



MINISTERIO DE SALUD  
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD



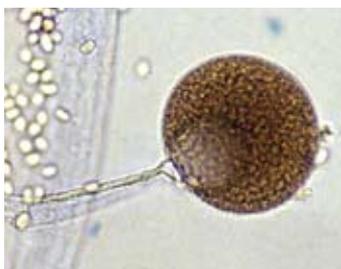
---

---

# MANUAL DE PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS DE LABORATORIO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LOS PRINCIPALES HONGOS OPORTUNISTAS CAUSANTES DE MICOSIS HUMANAS

---

---



SERIE DE NORMAS TÉCNICAS N.º 44

Lima, 2007

# MINISTERIO DE SALUD DEL PERÚ

## MINISTRO

Dr. Carlos Vallejos Sologuren

## VICEMINISTRO

Dr. José Calderón Yberico

---

## INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

### JEFA

Dra. Patricia J. García Funegra

### SUBJEFE

Dr. Rubén Espinoza Carrillo

---

#### CENTRO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

Director General

Dr. Luis Fuentes Tafur

#### CENTRO NACIONAL DE CONTROL DE CALIDAD

Director General

Q.F. Alberto Valle Vera

#### CENTRO NACIONAL DE PRODUCTOS BIOLÓGICOS

Directora General

Dra. Silvia Pessah Eljay

#### CENTRO NACIONAL DE SALUD INTERCULTURAL

Director General

Dr. Neptalí Cueva Maza

#### CENTRO NACIONAL DE ALIMENTACIÓN Y NUTRICIÓN

Directora General

Mg. María Inés Sánchez-Griñán

#### CENTRO NACIONAL DE SALUD OCUPACIONAL Y PROTECCIÓN DEL AMBIENTE PARA LA SALUD

Director General

Dr. Luis Santamaría Juárez

---

## COMITÉ EDITOR INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

### PRESIDENTE

Dr. César Cabezas Sánchez

### MIEMBROS

Dr. Pedro Álvarez Falconí  
Blg. Ana Barrientos Tejada  
Q.F. Rosario Belleza Zamora  
Dr. Zuño Burstein Alva  
Dra. Patricia Caballero Ñopo  
Dr. Walter Curioso Vilchez  
Dr. Manuel Espinoza Silva  
Ing. Fernando Farfán Rocha

Dr. Claudio Lanata de las Casas  
Dr. Percy Mayta Tristán  
Mg. Mercedes Ochoa Alencastre  
Mg. Graciela Rengifo García  
Dr. Miguel Salcedo Luna  
Blg. Silvia Seraylan Ormaechea  
Dr. Javier Vargas Herrera  
Q.F. Diana Vergara Nuñez

### ASISTENTE EDITORIAL

Lic. Melissa Daga Caycho

### CORRECTOR DE ESTILO

Daniel Cárdenas Rojas



MINISTERIO DE SALUD  
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD



# MANUAL DE PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS DE LABORATORIO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LOS PRINCIPALES HONGOS OPORTUNISTAS CAUSANTES DE MICOSIS HUMANAS

## **Elaboración:**

Miriam Guevara Robles  
Bióloga  
Laboratorio de Micología  
Centro Nacional de Salud Pública  
Instituto Nacional de Salud

Flor Urcia Ausejo  
Bióloga  
Laboratorio de Micología  
Centro Nacional de Salud Pública  
Instituto Nacional de Salud

José Casquero Cavero  
Biólogo. Magíster en Microbiología.  
Laboratorio de Micología.  
Centro Nacional de Salud Pública  
Instituto Nacional de Salud

Lima, 2007

Los autores agradecen a Alida Navarro Mariñas por su valiosa colaboración.

Catalogación hecha por el Centro de Documentación e Información del INS

Guevara Robles, Miriam; Urcia Ausejo, Flor y Casquero Cavero, José  
Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación  
de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas /  
Elaborado por Miriam Guevara Robles : Flor Urcia Ausejo y José Casquero  
Cavero. -- Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 2007.  
100 p. : 21 x 14,5 cm. -- (Serie de Normas Técnicas; 44)

1. MICOSIS 2. INFECCIONES OPORTUNISTAS 3. CANDIDA ALBICANS  
4. ASPERGILLUS FUMIGATUS 5. CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS  
6. TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO

- I. Guevara Robles, Miriam
- II. Urcia Ausejo, Flor
- III. Casquero Cavero, José
- IV. Instituto Nacional de Salud (Perú)
- V. Perú. Ministerio de Salud

ISBN: 978-9972-857-62-1

ISSN 1607 - 4904

Hecho el Depósito Legal en la Biblioteca Nacional del Perú N.º: 2007-08290

© Ministerio de Salud, 2007

Av. Salaverry cuadra 8 s/n, Jesús María, Lima, Perú

Teléfono: (511) 431-0410

Telefax: 01 - 3156600 anexo 2669

Página Web: [www.minsa.gob.pe](http://www.minsa.gob.pe)

© Instituto Nacional de Salud, 2007

Cápac Yupanqui 1400, Jesús María, Lima, Perú

Teléfono: (511) 471-9920 Fax 471-0179

Correo electrónico: [postmaster@ins.gob.pe](mailto:postmaster@ins.gob.pe)

Página Web: [www.ins.gob.pe](http://www.ins.gob.pe)

Publicación aprobada con R.J. N.º 356-2007-J-OPD-INS

Se autoriza su reproducción total o parcial, siempre y cuando se cite la fuente

Forma de citación sugerida:

Guevara M, Urcia F, Casquero J. Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas. Lima: Instituto Nacional de Salud; 2007. Serie de Normas Técnicas N.º 44.

