en los hospitales, abren puertas de entrada que son explotadas por agentes infecciosos, incluyendo algunos con bajos potenciales de virulencia.

Adicionalmente, la aparición del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) puso de manifiesto a un grupo de población con un grado de susceptibilidad aumentado, que resulta presa fácil de esos agentes infecciosos oportunistas (Ribes *et al* 2000).

Las zigomicosis son entidades clínicas que se pueden agrupar en agudas o crónicas. Las primeras suelen afectar a individuos con fallas en su respuesta inmunológica; en tanto, las zigomicosis crónicas tienden a asociarse más con los factores de virulencia del agente, como su capacidad de invasión al hospedero; por lo tanto, pueden afectar a personas con una respuesta inmunológica adecuada (Rodríguez 1998)

Las zigomicosis agudas son producidas por hongos del orden Mucorales. Estos son netamente oportunistas, por lo que pueden considerarse patologías adquiridas de forma secundaria a un factor predisponente, y manifiestan un marcado tropismo hacia el endotelio vascular, provocando trombosis e isquemia, con infartos y necrosis tisular. El cuadro clínico se inicia abruptamente y se caracteriza por una respuesta inflamatoria exacerbada (Ripon 1990; Rodríguez 1998). Por estas razones algunas formas de zigomicosis se encuentran entre las micosis más agudas y fulminantes conocidas (Kwon-Chung 1992).

Las zigomicosis crónicas suelen ser cutáneas o subcutáneas. Son causadas por hongos del orden Entomophthorales y debido a la capacidad para invadir tejidos que presentan algunos de estos agentes, no se les considera oportunistas, por lo que no es

estrictamente indispensable la presencia de algún factor inmunológico que predisponga a la enfermedad. No obstante, a diferencia de las zigomicosis agudas, tienen un curso más benigno (Ribes *et al* 2000; Maciel *et al* 2005).

En las zigomicosis crónicas se incluyen dos tipos de micosis: las zigomicosis rinofacial crónica, cuyo agente etiológico es *Conidiobolus coronatus* y su manifestación más común es la infección del tejido subcutáneo nasal, causando deformidades en los sitios adyacentes (Rodríguez 1998). También está la zigomicosis subcutánea crónica o basidiobolomicosis, cuyo agente etiológico es *Basidiobolus sp.*, (Rodríguez 1998; Ribes *et al* 2000), el cual puede causar una celulitis inflamatoria en los miembros superiores, tórax, glúteos y abdomen (Rodríguez 1998; Bigliuzzi *et al* 2004; Taylor *et al* 1999), aunque también, se ha involucrado en infecciones gastrointestinales (Rodríguez 1998).

Infección por *Basidiobolus sp.* en humanos

No se ha descrito ningún factor predisponente para la basidiobolomicosis; aunque, se ha reportado como más frecuente en personas de la raza negra. Se ha descrito en ambos sexos. El 80% de los casos ocurren en menores de 20 años y de estos el 40% en menores de 10 años (Arenas 1993).

El cuadro clínico más común es de localización subcutánea. Esta infección se ha descrito más frecuentemente en países tropicales y subtropicales. La infección comienza con un nódulo subcutáneo unilateral que aumenta gradualmente de tamaño (Ribes *et al* 2000, Arenas 1993). La inflamación subcutánea tiene consistencia firme y es bien circunscrita, indolora y no se encuentra adherida a la piel que la cubre; pero está anclada a la aponeurosis muscular (Ribes *et al* 2000; Arenas 1993) y por lo regular, se encuentra contenida dentro de un panículo. La piel que la cubre tiende a cambiar de color o a hiperpigmentarse y hacerse atrófica, pero no se ulcera (Fig. 1). La masa continúa creciendo y en ocasiones afecta todo el órgano en el que se encuentra (Ribes *et al* 2000). Puede haber cierto grado de linfedema, pero solo ocasionalmente afecta a ganglios (Arenas 1993).

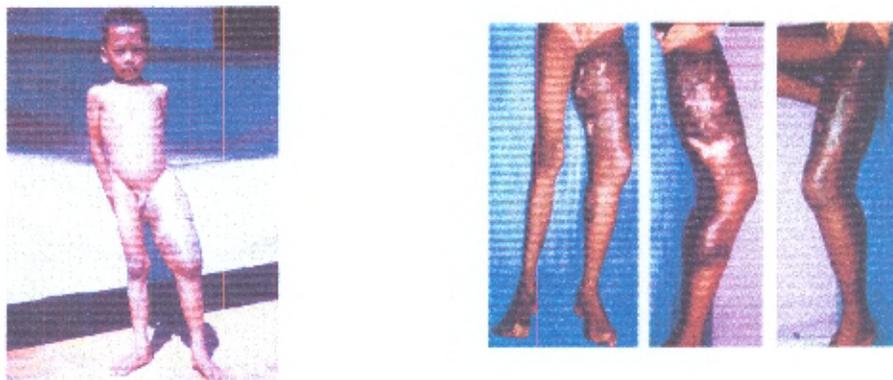


Figura 1. Lesiones causadas por *Basidiobolus sp.*

Fuente: Mycology online

No se conoce el periodo de incubación y tampoco está clara la puerta de entrada del hongo, sin embargo, en algunos casos está asociada a una picadura de insecto o a la inoculación traumática del hongo a nivel subcutáneo, donde inicialmente produce una reacción de tipo antígeno-anticuerpo que se manifiesta por el fenómeno de Splendore-Hoepli (Fig. 2) (Arenas 1993, Ribes et al. 2000) y crece lentamente para desarrollar una reacción granulomatosa crónica, dando a la lesión un aspecto de placas firmes, induradas, eritematosas e indoloras (Prabhul & Patel 2004).

Los hallazgos subcutáneos en esta micosis pueden mimetizar una enfermedad tumoral infiltrativa crónica, escleroderma profunda o elefantiasis (Choonhakarn & Inthraburan 2004). El diagnóstico correcto se realiza a partir de estudios histológicos y cultivo del agente (Mahaisavariya *et al* 1999).

Otra manifestación clínica corresponde a una inoculación vía gastrointestinal o pulmonar, en la cual se desarrolla un cuadro histológico caracterizado por un proceso inflamatorio crónico, con neutrófilos, eosinófilos y muchos abscesos pequeños, rodeados por una palizada de células epiteloideas y gigantes. Los elementos fúngicos atraviesan el tejido afectado y están rodeados por el halo eosinofílico, característico del fenómeno de Splendore-Hoepli. No se observa que las hifas infiltran las paredes o los vasos, o que sigan por la luz de estos (Ribes *et al* 2000). Se piensa que variaciones de estos patrones básicos, probablemente reflejan el estado de inmunocompetencia del paciente (Ribes *et al* 2000).

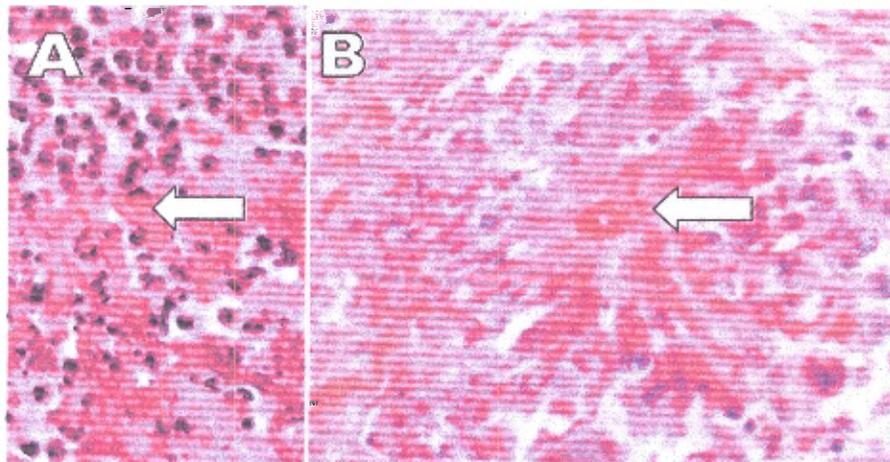


Figura 2. Fenómeno de Splendore-Hoepli

Fuente: A. Tomado de Mycology online

B. Tomado de Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical

La infección en el tracto gastrointestinal por *Basidiobolus sp.* es poco frecuente, sin embargo su prevalencia ha ido en aumento, por lo que se ha propuesto como una infección oportunista emergente. Se ha reportado este hongo como agente causal de infecciones en pacientes cuyo sistema inmune se encuentra comprometido; por ejemplo, un caso se trató de una paciente que recibía tratamiento inmunosupresor pos-transplante renal (Choonhakarn 2004); y en un segundo caso, se asoció con una enfermedad angioinvasiva (Fungus 2006).