*Índice*

INTRODUCCIÓN.	5
SECCIÓN 1: GENERALIDADES.	7
1.1    OBJETIVO.	9
1.2    CAMPO DE APLICACIÓN.	9
1.3    REFERENCIAS.	9
1.4    DEFINICIONES.	12
1.5    RESPONSABILIDADES.	14
SECCIÓN 2: PROCEDIMIENTOS PARA OBTENCIÓN, TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS.	15
2.1    MUESTRA DE SANGRE PARA HEMOCULTIVO.	17
2.2    MUESTRA DE ORINA PARA CULTIVO.	18
2.3    MUESTRA DE BIOPSIA.	19
2.4    MUESTRA DE ESPUTO Y SECRECIONES BRONQUIALES.	20
2.5    MUESTRA DE CATÉTER INTRAVASCULAR	22
2.6    MUESTRA DE EXUDADO PERICATÉTER.	22
2.7    MUESTRA DE LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO.	23
SECCIÓN 3: PROCEDIMIENTOS PARA EL DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO.	25
3.1    EXAMEN DIRECTO (KOH, TINTA CHINA, COLORACIÓN GIEMSA, COLORACIÓN GRAM).	27
3.2    CULTIVO DE MUESTRA DE SANGRE.	28
3.3    CULTIVO DE MUESTRA DE ORINA.	29
3.4    CULTIVO DE BIOPSIA.	30
3.5    CULTIVO DE CATÉTER Y EXUDADO DE PERICATÉTER.	31
3.6    CULTIVO DE ESPUTO Y SECRECIONES BRONQUIALES.	32
3.7    CULTIVO DE LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO.	32
SECCIÓN 4: IDENTIFICACIÓN DE PRINCIPALES LEVADURAS.	35
4.1    IDENTIFICACIÓN DE <i>Candida albicans</i> , <i>Candida no albicans</i> , <i>Rhodotorula rubra</i> , <i>Trichosporon spp</i> , <i>Geotrichum spp</i> y <i>Cryptococcus neoformans</i>	
4.2    IDENTIFICACIÓN DE <i>Malassezia furfur</i>	56

SECCIÓN 5:	IDENTIFICACIÓN DE PRINCIPALES HONGOS FILAMENTOSOS.	59
	IDENTIFICACIÓN DE <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Scedosporium apiospermum</i> , <i>Mucor spp.</i> <i>Rhizopus oryzae</i> y <i>Absydia corymbifera</i> .	61
ANEXOS		73
ANEXO A	TÉCNICA DE LISIS CENTRIFUGACIÓN.	75
ANEXO B	PREPARACIÓN DE REACTIVOS.	77
ANEXO C	PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.	83
ANEXO D	CLAVE N.º 1 : CLAVE PARA IDENTIFICAR <i>Trichosporon spp.</i>	91
	CLAVE N.º 2 : CLAVE MORFOLÓGICA PARA IDENTIFICAR <i>Geotrichum spp.</i>	92
	CLAVE N.º 3 : CLAVE FISIOLÓGICA PARA IDENTIFICAR <i>Geotrichum spp.</i>	92
ANEXO E	FLUJOGRAMA DE IDENTIFICACIÓN N.º 1. <i>Trichosporon spp.</i> y <i>Geotrichum spp.</i>	93
ANEXO F	TABLA N.º 1: CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y FISIOLÓGICAS DE PRINCIPALES LEVADURAS DE IMPORTANCIA EN SALUD PÚBLICA.	96
	TABLA N.º 2: CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE PRINCIPALES LEVADURAS DE IMPORTANCIA EN SALUD PÚBLICA.	97
	TABLA N.º 3: CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DE <i>Malassezia furfur</i> y <i>M. pachydermatis</i> CAUSANTES DE INFECCIÓN SISTÉMICA.	98
	TABLA N.º 4: CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE <i>Trichosporon sp.</i>	99
	TABLA N.º 5: CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DE ESPECIES DE <i>Geotrichum sp.</i>	99
	TABLA N.º 6: CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LAS PRINCIPALES ESPECIES DE <i>Aspergillus sp.</i>	100

---

## *Introducción*

Durante la última década se ha observado un incremento de las enfermedades micóticas, sobre todo las de tipo oportunista, ello ha significado la aparición de nuevas formas clínicas de micosis así como localizaciones o presentaciones no habituales, además de la presencia de nuevas especies fúngicas consideradas antiguamente como no patógenas pero que excepcionalmente producían enfermedad en individuos inmunodeprimidos.

Diversos factores han permitido la aparición de infecciones emergentes: cambios poblacionales y sus patrones de costumbres, avances tecnológicos y desarrollo económico de algunos países, que ha permitido la generalización de tratamientos médicos quirúrgicos invasivos, con supervivencia de enfermos que difícilmente superaban procesos patológicos y que favorecen el desarrollo de micosis sistémicas; incremento de viajes inter y transcontinentales, nuevos mecanismos de adaptación de algunos microorganismos que conlleva a la aparición de resistencia a los antifúngicos e infección por VIH. Actualmente se reconocen entre 300 y 400 especies de hongos causantes de micosis sistémicas, las cuales constituyen un pequeño porcentaje del total de más de 100 000 especies catalogadas. Por todo ello se prefiere mencionar un “comportamiento oportunista” por parte del hongo, debido a que los patógenos primarios al infectar a individuos inmunosuprimidos, se comportan con mayor agresividad, originando infecciones sistémicas, diseminadas, de evolución aguda y mal pronóstico.

En este tipo de micosis es necesario considerar al binomio huésped - parásito. Las infecciones oportunistas se producen cuando los mecanismos de defensa específicos e inespecíficos del hospedero son ineficaces, mientras que las sistémicas o diseminadas se producen cuando fallan los mecanismos celulares de defensa en los neutrófilos.

La mayoría de las micosis oportunistas siguen siendo

ocasionadas por las especies clásicas: *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*. Sin embargo, por las razones expuestas anteriormente han emergido nuevos hongos oportunistas.

El Instituto Nacional de Salud como entidad técnica normativa en procedimientos de laboratorio pone a disposición del personal del sector, el MANUAL DE PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS DE LABORATORIO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LOS PRINCIPALES HONGOS CAUSANTES DE MICOSIS OPORTUNISTAS, cuyo objetivo es establecer los procedimientos de laboratorio para la identificación de las principales especies de levaduras y hongos filamentosos pertenecientes a los géneros: *Candida spp.*, *Rhodotorula rubra*, *Geotrichum spp.*, *Trichosporon spp.*, *Cryptococcus neoformans*, *Malassezia furfur*, *Aspergillus spp.*, *Fusarium solani*, *Scedosporium apiospermum*, *Mucor spp.*, *Rhizopus oryzae* y *Absidia corymbifera*.

Este documento técnico representa el esfuerzo del personal del laboratorio de micología de la institución.

# SECCIÓN 1

*Generalidades*



# GENERALIDADES

## 1.1. OBJETIVO

Establecer los procedimientos de laboratorio para realizar el aislamiento e identificación de los principales hongos emergentes y reemergentes de importancia médica como: *Candida albicans* y *C. no albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Rhodotorula rubra*, *Geotrichum spp.*, *Trichosporon spp.*, *Aspergillus spp.*, *Malassezia furfur*, *Scedosporium apiospermum*, *Mucor spp.*, *Rhizopus oryzae*, *Fusarium solani* y *Absidia corymbifera*.

## 1.2. CAMPO DE APLICACIÓN

El presente manual es aplicable a las entidades que conforman el sistema nacional de la red de laboratorios.

## 1.3. REFERENCIAS

- 1.3.1. Instituto Nacional de Salud. Manual de procedimientos de laboratorio para la obtención y envío de muestras (I). Lima: Instituto Nacional de Salud; 1995. Serie de Normas Técnicas N.º 15.
- 1.3.2. Instituto Nacional de Salud. Bioseguridad en laboratorios de ensayo, biomédicos y clínicos. 3<sup>ra</sup> ed. Lima: Instituto Nacional de Salud; 2005. Serie de Normas Técnicas N.º 18.
- 1.3.3. Instituto Nacional de Salud. Manual de procedimientos bacteriológicos en infecciones intrahospitalarias. Lima: Instituto Nacional de Salud; 2001. Serie de Normas Técnicas N.º 28.
- 1.3.4. Negrón R, Guelfand L. Manual de procedimientos para laboratorios de micología médica. Acta Bioquímica

- Clínica Latinoamericana 1999 – Suplemento 1. Buenos Aires: Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires; 1999.
- 1.3.5. Campbell M, Stewart J. Processing of individual specimens. En: *The Medical Mycology Handbook*. New York: John Wiley & Sons; 1980. p. 139 - 40.
- 1.3.6. Koneman E, Roberts G. *Micología. Práctica de laboratorio*. 3<sup>ra</sup> ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1992.
- 1.3.7. Pemán J, Martín-Mazuelos E, Rubio-Calvo MC. Guía práctica. Identificación y diagnóstico en micología médica. *Revista Iberoamericana de Micología*; 2001.
- 1.3.8. Arango M, Castañeda E. *Micosis humanas. Procedimientos diagnósticos. Exámenes directos*. Bogotá: Corporación para Investigaciones Biológicas e Instituto Nacional de Salud; 1995.
- 1.3.9. Ballesté R, Salvatella R. *Manual de toma de muestra para estudio bacteriológico, parasitológico y micológico. Selección, recolección, conservación y transporte*. Montevideo: Departamento de Laboratorio Clínico. Hospital de Clínicas. Facultad de Medicina; 2004.
- 1.3.10. López Martínez R, Méndez L, Hernández F, Castañón R. *Micología médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio*. Mexico DF: Editorial Trillas; 1995.
- 1.3.11. Torres - Rodríguez, J. Nuevos hongos patógenos oportunistas emergentes. *Rev. Iberoam. Micol.* 1996. 13: S30 - S38.
- 1.3.12. Hazen K. New and emerging yeast pathogens. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8(4): 462-78.
- 1.3.13. Sullivan D, Coleman D. Minireview *Candida dubliniensis*: Characteristics and Identification. *J Clin Microbiol* 1998; 36(2): 329-34.
- 1.3.14. Fridkin S, Jarvis W. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9(4): 499-511.
- 1.3.15. Casquero J, Zurita S. *Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de micosis oportunistas*

- y profundas. Lima: Instituto Nacional de Salud; 1997. Serie de Normas Técnicas N.º 23.
- 1.3.16. Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. Atlas clinical of fungi. 2<sup>nd</sup> ed. Reus: Universitat Rovira I Virgili; 2000.
  - 1.3.17. San Juan R, Berenguer J, Aguado JM. Hongos filamentosos emergentes: *Scedosporium* [documento en internet]. España; 2004. Disponible en: [www.seimc.org/control/revi\\_Mico/pdf/Honemerg.pdf](http://www.seimc.org/control/revi_Mico/pdf/Honemerg.pdf)
  - 1.3.18. Crespo V, Ojeda A, Vera A, Crespo A, Sánchez F. Aislamiento e identificación de *Malassezia* spp. en pitiriasis versicolor, dermatitis seborreica y piel sana. Rev Iberoam Micol 199; 16: 16-21.
  - 1.3.19. Giusiano GE. Malassezia. Estado del conocimiento y perspectivas en su estudio. Rev Argent Microbiol 2006; 38(1): 41-48.
  - 1.3.20. Guillot J, Guého E, Lesourd M, Midgley G, Chévrier G, Dupont B. Identification of *Malassezia* species. A practical approach. J. Mycol Med 1996; 6: 103-10.
  - 1.3.21. Guého E, Midgley G, Guillot J. 1996. The genus *Malassezia* with description of four new species. Antonie van Leeuwenhoek 1995; 69: 337-55.
  - 1.3.22. Haley L, Callaway C. Laboratory methods in medical mycology. Atlanta: U.S. Department of Health, Education and Welfare. Public Health Service. CDC; 1978.
  - 1.3.23. Bodey G. Candidiasis. Pathogenesis, diagnosis, and treatment. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Raven Press; 1993.
  - 1.3.24. Laszlo A, Weyer K, Barrera L, Balandrano S, Ridderhof J, Smithwick R, et al. Baciloscopía directa de BAAR. Un programa de capacitación para laboratorios. Atlanta: OMS/UICTER/CDC/OPS/INDRE/APHL; 2000.
  - 1.3.25. Canelo C. Determinación de las variedades *neoformans* y *gattii* en cepas de *Cryptococcus* de origen clínico conservadas en el Instituto Nacional de Salud. [Tesis para optar el título profesional de biólogo con mención en microbiología y parasitología]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 1999.