Las infecciones gastrointestinales han involucrado principalmente en tejidos y órganos como el colon (Khan *et al* 2001, Zavasky *et al* 1999), recto (Smilack 1998), apéndice, retroperitoneo (Lyon *et al* 2001), hígado (Azadeh *et al* 2004), estómago y páncreas (Anónimo 1999). Los síntomas varían considerablemente y dependen del sitio y grado de infección (Ribes *et al* 2000). Por lo general cursa con dolor abdominal inespecífico, constipación, diarrea muco-sanguinolenta, náuseas, vómito, fiebre y pérdida de peso (Prabhul 2004), úlcera peptídica atípica y hematemesis en “pozo de café” (Ribes *et al* 2000) o vómito con sangre producido como resultado del sangrado gastrointestinal alto, en donde al salir lentamente o al cesar el flujo del sangrado, la hemoglobina roja es convertida a hematina parda por el ácido gástrico (Manual Merck 1999). Además, se asocia con engrosamiento mural, masas nodulares y ulceración del

intestino que asemeja la enfermedad de Crohn y cuyo diagnóstico diferencial se realiza histopatológicamente por la observación de un infiltrado granular eosinofílico, rodeado de hifas y fenómeno de Splendore-Hoeppli, que no se encuentran en la enfermedad de Crohn (Prabhul 2004).

El diagnóstico se realiza necesariamente a partir de una biopsia del área lesionada, dado que no se produce ningún exudado y el hongo tiende a profundizar en la lesión granulomatosa. La muestra se observa al fresco con KOH y se deben buscar hifas, que aparecen como escasos filamentos cortos, cenocíticos o irregularmente septados. Se prefiere separar diferentes segmentos de la muestra y colocarlos en varias placas de un agar como el Agar Glucosado de Sabouraud sin cicloheximida ni cloranfenicol, para aumentar la posibilidad de aislamiento (Rodríguez 1998).

Infección por *Basidiobolus sp.* en animales

Las infecciones por *Basidiobolus sp.* también se han descrito en animales como caballos (Rodríguez 1998; Ribes *et al* 2000), sapos, canguros (Speare-Thomas 1985), murciélagos (Chaturvedi 1984) entre otros, causando lesiones en las partes laterales de la cabeza y el tronco; son lesiones de tipo deformante, a veces impresionantes, de acuerdo con la evolución de la micosis (Rodríguez 1998). Estos animales adquieren el hongo al estar en contacto con el material contaminado (Ribes *et al* 2000). Además, en perros causa enfermedad diseminada (Miller-Turmwald 1984; Ribes *et al* 2000), en el ganado vacuno abortos y mastitis; y también en cerdos causa enfermedad gástrica (Arenas 1993)

Características de *Basidiobolus*.

Se han identificado tres especies del género *Basidiobolus*: *B. meristosporus*, *B. haptosporus* y *B. ranarum*, tomando en cuenta su composición antigénica, análisis de restricción de ADN y patrón de isoenzimas secretadas. *B. ranarum* es la única especie patógena para humanos (Fungus 2006).

Basidiobolus sp. es un hongo de crecimiento rápido, menor a 5 días (Larone 1995), que puede esporular en un tiempo corto (Arenas 1993). Las colonias son planas y glabras, con micelio aéreo corto. Presentan color beige en el anverso y blanco en el reverso (Larone 1995) (Fig. 3A). Su superficie colonial es plegada en el centro, y algunas cepas tienen un olor característico a humedad, que recuerda al de *Streptomyces* (Arenas 1993; Larone 1995).

Las hifas miden entre 8 y 20 μm de diámetro, son espaciadamente septadas. Produce muchas zigosporas redondas intercalares de 20 a 50 μm de diámetro con pared delgada lisa u ondulada y un prominente apéndice en forma de papila o pico, que representa el remanente del tubo copulatorio (Fig. 3B) (Larone 1995), resultado de la unión de dos hifas vecinas que forman picos de conjugación y persisten en la superficie de la zigospora (Arenas 1993). Los esporangióforos muestran una parte terminal alargada que produce un esporangiolo unicelular (conidio adhesivo) que deja por debajo una vesícula subconidial o esporangiolo; los cuales son proyectados con tal fuerza que se estampan en la pared del tubo de vidrio a la cual se adhieren; a estas esporas se les conoce como balistosporas (Arenas 1993).

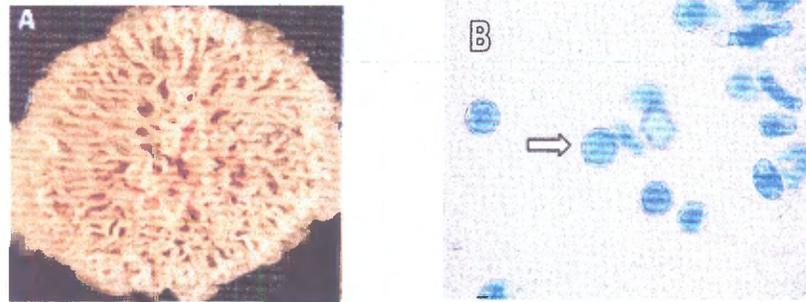


Figura 3.

A. Aspecto de la colonia de *Basidiobolus sp.*

B. Zigosporas (flecha) de *Basidiobolus sp.*

Distribución geográfica de *Basidiobolus sp.*

Basidiobolus sp. es endémico de Uganda y otras áreas de África, India (Dasgupta 1976) y otras partes de Asia; pero se ha encontrado alrededor del mundo aún en áreas donde la enfermedad que produce no se ha reportado (Ribes *et al* 2000), como es el caso de Costa Rica. En años recientes no solo la distribución geográfica de la infección se ha expandido, sino también el espectro de manifestaciones y el espectro de hospederos se ha ampliado (Choonhakarn 2004).

Este saprofito filamentoso ha logrado aislarse de cada continente excepto de la Antártica (Nelson *et al* 2002). Fue aislado por primera vez del intestino de ranas y lagartijas sanas por Eidam en 1886 (Taylor 1999) y desde entonces se ha logrado cultivar de heces y del tracto gastrointestinal de varias especies de anfibios, reptiles, peces y vertebrados insectívoros, por lo que se cree que puede jugar un papel de comensal en el tracto intestinal de estos animales (Feio *et al* 1999). Además, se ha encontrado en detritos de la vegetación, suelos y frutas que están contaminadas con estos hongos (Mathew *et al* 2005; Prabhul 2004). A pesar de su distribución mundial los casos descritos de basidiobolomicosis se limitan a las zonas tropicales y subtropicales.

Este hongo se ha aislado más frecuentemente del contenido fecal de la herpetofauna, y en menor frecuencia de suelos y detritos vegetales, por lo que para muchos autores, estos animales pueden ser el reservorio para el hongo (Ribes *et al* 2000).

Los insectos pueden comportarse como vectores mecánicos más que como reservorios (Feio *et al* 1999; Ribes *et al* 2000), ya que pueden acarrear el hongo en el tracto alimentario o en su cutícula sin ser parasitados (Ribes *et al* 2000). La degeneración de la quitina (principal compuesto de la cutícula de los insectos) debida a la enzima quitinasa que posee el hongo, es considerada un importante punto para explicar la diseminación del hongo mediante insectos (Feio *et al* 1999)

Los insectos que portan en sus patas esporas de *Basidiobolus* sp. son ingeridos por reptiles y anfibios, los cuales subsecuentemente diseminan las esporas en sus excretas (Ribes *et al* 2000).

Ciclo de vida

Basidiobolus sp. lleva parte de su ciclo de vida en el intestino de lagartijas y es liberado en el excremento, en forma de esporas y micelio. Las esporas germinan y el organismo crece saprófiticamente en el excremento, de donde puede ser adquirido a través de una inoculación traumática por un individuo (Ribes *et al* 2000).

La naturaleza de la relación entre este hongo y los animales que lo diseminan es desconocida. La presencia del hongo en el tracto digestivo de anfibios no ha sido asociada a patogenicidad, por lo tanto no parece ser patógeno del tracto intestinal de anfibios ni reptiles, lo que refuerza la hipótesis de que exista una relación mutualista o comensalista entre ambos (Nelson 2002).

El aislamiento de *Basidiobolus* a partir de excretas de la lagartija *Hemidactylus frenatus*, una de las especies, de las lagartijas conocidas popularmente como “gecos”, es de suma importancia debido a su estrecha relación con el hombre y la gran dispersión global que ha logrado en los últimos años.

El geco doméstico *Hemidactylus frenatus*

Los gecons son lagartijas arborícolas de la familia Gekkonidae, algunos géneros son partenogenéticos; mientras que en otros hay sexos separados. Entre estos últimos se ubica *Hemidactylus frenatus*, conocido como “geco doméstico” (Fig. 4) y considerado uno de los miembros de la familia más exitoso para colonizar nuevos territorios, desplazando a las especies autóctonas, incluyendo los gecons partenogenéticos (Petren y Case 1998).

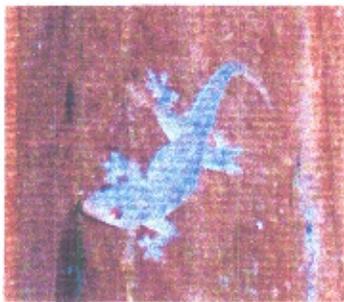


Figura 4. *Hemidactylus frenatus*

El calificativo de geco doméstico hace alusión a su carácter domiciliar; pues estos reptiles se han adaptado a vivir dentro de las casas y es común observarlos durante la noche posados en paredes y techos, usualmente cerca de las fuentes de luz donde se concentran gran cantidad de insectos de los que se alimentan (Petren & Case 1998); por lo que se han propuesto como control biológico de insectos (Canyon & Hii 1997) e incluso de arañas (Ramires & Fraguas 2004). Presentan una coloración que oscila de pardo a amarillo claro; sin embargo, al posarse sobre superficies blancas disminuye la intensidad de su coloración logrando un efecto de cripsis (Dame 2004). Otra característica distintiva es su capacidad de vocalizar, realizando sonidos característicos, a manera de chasquidos que delatan su presencia en las noches y que tiene funciones de comunicación intraespecie en interacciones sociales (Dame 2004).

Gecos y su distribución geográfica

Se considera que el geco doméstico es nativo de las islas Marianas, en el Pacífico Central, desde donde fue introducido a los territorios vecinos y actualmente su diseminación es cosmopolita (Dame 2004).

La documentación del primer registro de este reptil en EEUU se dio en Hawaii, en 1951 (Case 2004) y en México apareció por primera vez alrededor de 1930 (Hunsaker 1966). Se cree que es con el aumento de las actividades comerciales marítimas que logró su diseminación a todo el continente americano, incluyendo nuestro país (Bolaños com. Pers), donde ha encontrado un ambiente propicio para su reproducción y establecimiento. Una de las hipótesis para su entrada y diseminación en Costa Rica señala al Depósito Libre de Golfito y las cajas y material de embalaje que

salen de allí hacia otros territorios del país; lo que podría explicar su diseminación hacia el Valle Central (Fig.5) (Bolaños com. Pers, Leenders 2001).

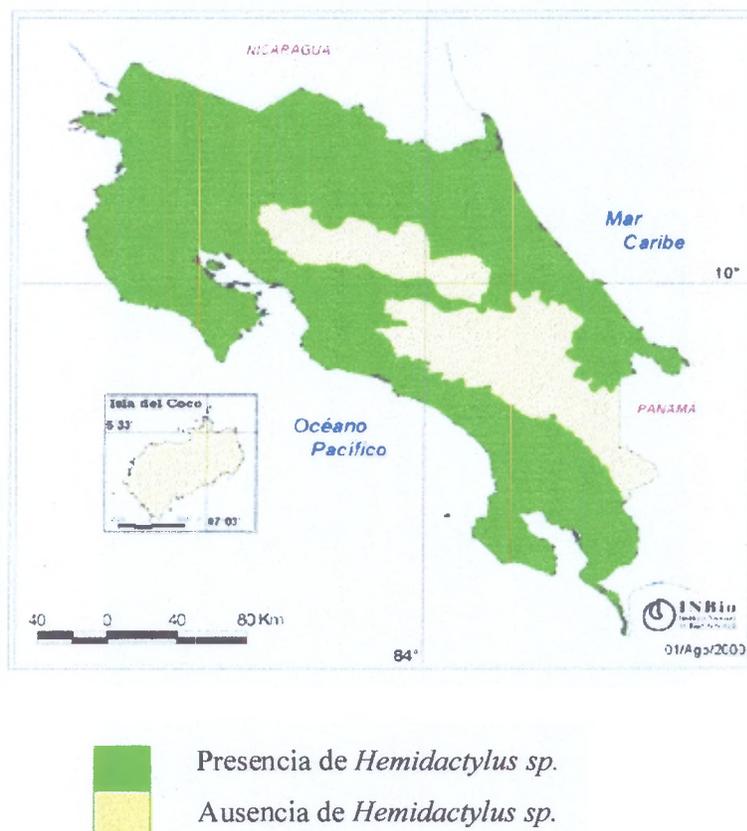


Figura 5. Distribución del género *Hemidactylus sp.* en Costa Rica.

Cortesía de INBio

***Salmonella* y su relación con reptiles**

Los gecos, al igual que otros reptiles, con gran frecuencia albergan *Salmonella* como parte de su flora normal, lo cual podría representar un problema de salud pública, tal como ha ocurrido en los EEUU con otros reptiles usados como mascotas (Brennere *et al* 2000). Por tal motivo, es importante considerar también las posibles implicaciones que podrían acarrear los gecos, si se descubriera que transportan este tipo de bacterias; lo cual se ha documentado en otras latitudes (Pasmans 2005). Por ello, es importante revisar, aunque sea someramente, el papel de *Salmonella* en patología humana en relación con contaminación fecal de gecos.

El género *Salmonella* está ubicado en la familia Enterobacteriaceae y como tal, se trata de bacilos Gram negativo, anaerobios facultativos y la mayoría de las cepas no fermentan la lactosa, son indol, Voges Proskauer, fenilalanina y urea negativas; además, producen H₂S en agar Triple azúcar hierro (TSI) (Mahon & Manuselis 2000). Sin embargo, la definición de especies en este género no está bien consolidada, por lo que a menudo se hace más alusión a los serotipos que a las especies. Anteriormente, los serotipos fueron considerados como especies o subespecies e incluso actualmente algunos autores siguen nombrándoles como tales. No obstante, el hecho de que se hayan descrito más de 2400 serotipos hace que la nomenclatura de este género sea complicada y en pos de una simplificación el Centro de Control de Enfermedades (CDC) ha adoptado un sistema basado en característica genómicas, que agrupa los serotipos en siete grupos (I, II, IIIa, IIIb, IV, V y VI), con solo dos especies *S. enterica* (I, II, IIIa, IIIb, IV y VI) y *S. bongori* (V), lo que resulta práctico para los propósitos epidemiológicos, especialmente en el seguimiento de brotes epidémicos relacionados con este agente, que es responsable de la mayoría de los casos pediátricos de diarrea bacteriana en los EEUU (Brennere *et al* 2000).

Algunos serotipos de *Salmonella*, de los subgrupos II, III y IV, se han encontrado como parte de la flora normal de aves, roedores y animales de sangre fría, incluyendo lagartijas y gecos (Mahon & Manuselis 2000). Las pesquisas epidemiológicas en las salmonelosis generalmente conducen a contaminación de alimentos, aguas o bien transmisión humano a humano; no obstante, la contaminación fecal de alimentos resulta la vía más común y en muchos casos se relaciona con manipulación de reptiles empleados como mascotas.

La literatura médica documenta muchos casos de este tipo, dos ejemplos son el caso de dos niños que al igual que su mascota, una iguana, cultivaron *S. chameleon*; o el caso de un niño y su serpiente mascota positivos por *S. orizonae* (Sanyal *et al* 1997). En la última década la prevalencia de salmonelosis asociada con mascotas reptiles en EEUU ha aumentado tanto, que se ha catalogado como un problema de salud pública y se ha llamado la atención para que los hospitales pediátricos consideren esta posibilidad cuando se presentan niños con diarrea (Reporter *et al* 2003).

Como se mencionó previamente la principal puerta de entrada al organismo para este agente es la vía oral, como infección de origen alimentario o hídrico, presentando un periodo de incubación de 8 a 48 horas. Las bacterias invaden la mucosa intestinal, donde producen una enterotoxina y una citosina que destruyen las células epiteliales

(Prescot *et al* 2004). Los síntomas incluyen náuseas, vómito, fiebre y escalofríos acompañados con diarrea acuosa y dolor abdominal.