## 1.4. DEFINICIONES

- 1.4.1. Hemocultivo: cultivo microbiológico de la sangre.
- 1.4.2. Levadura: hongo unicelular redondeado u ovoide que se reproduce sexual o asexualmente.
- 1.4.3. Hongo: organismo eucariote que pertenece al reino fungi.
- 1.4.4. Hifas cenocíticas: hifas no septadas o no tabicadas.
- 1.4.5. Hifas: elemento estructural fundamental de los hongos, puede ser unicelular como las levaduras o pluricelular adoptando la forma de filamento septado o aseptado. El conjunto de hifas forma el micelio.
- 1.4.6. Cápsula: envoltura hialina y gelatinosa que rodea a una célula, formada generalmente de polisacáridos.
- 1.4.7. Candidiasis diseminada: infección producida por el género *Candida* que se expande a diversos órganos.
- 1.4.8. Blastoconidia: conidio holoblástico que se produce en forma solitaria, sincronógena o en cadenas.
- 1.4.9. Pseudomicelio: conjunto de pseudohifas.
- 1.4.10. Tubo germinativo: primordio hifal a partir de un conidio.
- 1.4.11. Clamidoconidio: conidio tálico, redondo de pared gruesa y de gran tamaño, producido por modificación de una célula hifal preexistente, considerada de reproducción o de resistencia. También se le denomina como clamidospora.
- 1.4.12. Arthroconidias: conidio tálico producido por fragmentación de la hifa y que se libera por un proceso de rexólisis o de esquizólisis.
- 1.4.13. Hongos filamentosos: hongos de aspecto algodonoso que en general se desarrollan como saprofitos.
- 1.4.14. Macroconidia: el mayor de dos tipos de conidios producidos de la misma manera por el mismo hongo. Este conidio presenta un tamaño mayor de cinco micras y que generalmente tiene septos.
- 1.4.15. Fíalide: estructura conidiógena generalmente en forma de botella en la cual se producen los conidios en forma

basípeta; el primer conidio es holoblástico y los siguientes son enteroblásticos.

- 1.4.16. Conidio: propágulo originado por un proceso de reproducción asexual.
- 1.4.17. Conidióforo: hifa especializada sobre la cual se originan directa o indirectamente los conidios.
- 1.4.18. Esclerote: masa densa de hifas o pseudoparénquimas que forma una unidad reproductora.
- 1.4.19. Métula: rama estéril situada debajo de las fiálides en los géneros *Aspergillus sp.* y *Penicillium sp.*
- 1.4.20. Esporodoquio: estructura análoga a los apotecios, pero productora de conidios.
- 1.4.21. Dematiáceo: hongo provisto de pigmento marrón oscuro o negro, perteneciente a la familia dematiaceae.
- 1.4.22. Anélide: célula conidiógena generalmente en forma de botella, caracterizada por presentar una cicatriz en forma de anillo después de cada conidiación.
- 1.4.23. Esporangióforo: hifa especializada portadora de un esporangio.
- 1.4.24. Esporangio: estructura generalmente vesiculosa que contiene a las esporangiosporas.
- 1.4.25. Apófisis: parte abultada de un esporangióforo inmediatamente por debajo de la columnela.
- 1.4.26. Estolón: hifa horizontal al sustrato, presente en los mucorales, que comunica a dos esporangióforos y de la cual se pueden originar los rizoides.
- 1.4.27. Rizoide: rama corta y delgada de un talo semejante a una raíz vegetal.
- 1.4.28. Rexólisis: con referencia a la secesión conidial, ruptura circuncisial de la pared celular por debajo del septo basal del conidio. La ruptura puede resultar por tensión mecánica, actividad litica, enzimática o ambas.
- 1.4.29. Esquizolisis: proceso enzimático de separación conidial conidio-célula conideógena o conidio-conidio, a través de la fisión de un septo doble.

- 1.4.30 Holoblástico: reproducción asexual por blastoconidios que involucra a toda la hongo a través de un proceso blástico.
- 1.4.31 Enteroblástico: conidio producido por un proceso blástico en donde sólo participa la pared del hongo.
- 1.4.32 Reproducción asexual: multiplicación celular por mitosis y que en los hongos da por resultado la producción de conidios.
- 1.4.33 Apotecio: ascocarpo abierto plano o en forma de copa.