En la mayoría de los casos el cuadro es autolimitado y los síntomas desaparecen usualmente en unos pocos días con poca o ninguna complicación. Los más susceptibles suelen ser los niños, ancianos y pacientes inmunosupresos. El uso de antibióticos como tratamiento no se encuentra indicado en casos leves, ya que puede aumentar el estado portador; sin embargo, cuando hay diseminación sanguínea se requiere de la antibioticoterapia; tal como ocurre en la fiebre Tifoidea y la llamada fiebre intestinal (Mahon & Manuselis 2000).

JUSTIFICACIÓN

En Costa Rica no se ha documentado ninguna de las formas clínicas de las micosis producidas por *Basidiobolus* sp.; no obstante, este hongo se aisló hace unos diez años de excretas de geocos del Pacífico Central. Actualmente, los geocos han colonizado territorios tan alejados como el Pacífico Norte, el Valle Central e incluso la zona del Caribe, lo que indirectamente podría ser sinónimo también de una mayor diseminación de *Basidiobolus* sp. hacia estas regiones del país; lo que implicaría un mayor riesgo para las posibles infecciones con tal agente. Para corroborar estas hipótesis se plantea en el presente trabajo una investigación tendiente a evaluar la prevalencia de *Basidiobolus* sp. en heces de geocos capturados en Guanacaste, Guápiles y San José. Además, se plantea la caracterización cualitativa de los posibles aislamientos y la evaluación de algunos factores de virulencia, como la presencia de hemolisina, gelatinasa, fosfolipasa y proteasas.

OBJETIVOS

Objetivo General

Realizar aislamientos de hongos del género *Basidiobolus sp.* a partir de excretas frescas del geco doméstico, *Hemidactylus frenatus* capturados en Guanacaste, Guápiles y San José.

Objetivos Específicos

1. Determinar la presencia de *Basidiobolus sp.* a partir de heces del geco doméstico, *Hemidactylus frenatus* en las áreas de Guanacaste, Guápiles y San José.
2. Realizar una descripción cualitativa macro y microscópica de los aislamientos del hongo en medios para micología de uso común.
3. Determinar la producción de enzimas como hemolisina, gelatinasa, fosfolipasa y proteasas en los aislamientos de *Basidiobolus sp.*
4. Determinar variaciones en el patrón de crecimiento de los aislamientos de *Basidiobolus sp.* a distintas temperaturas de incubación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Para el estudio se escogieron dos zonas de clima cálido como la zona de Nandayure en Guanacaste y la zona central de Guápiles; y una de clima templado, San José. Las muestras se recolectaron entre los meses de enero y noviembre del año 2006.

Recolección de muestras de heces de *Hemidactylus frenatus* en casas colonizadas por este reptil

Se tomaron 20 muestras en San José, 70 de Guanacaste y 15 de Guápiles. En las casas en las cuales se escuchaban los cantos característicos de los geos durante la noche, se asumió que están colonizadas y se hicieron las observaciones para confirmar la presencia de los geos.

Se capturaron algunos geos y se colocaron individualmente en frascos de vidrio para coleccionar las heces. También se procedió a coleccionar materia fecal en las casas, especialmente en las cocinas. La colecta de las muestras se realizó con pinzas y se colocaron dentro de tubos de ensayo (16x100 mm) debidamente rotulados, posteriormente se llevaron al laboratorio para ser analizadas en un mínimo de 24 horas y un máximo de 48 horas después de recolectadas. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente antes de analizarse.

También, se hicieron disecciones de algunos geos para extraer materia fecal y contenido del intestino medio y del posterior (cloaca), para aislamiento del hongo.

Aislamiento inicial de *Basidiobolus sp*

Cada muestra de heces o de intestino del geco se inoculó frotándola con un aplicador de madera contra un papel de filtro estéril, humedecido, colocado en la tapa de una placa de Petri con agar glucosado de Sabouraud (ASG).

De manera que cada muestra quedara esparcida en el papel de filtro frente al medio de cultivo y las placas se incubaron invertidas por 2 a 4 días, a temperatura ambiente. Así, al esporular el hongo, si estaba presente, las balistosporas serían expelidas, impactando la superficie del medio de cultivo, donde germinarían formando colonias puras y obviando de esta manera la interferencia del resto de la flora fecal o intestinal de las muestras de heces o de contenido de intestino, respectivamente.

Del crecimiento obtenido se hicieron montajes en azul de lactofenol para observar las características microscópicas e identificar al hongo.

Evaluación de factores de virulencia

De 28 aislamientos del hongo se tomó una porción y se colocó asépticamente en cada uno de los siguientes medios de cultivo: agar sangre, agar urea de Christensen, agar yema de huevo, agar caseína y gelatina nutritiva (Anexo 1). Cada medio de cultivo inoculado se incubó de 2-4 días a temperatura ambiente y se observó el crecimiento y el cambio en cada uno de los medios, para identificar los posibles factores de virulencia. La presencia de hemolisinas se detectó por la hemólisis en el agar sangre; la actividad de ureasa se evidenció por el viraje del indicador a una tonalidad rosada en el agar Urea de Christensen; la actividad de fosfolipasa se manifestó por un precipitado blanco alrededor de la colonia en el agar yema de huevo y la formación de un halo claro producto de la degradación de proteínas en el agar caseína. La gelatinasa se manifestó por la pérdida de la gelificación de la gelatina, para lo cual los tubos inoculados colocaron a 4°C por 30 min., si gelificaban implica que la gelatina no se hidrolizó, o sea que no se produjo la enzima gelatinasa.

Determinación de la capacidad de crecimiento del hongo a distintas temperaturas

Cada aislamiento del hongo se cultivó en placas de ASG, se incubó a temperatura ambiente por 48 horas y luego se cortaron porciones del cultivo de 1 cm², se colocó una porción sobre el centro de cada una de tres placas de ASG y se incubaron las placas a una temperatura de 20°C, 35°C y 42°C respectivamente y se comparó el diámetro de crecimiento de cada aislamiento en estas tres condiciones a los 4 días de incubación.

Análisis estadístico

Se realizó el análisis estadístico de Mann-Whitney para muestras pareadas con el programa SPSS para observar si existe diferencia significativa en el número de aislamientos obtenidos según el lugar de aislamiento. De igual forma, se realizó el método descriptivo del test de NPar (Wilcoxon Signed Ranks Test) para observar si hay diferencia significativa entre las temperaturas de crecimiento analizadas con respecto al diámetro (en milímetros) de la colonia.

RESULTADOS

A partir de las muestras analizadas y positivas para *Basidiobolus* sp. se obtuvieron colonias blanquecinas, de anverso grisáceo y de crecimiento radial, las cuales al ser observadas al microscopio de luz, montadas con azul de lactofenol, presentaban numerosas zigosporas con su característico pico copulador. En ninguno de los aislamientos se notó olor a *Streptomyces*.

Se aisló *Basidiobolus* sp. en 68 (64.8%) de las 105 muestras analizadas. De las 70 muestras analizadas en Nandayure se obtuvieron 55 (78.6%) de los aislamientos positivos por *Basidiobolus* sp. En la zona de Guápiles se analizaron 15 muestras, de las cuales 13 (86.7%) resultaron positivas por este hongo. Mientras que, en contraste con estas dos zonas, de las 20 muestras analizadas en la provincia de San José, no se obtuvo ningún aislamiento positivo (Fig. 6).

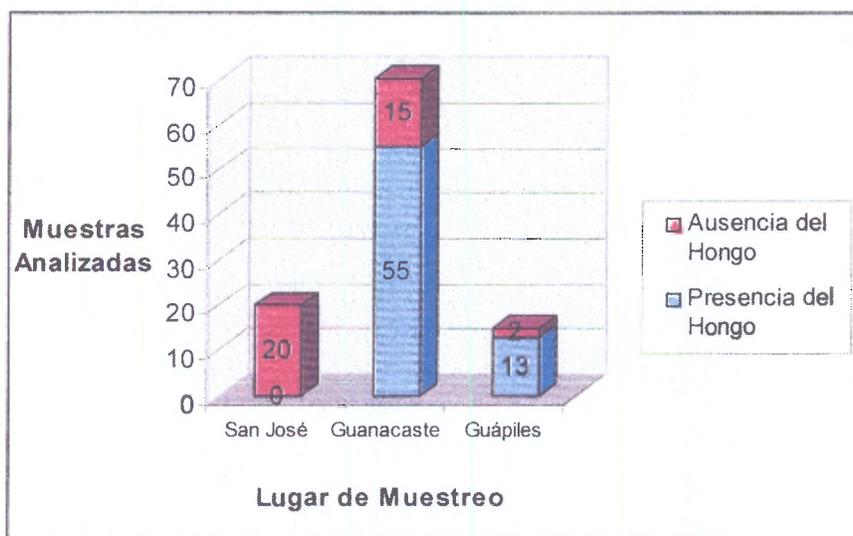


Figura 6. Aislamiento de *Basidiobolus* sp. a partir de muestras analizadas según lugar de origen

Las pruebas bioquímicas se realizaron a 28 de los aislamientos, de las cuales el 100% dieron las pruebas de hemolisina, ureasa, fosfolipasa, gelatinasa y proteinasa positivas.

En cuanto al crecimiento a diferentes temperaturas se pudo observar que a temperatura ambiente (20°C) solo un aislamiento presentó un crecimiento lento (menor a 20 mm), 15 de los aislamientos presentaron un crecimiento medio (entre 21 y 30 mm) y 10 aislamientos mostraron crecimiento rápido (mayor a 31 mm). El crecimiento promedio de los aislamientos a esta temperatura fue de 29 mm (ver cuadro 3 en anexos).

A 35°C la totalidad de los aislamientos presentaron un crecimiento rápido, mayor a 31 mm, siendo en promedio el crecimiento de 40 mm; mientras que a 42°C solo 8 de los aislamientos mostraron crecimiento lento, oscilando todos los aislamientos entre los cero y los 3 mm (en promedio menor a 1 mm) (Fig. 7).

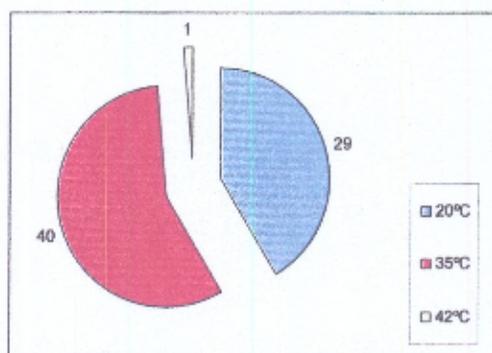


Figura 7. Crecimiento promedio del hongo en milímetros a distintas temperaturas de incubación

Según el análisis estadístico para muestras pareadas de Mann-Whitney se observó que existe diferencia significativa en aislamiento del hongo comparando San José con Nandayure y Guápiles, mientras que no existe diferencia significativa en los aislamientos realizados en Nandayure y Guápiles (Tabla 1 y Anexo 3), y en el método descriptivo del test de NPar (Wilcoxon Signed Ranks Test) se pudo observar una diferencia significativa entre las temperaturas de crecimiento analizadas con respecto al diámetro de la colonia.

Tabla 1. Análisis de muestras pareadas de Mann-Whitney

Lugar	U de Mann-Whitney	P
San José- Guápiles*	20	> 0.005
San José- Nandayure*	160	> 0.005
<i>Guápiles- Nandayure**</i>	475	< 0.001

*Existe diferencia significativa en el número de aislamientos realizados entre los lugares analizados

**No existe diferencia significativa en el número de aislamientos realizados entre los lugares analizados

DISCUSIÓN

A pesar de que *Basidiobolus sp.* se puede aislar de suelos y detritus en descomposición, se decidió hacerlo a partir de heces de geco, ya que se ha reportado una mayor facilidad de aislamiento de la herpetofauna, lo que ha permitido que algunos investigadores consideren como reservorios para este hongo el tracto gastrointestinal de estos animales (Nelson *et al* 2002).

En Costa Rica la herpetofauna es muy rica y abundante, sin embargo, se seleccionó al geco doméstico para este trabajo, pues aunque es una especie introducida hace unas dos décadas, ha colonizado gran parte del país, debido a su capacidad de colonizar interiores de casas y edificios, ocultándose durante el día y saliendo durante la noche para alimentarse de los insectos que son atraídos por las lámparas (Hernández & Salas 2006; Leenders 2001).

Una de las razones por las que *Hemidactylus frenatus* tiene la capacidad de colonizar nuevas áreas es que las hembras pueden retener esperma viable por más de 8 meses, esto le permite a una única hembra producir al menos 10 huevos fértiles aún en ausencia de un macho. De forma interesante *H. garnotii*, una segunda especie encontrada en Costa Rica, está estrechamente relacionada y es virtualmente indistinguible de *H. frenatus*; aunque puede reproducirse sin copular, o sea son partenogénicas. Esta forma de reproducción da lugar únicamente a hembras (Leenders 2001).

También se ha comprobado que los geocos se diseminan fácilmente, ya sea los adultos o los huevos que son depositados en lugares oscuros como cajas, equipaje, o zapatos, pueden ser transportados de forma pasiva de un lugar a otro, por lo que su dispersión en el territorio nacional ha aumentado en los últimos años (observación personal).

No se sabe si antes este hongo estaba en el país, ya que hasta el año 2000 no hay reportes clínicos de infección ni de aislamientos previos de la naturaleza o herpetofauna autótona de Costa Rica. En el año 2000 se comprobó la presencia de este hongo asociado a geocos de la zona de Caldera, Puntarenas (Sanabria & Espinosa 2000). En otras áreas del mundo se ha comprobado que el hongo fue introducido por animales que provenían de regiones tropicales (Feio *et al* 1999), por lo que se podría sospechar que el hongo fue introducido por este animal.

El método que se utilizó en esta investigación tiene una gran ventaja para el aislamiento de *Basidiobolus* sp., ya que al producir balistosporas, estas son lanzadas a distancia; así, la inoculación de la muestra de heces en la tapa de la placa de Petri, hace que las balistosporas disparadas impacten la superficie del agar, lo cual permite el aislamiento de este hongo, obviando la contaminación bacteriana fecal, que se podría presentar al inocular directamente la muestra en el medio de cultivo o incluso con métodos de dilución de las heces.

Las características morfológicas, tanto macro como microscópicas, de las colonias obtenidas, corresponden con las descritas por otros autores, como Feio *et al.*, quienes en 1999 realizaron un trabajo similar en un zoológico de Antwerp, donde recolectaron muestras de distintos anfibios, reptiles y peces; y al igual que en este trabajo, no se detectó olor a *Streptomyces* en ninguno de los aislamientos realizados, lo cual es consistente con la literatura ya que este olor puede ser inconsistente y variable (Arenas 1993; Larone 1995; Feio *et al* 1999)

Los resultados confirman la presencia de *Basidiobolus* sp. asociado a heces de geos colectados en dos regiones de nuestro país, con clima caliente, como son Nandayure y Guápiles. Sin embargo, en los especímenes capturados en San José no se logró aislar este hongo. Estos resultados se comprobaron estadísticamente por el método Mann-Whitney, donde quedó demostrado claramente que existe diferencia significativa en aislamiento del hongo comparando San José con Nandayure y Guápiles, mientras que no existe diferencia significativa entre Nandayure y Guápiles (Tabla 1 y Anexo 3), por lo que la presencia del hongo se ve afectada por el lugar de procedencia de la muestra.

Esta diferencia podría deberse a las variaciones en las condiciones ambientales y ecológicas que presentan estas zonas, que podrían jugar un papel importante para el desarrollo del hongo. De acuerdo a la literatura, este hongo se ha aislado de todo el mundo, sin embargo, las infecciones en humanos se han limitado a zonas tropicales y subtropicales (Ribes *et al* 2000), donde probablemente podrían encontrarse mayor cantidad de insectos, lo cual indirectamente favorece el desarrollo del hongo en ese ambiente, ya que los insectos podrían ser vectores mecánicos de este microorganismo, pues se puede encontrar en su tracto alimentario o en su cutícula, sin causarles patología (Nelson *et al* 2002). Los insectos son parte del alimento de la herpetofauna, la cual disemina el microorganismo e incluso podría facilitar el contacto del hongo con personas, aumentando el riesgo de infección.

También el solo efecto de la temperatura local podría influir en la presencia del hongo en algunas zonas, ya que como se demostró en este trabajo, *Basidiobolus* sp. presentó un mayor crecimiento a 37°C (40 mm promedio de diámetro) que a 25°C (29 mm promedio de diámetro) y a 42°C (menos de 1 mm promedio de diámetro). En San José la temperatura oscila entre 16,7 – 26,7°C, mientras que en Nandayure es de 22 a 34,9°C y en Guápiles de 18,3 a 32,7°C (IMNCR) (Anexo 2). Está bien comprobado que algunos especies del grupo de los zigomicetes, entre ellos *Basidiobolus* sp., es muy sensible a bajas temperaturas e incluso si un material biológico infectado, como una biopsia o contaminado como las heces con *Basidiobolus*, se guarda por pocas horas en refrigeración, se pierde toda posibilidad de aislar este hongo (Gugnani 1999; Lacaz et al. 2002)

En cuanto a la temperatura debemos de mencionar que de acuerdo a algunos investigadores, la capacidad de crecimiento a 37°C es un requisito esencial para los aislamientos de hongos potencialmente patógenos, pero podría ser dada por simple adaptación (Feio *et al* 1999). Sin embargo, como todos nuestros aislamientos crecieron mejor a 37°C no lo podríamos considerar una simple adaptación, sino más bien como una preferencia, por crecer a temperaturas altas, aún así, podría probarse su capacidad de crecimiento en un ámbito mayor de temperaturas (Fig. 7). Además, se pudo observar que esta diferencia en el crecimiento según la temperatura de incubación de aislamiento es estadísticamente significativa a través del método descriptivo del test de NPar (Wilcoxon Signed Ranks Test) (Ver cuadro 2 en anexos).