## 1.5. RESPONSABILIDADES

- 1.5.3. La Jefatura del INS, aprueba el presente MANUAL DE PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS DE LABORATORIO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LOS PRINCIPALES HONGOS OPOR- TUNISTAS CAUSANTES DE MICOSIS HUMANAS, mediante resolución jefatural.
- 1.5.4. La Oficina General de Información y Sistemas, supervisa la elaboración, revisión y actualización del presente pro- cedimiento.
- 1.5.5. El director general del CNSP, supervisa la aplicación del presente procedimiento en la unidad orgánica a su cargo.
- 1.5.6. El director ejecutivo de la dirección ejecutiva de enfer- medades transmisibles cumple y hace cumplir lo esta- blecido en este procedimiento.
- 1.5.7. El personal profesional y técnico del laboratorio de mi- cología del CNSP, elaboran el presente procedimiento.
- 1.5.8. Autorizada la publicación e impresión del presente procedimiento, la DG - CNSP, difundirá el documento a los integrantes del sistema nacional de la red de laboratorios.
- 1.5.9. Los responsables de los establecimientos de salud son los encargados de disponer, supervisar y designar al personal calificado para aplicar las disposiciones esta- blecidas en el presente procedimiento.
- 1.5.10. El personal designado debe de aplicar las instrucciones contenidas en el presente procedimiento.

## SECCIÓN 2

*Procedimientos  
para obtención,  
transporte y  
conservación de  
muestras*



# PROCEDIMIENTOS PARA OBTENCIÓN, TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS

Un adecuado proceso de obtención de especímenes clínicos permitirá el establecimiento definitivo del diagnóstico por parte del laboratorio al recuperar e identificar al agente etiológico. Todas las muestras deben de transportarse en recipientes herméticos que impidan la contaminación del personal y medio ambiente en caso de derrame.

## **2.1. OBTENCIÓN, TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE MUESTRA DE SANGRE PARA HEMOCULTIVO**

- 2.1.1. Revisar el “Manual de procedimientos de laboratorio para la obtención y envío de muestras (I)”. Serie de Normas Técnicas N.º 15. 2da ed. 1997. Capítulo II. 2.2 Procedimiento de obtención de sangre mediante uso de jeringa, p. 17 - 9.
- 2.1.2. Considerar las medidas de asepsia al obtener la muestra, para evitar contaminaciones en los hemocultivos.
- 2.1.3. En el caso de adultos recoger de dos a tres muestras de 8 a 9 mL de sangre venosa de diferentes punciones y separadas por 30 minutos o una hora entre sí. En el caso de niños, obtener un sólo espécimen de 1 a 5 mL, en lactantes 1 a 2 mL y neonatos de 0,5 a 1 mL.
- 2.1.4. La técnica de extracción en el sistema de lisis centrifugación es similar, pero hay que considerar las especificaciones del fabricante. Para los niños, existen comercialmente tubos pediátricos (Isolator 1,5®).

- 2.1.5. Obtenida la muestra de sangre, ésta debe de ser inoculada de inmediato en el sistema de hemocultivo que el laboratorio trabaja.

## **2.2. OBTENCIÓN, TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE MUESTRA DE ORINA PARA CULTIVO**

- 2.2.1. Revisar el “Manual de procedimientos bacteriológicos en infecciones intrahospitalarias”. Serie de Normas Técnicas N.º 28. Sección 3.3. Obtención de muestra de orina para cultivo.
- 2.2.2. Se recomienda colectar en un recipiente de boca ancha, con tapa rosca y estéril un volumen no menor a 10 mL hasta 20 a 25 mL para un adecuado estudio micológico.
- 2.2.3. El paciente debe retener la orina por lo menos tres horas. La primera parte de la micción se elimina, por contener flora de arrastre de la porción distal de la uretra, de la misma forma desechar la parte final, por su escaso contenido microbiano.

Se recoge la parte media de la micción matinal, la más representativa del estado de las vías urinarias y la más idónea para el cultivo.

Este tipo de procedimiento lo realiza el paciente, quien previamente debe de realizar la limpieza de sus genitales con agua y jabón.

- 2.2.4. En el caso de los varones deben de retraer el prepucio y las mujeres separar los labios para evitar contaminación exógena.
- 2.2.5. En el caso de que la obtención de muestra se realice a través de la instalación de un catéter o sonda vesical, realizarlo previa higiene del meato uretral y genitales externos. Este método de obtención es el adecuado cuando se sospecha de candidiasis urinaria. Sin embargo, se debe de considerar que ello implica cierto peligro de sobreinfección de vías altas y producción de microtraumas especialmente en el varón.

Se emplea la sonda vesical cuando no se obtienen resultados por los anteriores métodos o cuando se desea corroborar un diagnóstico.

En pacientes con sonda permanente, la muestra se obtiene por punción aséptica de la sonda, nunca de la bolsa recogida.

- 2.2.6. Para obtener la muestra de lactantes se debe usar una bolsa colectora estéril la cual se coloca en los genitales manteniéndola hasta la micción. No olvidar realizar la higiene de la zona incluyendo la región anal.

Si no se produce la micción dentro de los 30 minutos posteriores a la colocación de la bolsa, ésta debe de ser sustituida. La micción puede ser facilitada con la ingesta de líquidos. Este tipo de muestra no es adecuada para el diagnóstico de candiduria.

- 2.2.7. La obtención de muestras a través de punción o aspiración suprapúbica se indica en lactantes cuando no es posible conseguirla a través de otro método, pero está contraindicada en pacientes con problemas de hemostasia.

Después del aseo, antisepsia y anestesia local, se punciona directamente la vejiga. Cualquier hallazgo microbiológico tiene valor.

- 2.2.8. Las muestras genitourinarias deben de procesarse inmediatamente después de obtenidas debido a que el rápido desarrollo de las levaduras a temperatura ambiente puede dar una falsa concentración en la muestra. Si no se puede proceder con el análisis, refrigerar la muestra por un máximo de 12 horas.

### **2.3. OBTENCIÓN, TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE MUESTRA DE BIOPSIA**

- 2.3.1. Se realiza en el quirófano o consultorio bajo las más rigurosas reglas de asepsia.
- 2.3.2. Obtenida la muestra, ésta se divide en dos porciones (1 mm cada una), una es colocada en un recipiente estéril

con tapa de rosca conteniendo solución salina isotónica estéril para el examen micológico y la otra en formol al 10% en solución salina buferada para histopatología.