En cuanto al papel de los insectos en la diseminación *Basidiobolus* sp. este es controversial, ya que para algunos autores éstos son considerados importantes transportadores y diseminadores del hongo, al acarrearlo en su tracto alimentario o en la cutícula sin ser parasitados (Coremans-Pelseneer, 1974, Emmons *et al* 1957); mientras que otros autores, consideran que su papel no es fundamental, ya que en estudios en donde anfibios han resultados positivos por este hongo, los insectos utilizados para alimentarlos han sido negativos para su aislamiento (Feio *et al* 1999). Por lo que se podría sugerir que la herpetofauna estaría actuando como reservorio de este hongo y al eliminarlo por heces, se facilita la contaminación de insectos en el ambiente; ya que esta comprobado que *Basidiobolus* esporula sobre heces de anfibios y reptiles, y que sus balistosporas tienen la capacidad de adherirse al exoesqueleto de insectos facilitando la colonización (Nelson *et al* 2002).

De las 70 muestras tomadas en Nandayure y de las 15 tomadas en Guápiles, se obtuvieron aislamientos de *Basidiobolus sp.* en proporciones altas (78,6% y 86,7% respectivamente). Estos resultados nos indican que este hongo es un constituyente común del intestino de geckos, lo cual es comparable con el estudio realizado en la Florida, donde el 69% de los animales analizados dieron positivos por el aislamiento de este hongo, siendo más frecuente en los animales de hábitos terrestres que en los arborícolas (Nelson *et al* 2002). Ellos también analizaron las presas más comunes de ambos grupos y concluyen que el tipo de presa que utilizan para alimentarse afecta la frecuencia de la colonización, así los animales que tienen dietas ricas en hormigas, tienen alta frecuencia de colonización de *Basidiobolus sp.* en comparación con los que consumían otros insectos (Nelson *et al* 2002). En este trabajo no se analizó el tipo de dieta de los geckos, sin embargo, se podría analizar e incluso comprobar si este hongo se aísla de otros animales autónomos de Costa Rica y de sus dietas.

En cuanto a la producción de enzimas por parte de los aislamientos de *Basidiobolus* obtenidos en este trabajo, se observó en todas la presencia de hemolisinas, proteasas, fosfolipasas, ureasa y gelatinasa. Estas enzimas son posiblemente usadas por el hongo cuando está en la naturaleza para degradar materiales proteínicos (Feio *et al* 1999). Sin embargo, estas y otras enzimas que pueda producir este hongo, también podrían jugar un papel importante en la patogénesis de la infección, tanto en humanos como en otros animales, e incluso se ha propuesto que pueden ayudar en la digestión de insectos que son consumidos por animales huésped, que tienen el hongo en su tracto digestivo, lo que refuerza la hipótesis de que la asociación huésped-hongo, podría ser mutualista o comensalista (Nelson *et al* 2002).

La capacidad hemolítica del *Basidiobolus sp.* (Fig. 8) se ha observado en aislamiento de casos clínicos humanos y de algunas cepas aisladas de diversos hospederos (Feio *et al* 1999), así como la producción de lipasas, lecitinasas, hialuronidasas, colagenasas, proteinasas, gelatinasa, ureasa y de fosfolipasa (Echetebe & Ononogbu 1982; Okafor & Gugnani 1990; Okafor 1994) también se han reportado para este hongo. Las colagenasas y elastasas destruyen tejido conectivo e intervienen en la formación de la inflamación granulomatosa (Fromentin *et al* 1978). La hialuronidasa destruye ácido hialurónico, facilitando la invasión del microorganismo (Jawetz *et al* 1987), las lipasa degeneran tejidos grasos, las lecitinasas y fosfolipasas destruyen membranas celulares causando necrosis (Echetebe & Ononogbu 1982).

Todas estas enzimas pueden contribuir a explicar el tipo de lesión que se encuentra en la patología producida por este hongo.

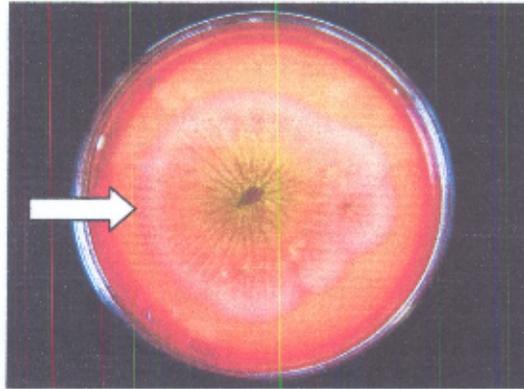


Figura 8. Hemólisis en agar sangre

La actividad proteolítica observada (Fig. 9) es comparable con la descrita en trabajos similares por otros autores como Feio *et al* en 1999 y Okafor *et al* en 1987; que también realizaron pruebas para la detección de otras enzimas como lipasa, amilasa y desoxirribonucleasa, para las cuales no se obtuvo ninguna actividad enzimática.

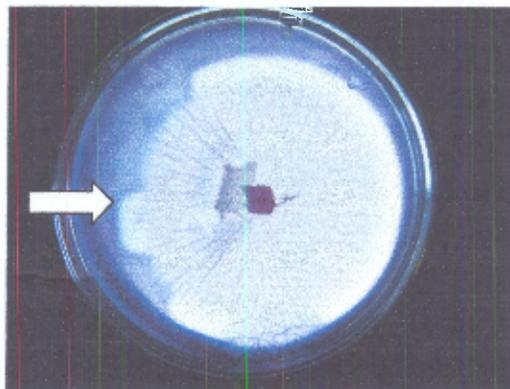


Figura 9. Degradación de proteínas en el agar caseína

El papel de la herpetofauna como reservorio es discutible pues se han presentado casos de infecciones. En un estudio realizado en el Condado de Albany (Wyoming, USA) entre enero 1989 y junio de 1996 se realizó una evaluación postmortem de 278 sapos y en 100 de estos se logró aislar *Basidiobolus* sp. a partir de secciones de la piel abdominal y digital (Taylor *et al* 1999). Histológicamente, observaron la presencia de numerosos elementos fúngicos e hifas en las capas superficiales de la epidermis sin una reacción inflamatoria aparente, similar en morfología a las causadas por *B. ranarum* en sapos canadienses en un trabajo anterior, y en donde aisló el hongo en 30 de 54 (56%) carcasas de sapos analizadas aleatoriamente (Taylor *et al* 1999 a).

En cuanto a las infecciones causadas por este hongo, en Costa Rica, a pesar de ser tropical, no se ha encontrado registros de su presencia, lo cual podría deberse a que no están siendo consideradas en los servicios de diagnóstico (laboratorio clínico y patología) o bien que realmente no se han presentado casos, aunque está comprobado la presencia de este hongo asociado a los geos.

Se debe considerar que la infección subcutánea es más común en personas de corta edad, mientras que las infecciones no subcutáneas se presentan más en personas mayores y están asociadas en estos últimos a la ingesta o inhalación del hongo (Ribes *et al* 2000). Se piensa que variaciones de estos patrones básicos, probablemente reflejan el estado de inmunocompetencia del paciente (Ribes *et al* 2000). Hay que tomar en consideración que la infección no subcutánea se puede confundir con otras patologías, entre ellas el síndrome de Crhon, que parece ser el más común (Prabhul 2004).

Reiteramos que en Costa Rica no se han diagnosticado casos de infección por *Basidiobolus*; aunque se ha comprobado que este hongo está presente en una gran proporción de los geos domésticos estudiados de zonas calientes, como Nandayure y Guápiles. Por esa razón, se sugiere ampliar el estudio a otras posibles zonas del país y a otros hospederos, especialmente a aquellos que están siendo consideradas mascotas, e incluir el aislamiento de *Salmonella*, ya que esta bacteria también es parte de la microbiota intestinal de reptiles, incluyendo geos, serpientes e iguanas (Sanyal *et al* 1997). En este estudio se intentó aislar *Salmonella*, y aunque no se obtuvieron resultados positivos es importante evaluar más esta posibilidad.