La muestra para el estudio micológico debe de ser remitida de inmediato al laboratorio. Sin embargo, de no ser procesada al momento, conservar a 4 °C por dos a cuatro horas.

## 2.4. OBTENCIÓN, TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS DE ESPUTO Y SECRECIONES BRONQUIALES.

2.4.1. Debido a que las muestras de esputo pueden contener *Mycobacterium tuberculosis*, se deben adoptar precauciones al momento de su emisión para minimizar el riesgo de contagio:

- A veces los pacientes con TBC van al laboratorio para la toma de muestra de esputo, por ello nunca tome la muestra dentro del laboratorio. Es más seguro tomarla fuera de este para evitar la generación de aerosoles.
- Debe preferirse la expectoración espontánea (esputo) como muestra de estudio para el diagnóstico de laboratorio de micosis broncopulmonares. Este es un espécimen representativo y puede repetirse sin inconvenientes. Sin embargo, tiene la desventaja de arrastrar microorganismos colonizantes de boca y faringe.

Para pacientes que no pueden expectorar fácilmente se puede usar la nebulización con solución salina hipertónica o con ayuda de fisioterapia para inducir la salida del esputo.

La utilidad diagnóstica del esputo se medirá de acuerdo con su calidad valorada en función del número de leucocitos polimorfonucleares-PMN (más de 25 PMN) y células epiteliales (menos de diez células por campo) presentes en la muestra.

- 2.4.2. Indicar al paciente que se realice la higiene bucal con cepillo y pasta dental, complementariamente hacer enjuagues con agua y bicarbonato de sodio (una cucharada sopera de bicarbonato de sodio en un litro de agua hervida que luego se entibia). Emitir la muestra en frasco estéril y de boca ancha.

Las muestras deben de transportarse al laboratorio en un plazo no mayor a dos horas desde su obtención.

Una vez recibido el espécimen en el laboratorio se deberá procesar de inmediato o en su defecto conservar en refrigeración a 4 °C hasta por cuatro a seis horas.

Para tener un mejor diagnóstico se recomienda procesar tres muestras diferentes de esputo, siendo lo ideal cinco especímenes emitidos en días sucesivos.

- 2.4.3. El lavado broncoalveolar (LBA) se obtiene por fibrobroncoscopia, reduciendo la presencia de contaminantes de boca y vías respiratorias superiores. El LBA se considera significativo cuando el recuento de células epiteliales planas es inferior a 1% y se observa predominio de macrófagos alveolares o células inflamatorias.

Una vez recibido el espécimen en el laboratorio se deberá procesar de inmediato o en su defecto conservar en refrigeración a 4 °C por cuatro a seis horas.

- 2.4.4. El aspirado bronquial se obtiene mediante un fibrobroncoscopio, se aspira secreciones del árbol bronquial, previa colocación de 5 a 10 mL de suero fisiológico.

El aspirado esta indicado cuando el volumen de líquido recuperado en el lavado broncoalveolar es insuficiente y existe sospecha de infección fúngica pulmonar.

Una vez recibido el espécimen en el laboratorio se deberá procesar de inmediato o en su defecto conservar en refrigeración a 4 °C por cuatro a seis horas.

- 2.4.5. El cepillado bronquial se obtiene a través de un fibrobroncoscopio, introduciendo a través de él un cepillo con el que se frota las paredes, permitiendo obtener

muestras con una elevada proporción de células descamadas de las paredes del árbol bronquial.

Hay que considerar que la muestra no se encuentra protegida por lo que puede contaminarse al pasar por el canal del broncoscopio. Se emplea para el diagnóstico citológico. No es una muestra recomendada para el estudio de infecciones fúngicas.

## **2.5. OBTENCIÓN, TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE MUESTRA DE CATÉTER INTRAVASCULAR.**

- 2.5.1. Desinfectar con alcohol la zona cutánea alrededor de la inserción del catéter.
- 2.5.2. Retirar el catéter.
- 2.5.3. Asépticamente, cortar 5 cm del extremo distal e introducir en un contenedor estéril con tapa rosca.
- 2.5.4. Rotular y enviar al laboratorio.
- 2.5.5. Procesar de inmediato, conservando a temperatura ambiente por 15 minutos. De lo contrario, conservar a 4 °C por un máximo de 24 horas, en este caso sumergir la muestra en solución salina estéril.

## **2.6. OBTENCIÓN, TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE MUESTRA DE EXUDADO DE PERICATÉTER.**

- 2.6.1. Obtener la muestra pasando una torunda en una zona de 2 cm alrededor de la inserción del catéter.
- 2.6.2. Introducir la torunda en un medio de transporte (solución salina estéril 0,85%).
- 2.6.3. Rotular y enviar al laboratorio.
- 2.6.4. Procesar de inmediato, conservando a temperatura ambiente por 15 minutos. De lo contrario, conservar la muestra a 4 °C por un máximo de 24 horas.

---

## 2.7. OBTENCIÓN, TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE MUESTRA DE LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO.

- 2.7.1. Desinfectar la zona por punzar con yodopovidona al 2%.
- 2.7.2. El médico debe de realizar la punción en los espacios intervertebrales L3 - L4, L4 - L5 ó L5 - S1.
- 2.7.3. Al llegar al espacio subaracnoideo, retirar el estilete y dejar fluir libremente la muestra.
- 2.7.4. Recoger un volumen mínimo del espécimen de 5 mL en un tubo estéril con tapa rosca.
- 2.7.5. Transportar al laboratorio a temperatura ambiente. De no procesar de inmediato conservar a temperatura ambiente por un máximo de 24 horas, debido a que las bajas temperaturas afectan principalmente a *C. neoformans*.



## SECCIÓN 3

*Procedimientos  
para el  
diagnóstico  
micológico*



# PROCEDIMIENTOS PARA EL DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO

Se describen básicamente dos tipos de estudios, el examen directo y el cultivo.