Es importante el hecho de que en las áreas donde se logró aislar el hongo se ubican en zonas calientes y donde habita gran cantidad de personas de recursos económicos limitados, cuyas casas son colonizadas fácilmente por los geos, que se han convertido en un habitante frecuente, visto tan naturalmente, que las personas no se

asombran al verlos posados dentro de la casa, cerca de los bombillos eléctricos e incluso, la gente narra que encuentra los huevos de esta lagartija en las gavetas de los muebles de la cocina, lo que ven como algo natural. Por otra parte, los niños que acostumbran a caminar y jugar descalzos dentro y fuera de sus casas, podrían ser víctimas de este hongo que podría infectarles vía traumática en sus pies; también, es importante continuar las pesquisas para buscar *Salmonella* en geocos, como ha sido descrito en otras latitudes.

REFERENCIAS

Anónimo. 1999. Gastrointestinal basidiobolomycosis-Arizona, 1994-1999. MMWR: morbidity & mortality weekly report. 48:22

Arenas R. 1993. Micología Médica Ilustrada. México: Interamericana McGraw-Hill Interamericana. 213-225

Azadeh B., D. McCarthy, A. Dalton & F. Campbell. 2004. Gastrointestinal zygomycosis: two case reports. Blackwell Publishing Ltd, Histopathology. 44: 298

Bigliuzzi C., V. Poletti, D. Dell'Amore, L. Saragoni & T. Colby. 2004. Disseminated Basidiobolomycosis in an Immunocompetent Woman. J Clin Microbiol 42: 1367–1369

(2006, febrero). [Entrevista con el prof. Bolaños, Biólogo de la Universidad de Costa Rica]. Comunicación personal

Brenner FW., RG. Villar, FJ. Angulo, R. Tauxe, & B. Swaminathan. 2000. *Salmonella* Nomenclature. J Clin Microbiol 38: 2465–2467.

Case TJ., DT. Bolger, & K. Petren. 1994. Invasion and competitive displacement among house gecko in the Tropical Pacific. Ecology 75: 464-477.

Canyon DV. & JL. Hii. 1997. The gecko: an environmentally friendly biological agent for mosquito control. Med Vet Entomol 11:319-23.

Chaturvedi V., H. Randhawa, Z. Khan, & S. Navtej. 1984. Prevalence of *Basidiobolus ranarum* Eidam in the intestinal tract of an insectivorous bat *Rhinopoma hardckei* Gray, in death. Sabouraudia: J Med Vet Mycol 22: 185-189

Choonhakarn C. & K. Inthaburan. 2004. Concurrent subcutaneous and visceral basidiobolomycosis in a renal transplant patient. Clin Dermatol 29, 369–372

Coremans-Pelseneer, J. 1974 Biologie des champignons du genre *Basidiobolus* Eidam 1886 saprophytisme et pouvoir pathogène. Acta Zool Pathol Antv 60, 1–143.

Dame EA. 2004. Behavioural mechanisms of invasion and displacement in Pacific island geckos (*Hemidactylus*). Thesis University of South Carolina 44.

Dasgupta L., S. Agarwal, R. Varma, B. Bedi & H. Chatterjee. 1976 Subcutaneous phycomycosis from Pondicherry, South India. Sabouraudia 14: 123–127.

Doctor fungus. 2006. *Basidiobolus* species. En línea: <http://www.doctorfungus.org/thefungi/basidiobolus.htm>
11/13/2006

Echetebe C. & J. Ononogbu. 1982 Extracellular lipase and proteinase of *Basidiobolus haptosporus*: possible role in subcutaneous mycosis. Mycopathologia 80: 171–177.

Emmons C., L. Joe, N. Eng, A. Pohan, S. Kertopati & A. Van der Meulen. 1957. *Basidiobolus* and *Cercospora* from human infections. Mycologia 49: 1–10.

Fromentin H., H. Hurion & F. Mariat. 1978 Collagénase, estérase et élastase de souches pathogène et saprophyte de *Entomophthora coronata*: cinétique de production. Ann Microbiol 129A: 425–431

Feio C., L. Bauwens, D. Swinne, & W. De Meurichy. 1999. Isolation of *Basidiobolus ranarum* from ectotherms in Antwerp zoo with special reference to characterization of the isolated strains. Mycoses 42: 291–296

Gugnani H. C. & J.I. Okafor. 1980. Mycotic flora of the intestine and other internal organs of certain reptiles and amphibians with special reference to characterization of *Basidiobolus* isolates. Mykosen 23: 260–268.

Gugnani H.C. 1999. A review of zygomycosis due to *Basidiobolus ranarum*. Europ J Epidemiol 15: 923-929,

Hernández F. & I. Salas. 2006. El geco doméstico, *Hemidactylus frenatus*: Capacidad escaladora, posibles aplicaciones industriales y riesgo potencial para la salud. Rev Col Microb Quím Clín C R 12: 21-22

Hunsaker D. 1966. Notes on the population expansion of the house gecko, *Hemidactylus frenatus*. Phillip J Science 95: 121-122

Instituto Meteorológico Nacional. 2007. Datos climáticos. San José, Costa Rica.
En línea: http://www.imn.ac.cr/IMN/MainAdmin.aspx?__EVENTTARGET=LinksInfoClimatica

Jawetz E., J.L. Melnick & E.A. Adelberg. 1987 Rev Med Microbiol. California: Lange Medical Publications p 225.

Khan Z., M. Khoursheed, R. Makar, R. Al-waheeb, I. Al-bader, A. Al-muzaini, R. Chandy & A. Mustafal. 2001. *Basidiobolus ranarum* as an Etiologic Agent of Gastrointestinal Zygomycosis. Journal of Clinical Microbiology 39: 2360–2363

Kwon-Chung, K. 1992. Medical Mycology. Lea and Febiger. 447-461

Lacaz C.S., E. Porto, J.E.C. Martins, E.M. Heins-Vaccari & N.T. Melo. Zigomicoses. 2002. In: Lacaz CS (ed) Tratado de Micología Médica, 9th Edition, Sarvier, São Paulo p 761-783

Larone H. 1995. Medically important fungus: a guide to identification (3a. ed.). Washington, DC: ASM Press 105-119

Leenders T. 2001. A Guide to Amphibians and Reptiles of Costa Rica. Zona Tropical Pub p162

Lyon M., J. Smilack, K. Komatsu, M. Pasha, J. Leighton, J. Guarner, T. Colby, M. Lindsley, M. Phelan, D. Warnock & R. Hajjeh. 2001. Gastrointestinal Basidiobolomycosis in Arizona: Clinical and Epidemiological Characteristics and Review of the Literature. Clin Infect Dis 32:1448–55

Maciel L., M. Guimarães, & M. Pinto. 2005. Case report of subcutaneous entomophthoromycosis with retroperitoneal invasion: Relato de caso de entomoforomicose subcutânea com invasão retroperitoneal. Brasil: Rev Soc Brasil Med Trop 38:348-350

Mahaisavariya P., A. Chaiprasert, A. Sivayathorn, & S. Khemngern. 1999. Deep fungal and higher bacterial skin infections in Thailand: clinical manifestations and treatment regimens. Int J Dermatol 38, 279–284

Mahon C. & G. Manuselis. Textbook of diagnostic microbiology (2a. ed.). Saunders Company 479-485

Manual Merck. 1999. (10° Edic. Edición de centenario) Transtornos gastrointestinales: Hemorragia gastrointestinal. Cap. 22, Sección 3

Mathew R., S. Kumaravel, S. Kuruvilla, R. G'boy, D. Shashikala, S. Srinivasan & M. Mani. 2005 Successful treatment of extensive basidiobolomycosis with oral itraconazole in a child. Int J Dermatol 44: 572–575

Miller R. & G. Turmwald. 1984. Disseminated basidiobolomycosis in a dog. Vet Pathol 21: 117-119

Nelson R., B. Cochrane, P. Delis, & D. TeStrakel. 2002. Basidioboliasis in Anurans in Florida. J Wildlife Dis 38: 463–467

Okafor J.I. & H.C. Gugnani. 1990 Lipase activity of *Basidiobolus* and *Conidiobolus* species. Mycoses 33: 81–85.

Okafor J.I.. 1994 Purification and characterization of protease enzymes of *Basidiobolus* and *Conidiobolus* species. Mycoses. 37: 265–269.