Para asegurar una recuperación de hongos a partir de muestras clínicas, éstas deben de procesarse de inmediato mediante su inoculación sobre medios de cultivo.

## 3.1. EXAMEN DIRECTO

Este procedimiento no sustituye al cultivo. Brinda información preliminar o presuntiva al ser una técnica rápida que puede ser útil al clínico y en algunos casos llegar a ser diagnóstica.

Es así, que la presencia de hifas cenocíticas en pacientes con cetoacidosis diabética puede ser de gran valor para iniciar tratamiento contra posible mucormicosis.

Entre los principales exámenes directos tenemos:

### 3.1.1. Hidróxido de potasio (KOH)

Disuelve rápidamente las células permitiendo digerir material proteico, observando con mayor nitidez los elementos fúngicos, su efecto de clarificar puede incrementarse al calentar a la llama ligeramente la preparación.

Adicionalmente, se puede emplear colorantes para pigmentar la pared de los hongos y mejorar la visualización.

La observación de hifas, permite sugerir la presencia de invasión micótica.

### 3.1.2. Tinta china

Es un método de contraste. Permite visualizar la cápsula de polisacárido de *Cryptococcus neoformans*, mediante la presencia de un halo claro y nítido alrededor de la levadura.

Existen artefactos (hematíes, burbujas de aire, leucocitos, gotas de grasa y partículas de talco) que pueden interferir y confundir al analista.

La sensibilidad de la técnica es de 50% en pacientes sin VIH y se puede incrementar hasta 88% en pacientes VIH con meningitis criptocócica.

### 3.1.3. Coloración Giemsa

Es de utilidad para el diagnóstico de histoplasmosis, neumocistosis y otras micosis. Permite visualizar blastoconidias intracelulares al polimorfonuclear, como la fase tisular del *H. capsulatum*.

### 3.1.4. Coloración Gram

Es útil para observar blastoconidias y pseudomicelios de las especies del género *Candida*, *Malassezia* y *Cryptococcus*, las cuales son Gram positivas con variaciones en la intensidad de la coloración.

## 3.2. CULTIVO DE MUESTRA DE SANGRE

- 3.2.1. En laboratorios pequeños que tienen un bajo flujo de este tipo de muestras y no permite tener medios especiales es aceptable inocular 0,5 mL de sangre heparinizada directamente en la superficie de un medio de cultivo.

Como medio de cultivo se debe emplear una botella bifásica que contenga 60 mL de caldo infusión cerebro corazón y agar cerebro corazón.

Se inocular 10 mL de sangre en el medio bifásico, recibiendo ventilación a través de una aguja con tapón de

algodón, colocando el medio de cultivo en forma vertical. Se incuba a 30 °C por 30 días.

Examinar en forma diaria, hasta observar el crecimiento de microorganismos. Después de examinar diariamente los cultivos, se debe de mezclar la fase líquida del medio de cultivo con el agar.

3.2.2 Otro sistema de recuperación de hongos es el sistema de lisis centrifugación, que tiene la capacidad de lisar leucocitos sanguíneos con ulterior liberación al medio de microorganismos fagocitados, pero para su correcta realización hay que considerar las especificaciones del fabricante (anexo A).

3.2.3 Para las técnicas automatizadas seguir las recomendaciones de los fabricantes de como inocular dos frascos en cada extracción (aeróbico y anaeróbico), pero en caso de niños emplear un frasco pediátrico por extracción.

El volumen de sangre inoculado por frasco es esencial para incrementar la sensibilidad de la técnica.

### 3.3. CULTIVO DE MUESTRA DE ORINA

3.3.1 El urocultivo convencional es el método idóneo para el estudio de infección del tracto urinario, permitiendo diferenciar cualitativa y cuantitativamente una contaminación de una candiduria significativa.

3.3.2 Inocular 1 ó 10 µL de orina no centrifugada en una placa Petri que contenga agar sabouraud dextrosa con anti-biótico (ASD).

3.3.3 Incubar a 35 - 37 °C por 48 - 72 horas en aerobiosis.

3.3.4 En la infección del tracto urinario, el valor del recuento de colonias en la orina no esta bien establecido. En general, se acepta que un recuento mayor a 10 000 UFC/mL, indicaría infección urinaria o candidiasis diseminada, un recuento inferior no es significativo de infección.

Algunos investigadores señalan que hay que valorar cualquier recuento de levaduras como anormal y realizar nuevamente el cultivo antes de descartar una infección.

En general, ante un cultivo positivo, se puede considerar las siguientes situaciones:

- Candiduria inferior a 1000 UFC/mL: generalmente corresponde a ausencia de infección, con excepción si la muestra fue obtenida por punción suprapúbica.
- Candiduria entre 1000 y 10 000 UFC/mL: de significado clínico dudoso y puede resultar de una contaminación sobre todo si existe flora mixta.

En ciertos pacientes (niños, diabéticos, cateterizados), un recuento bajo puede ser de valor, sin embargo considerar una nueva muestra.

- Candiduria entre 10 000 y 50 000 UFC/mL: sugiere la existencia de infección urinaria. La presencia de leucocitos y clínica del paciente pueden ayudar a valorar la candiduria. Al encontrar en el cultivo flora fúngica mixta o asociada con bacterias, sospechar de contaminación.
- Candiduria superior a 50 000 UFC/mL: indica infección.

- 3.3.5 Agentes etiológicos diferentes al género *Candida* obliga a la realización de recuentos de colonias y puede sembrarse inclusive el sedimento urinario.

## 3.4. CULTIVO DE BIOPSIA

- 3.4.1 Transvasar la muestra a una placa Petri estéril. Realizar lavados con solución salina estéril con antibióticos (cloramfenicol al 0,05%).
- 3.4.2 Seccionar y triturar la muestra en trozos de 1 a 2 mm con ayuda de pinza y bisturí estéril para obtener un espécimen homogeneizado.