Pasmans F., A. Martel, F. Boyen, D. Vandekerchove, I. Wybo, F. Van Immerseel, M. Heyndrickx, J.M. Collard, R. Ducatelle & F. Haesebrouck. 2005. Characterization of *Salmonella* isolates from captive lizards. *Vet Microbiol* 110: 285–291.

Petren K. & T.J. Case. 1998. Habitat structure determines competition intensity and invasion success in gecko lizards. *Proc Natl Acad Sci* 95: 11739–11744.

Prabhul R. & R. Patel. 2004. Mucormycosis and entomophthoramyiasis: a review of the clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Microb Infect Dis* 10: 31–47

Prescott L., J. Harley & D. Klein. 2004. *Microbiología* (5a. ed.) España: McGraw-Hill Interamericana p1010

Ramires E.N. & G.M. Fraguas. 2004. Tropical house gecko (*Hemidactylus mabouia*) predation on brown spiders (*Loxosceles intermedia*) *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* 10:185-190.

Reporter R., Q. Phan & P. Tiffani. 2003. Reptile-Associated Salmonellosis — Selected States, 1998–2002. *MMWR* 52:1206-1209.

Ribes J., C. Vanover-Sams & J. Baker. 2000. Zygomycetes in human disease. *Clin Microbiol Rev* 13: 236-301

Rippon J. 1990. *Micología Médica*. México: Nueva Editorial Interamericana S.A. 735-748

Rodríguez J. 1998. *Micología Médica*. Costa Rica: Editorial de la Universidad de Costa Rica 279-296

Sanabria-Romero G. & R. Espinosa-Alvarado. 2000. Aislamiento de *Basidiobolus* sp. en heces de lagartijas de la especie *Hemidactylus frenatus*. Trabajo de Graduación, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

Sanyal D., T. Douglas & R. Roberts. 1997. *Salmonella* infection acquired from reptilian pets. Arch Dis Childhood 77:345–346

Smilack J. 1998. Gastrointestinal Basidiobolomycosis. Clin Infec Dis: Correspondence. 27 (September), 663

Speare R. & A. Thomas. 1985. Kangaroos and wallabies as carriers of *Basidiobolus haptosporus*. Austral Vet J 62: 209-210

Taylor S., E.W. Williams & K. Mills. 1999. Experimental exposure of canadian toads to *Basidiobolus ranarum*. J Wildlife Dis 35: 58–63

Taylor S., E. Williams, T. Thorne, K. Mills, D. Withers & A. Pier. 1999. Causes of mortality of the wyoming toad. J Wildlife Dis 35: 49–57

Taylor S., E.W. Williams & K. Mills. 1999a. Mortality of Captive Canadian Toads from *Basidiobolus ranarum* Mycotic Dermatitis. J Wildlife Dis: Short communications 35: 64–69

Zavasky M., W. Samowitz & T. Loftus. 1999. Gastrointestinal Zygomycotic Infection Caused by *Basidiobolus ranarum*: Case Report and Review. Clin Infec Dis 28:1244–8

Anexo 1

Medios de cultivo

Agar Caseína

40 g de leche en polvo descremada

5 g de extracto de levadura

15 g de agar

1 ml de BCP al 1% en alcohol

1000 ml de agua

Ajustar el pH a 7,0

Autoclavar 10 minutos a 121°C

Agar yema de huevo

Medio Sabouraud

1 M NaCl

0.005 M CaCl₂

Autoclavar 10 minutos a 121°C

Agregar 2% de yema de huevo

Agregar 4.5 ml en placas de petri pequeñas

Anexo 2

Cuadro 1. Temperaturas del año 2006 para el cantón de Nicoya.

Fuente IMNCR

La Ceiba

Estación: 151, La Ceiba

Cantón: Nicoya

Ubicación: 10°06 N; 85°19 O; 20m

Tipo: Automática

Cantidad: 5 AÑOS

Fecha final: 31/12/2006

Mes	Temperatura media ° C		Precipitación total media (mm)	Promedio de días con lluvia
	Mínimo diario	Máximo diario		
Ene	20,7	35,1	1,0	0
Feb	21,4	36,2	3,2	1
Mar	22,1	37,0	2,8	2
Abr	23,1	36,9	7,8	4
May	22,7	36,6	86,2	18
Jun	22,3	34,4	84,4	19
Jul	22,2	34,4	54,4	16
Ago	22,2	34,1	65,2	17
Set	22,0	33,6	145,2	26
Oct	21,9	33,1	112,4	24
Nov	21,5	33,0	57,2	12
Dic	21,7	33,9	5,5	2

Cuadro 2. Temperaturas del año 2006 para el cantón de San José.

Fuente IMNCR

Aranjuez

Estación: 141, Aranjuez

Cantón: San José

Ubicación: 09°56 N; 84°05 O; 1172m

Tipo: Automática

Cantidad: 9 AÑOS

Fecha final: 31/12/2006

Mes	Temperatura media ° C		Precipitación total media (mm)	Promedio de días con lluvia
	Mínimo diario	Máximo diario		
Ene	14,8	25,8	16,0	4
Feb	15,0	26,2	17,7	3
Mar	15,6	27,5	13,5	4
Abr	16,0	27,3	38,0	7
May	17,0	27,5	225,9	19
Jun	16,9	27,2	225,6	19
Jul	16,6	26,9	196,2	20
Ago	16,8	27,1	202,9	22
Set	16,6	27,1	302,5	21
Oct	16,4	26,5	265,6	20
Nov	16,1	26,0	143,9	19
Dic	15,4	25,6	38,6	8

Cuadro 3. Temperaturas del año 2006 para el cantón de Pococí.

Fuente IMNCR

La Rita

Estación: 125, La Rita

Cantón: Pococí

Ubicación: 10°15 N; 83°46 O; 125m

Tipo: Automática

Cantidad: 7 AÑOS

Fecha final: 31/12/2006

Mes	Temperatura media ° C		Precipitación total media (mm)	Promedio de días con lluvia
	Mínimo diario	Máximo diario		
Ene	16,4	31,7	178,3	23
Feb	16,1	32,2	126,7	19
Mar	17,0	32,6	122,7	20
Abr	17,4	32,8	127,4	20
May	19,3	33,5	178,7	25
Jun	19,8	33,0	158,6	26
Jul	19,6	32,5	161,7	26
Ago	19,6	33,1	150,7	26
Set	19,6	33,6	87,6	22
Oct	19,5	32,9	124,0	26
Nov	18,3	32,4	176,7	23
Dic	17,4	31,5	235,1	24

Анехо 3

Cuadro 1. Análisis estadístico Mann-Whitney comparando el número de aislamientos realizados entre San José y Guápiles.

Ranks

	LUGAR	N	Mean Rank	Sum of Ranks
PRESENCI	San José	20	11,50	230,00
	Guápiles	15	26,67	400,00
	Total	35		

Test Statistics^b

	PRESENCI
Mann-Whitney U	20,000
Wilcoxon W	230,000
Z	-5,176
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: LUGAR

Cuadro 2. Análisis estadístico Mann-Whitney comparando el número de aislamientos realizados entre San José y Nandayure

Ranks

	LUGAR	N	Mean Rank	Sum of Ranks
PRESENCI	San José	20	18,50	370,00
	Nandayure	70	53,21	3725,00
	Total	90		

Test Statistics^a

	PRESENCI
Mann-Whitney U	160,000
Wilcoxon W	370,000
Z	-6,176
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000

a. Grouping Variable: LUGAR

Cuadro 3. Análisis estadístico Mann-Whitney comparando el número de aislamientos realizados entre Guápiles y Nandayure.

Ranks

	LUGAR	N	Mean Rank	Sum of Ranks
PRESENCI	Guápiles	15	46,33	695,00
	Nandayure	70	42,29	2960,00
	Total	85		

Test Statistics^a

	PRESENCI
Mann-Whitney U	475,000
Wilcoxon W	2960,000
Z	-,814
Asymp. Sig. (2-tailed)	,415

a. Grouping Variable: LUGAR

Cuadro 4. Análisis estadístico NPar (Wilcoxon Signed Ranks Test) comparando el crecimiento promedio en milímetros según temperatura de incubación.

Test Statistics^c

	CREC35 - CREC20	CREC42 - CREC35	CREC42 - CREC20
Z	-4,377 ^a	-4,805 ^b	-4,630 ^b
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000

a. Based on negative ranks.

b. Based on positive ranks.

c. Wilcoxon Signed Ranks Test

Cuadro 5. Análisis estadístico descriptivo de los aislamientos según temperatura de incubación

Descriptive Statistics

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
CREC20	28	17	40	29,07	5,48
CREC35	28	37	40	39,79	,79
CREC42	28	0	3	,46	,84
Valid N (listwise)	28				