- 3.4.3 Flamear al mechero cuatro láminas portaobjetos y en la cara flameada realizar improntas para hacer examen en fresco y coloraciones como Gram y Giemsa.
- 3.4.4 Inocular la muestra, sumergiéndola ligeramente en la superficie del medio de cultivo agar Sabouraud dextrosa (ASD). Incubar un tubo a temperatura ambiente y otro a 37 °C. Controlar diariamente por un lapso de ocho semanas.

### 3.5. CULTIVO DE CATÉTER Y EXUDADO DE PERICATÉTER

- 3.5.1 Los métodos más empleados son las técnicas semicuantitativa de Maki y cuantitativa de Brum - Buisson.
- 3.5.2 La técnica semicuantitativa de Maki, consiste en:

Rodar cuatro veces con la ayuda de una pinza estéril 5 cm del segmento distal del catéter sobre la superficie de las placas Petri conteniendo agar sangre y ASD.
- 3.5.3 La técnica cuantitativa de Brum - Buisson, consiste en:
  - Introducir el extremo distal del catéter, en un medio de cultivo líquido.
  - Agitar en un vórtex durante un minuto.
  - Sembrar 50 µL en placas de agar sangre y ASD<sup>(1)</sup>.

<sup>(1)</sup> Incubación:

- Agar sangre: a 35 - 37 °C, 72 h
- Medio liquido: a 35 - 37 °C, 72 h
- ASA: a 30 °C, para detectar el crecimiento de *Rhodoturula spp.*, por 15 días
- Agar Sabouraud Dextrosa-palmitico 3%: a 35 - 37 °C, para permitir el crecimiento de *Malassezia spp.*, por 15 días

Si se sospecha la infección por hongos filamentosos, prolongar la incubación a 30 días.

### 3.6 CULTIVO DE ESPUTO Y SECRECIONES BRONQUIALES

- 3.6.1 Colocar la muestra de esputo en tubos de ensayo con ASD y agar infusión cerebro-corazón. Emplear como mínimo seis tubos por muestra, tres de ellos se incubarán a temperatura ambiente y los otros tres a 37 °C. Los medios de cultivo deben de contener cloramfenicol 0,5g/L. Evitar el uso de cicloheximida debido a que puede inhibir el desarrollo de mohos, principalmente *Aspergillus spp.*, *Penicillium marneffe*, y *Cryptococcus neoformans*.
- 3.6.2 El LBA se debe de colocar en recipiente estéril y con tapa rosca. La muestra se centrifuga (1500 g ó 3000 rpm por 30 minutos) y a partir del sedimento se realiza el cultivo.
- 3.6.3 El valor diagnóstico del hallazgo de los diferentes hongos es diverso. Son importantes los aislamientos de *Paracoccidioides brasiliensis* e *Histoplasma capsulatum*; otros como *Aspergillus spp.* y *Fusarium spp.* tienen valor cuando se les observa en el examen directo y se les aísla en forma reiterada a partir de especímenes seriados. Finalmente, algunos hongos como *Candida spp.* son considerados como causantes de infección respiratoria si son observados por histopatología de biopsias o piezas quirúrgicas. *Cryptococcus neoformans* puede causar micosis pulmonar principalmente en pacientes VIH.
- 3.6.4 Los cultivos se deben controlar hasta 45 días.

### 3.7 CULTIVO DE LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

- 3.7.1 La muestra se obtiene por punción lumbar, y luego es depositada en un tubo de vidrio o frasco estéril con tapa rosca. El volumen requerido para un adecuado diagnóstico de hongos debe ser de 5 mL.

3.7.2 Centrifugar la muestra a 1500 g ó 3500 rpm por 15 minutos. El sobrenadante puede ser empleado para realizar pruebas serológicas de detección de antígeno de *C. neoformans*.

3.7.3 El sedimento debe ser sembrado sobre ASD o agar infusión cerebro corazón o agar semilla de girasol (agar *niger seed*). Emplear de cuatro a seis tubos conteniendo el medio de cultivo por muestra. Incubar a temperatura ambiente y 37 °C por cuatro semanas.

La proporción de resultados positivos aumentan en forma directamente proporcional al volúmen de muestra.

3.7.4 Lectura e interpretación de los cultivos

Durante la primera semana de incubación realizar las lecturas a diario de los medios de cultivo, luego puede realizarse dos veces por semana hasta completar el tiempo de incubación establecida.

Una vez realizado el aislamiento primario sembrar en medios de cultivo selectivos para su tipificación.



## SECCIÓN 4

---

*Identificación  
de principales  
levaduras*



# IDENTIFICACIÓN DE PRINCIPALES LEVADURAS

La taxonomía y epítetos binomiales son decididos por consenso, pero cuando existen desacuerdos resultan múltiples nombres para el mismo organismo. Esto parece ser que proseguirá debido a que muchas veces el teleomorfo de una levadura no es evidente, haciendo más apropiado el nombre por su fase anamórfica.

El laboratorio de micología identifica levaduras que tienen significancia clínica. Para lo cual se dispone de múltiples sistemas bioquímicos rápidos; y también se deben seguir realizando sencillas pruebas que son útiles en la identificación tales como: observar la micromorfología, producción de pigmento, asimilación de carbohidratos, producción de ureasa, susceptibilidad a la cicloheximida, desarrollo de película, desarrollo a 37 y 42 °C.

## 4.1 IDENTIFICACIÓN DE *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *Rhodotorula rubra*, *Trichosporon spp.*, *Geotrichum spp.*, *Cryptococcus neoformans*.

### 4.1.1 Objetivo

Describir los procedimientos para la identificación de las cepas de *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *Rhodotorula rubra*., *Trichosporon spp.*, *Geotrichum spp.* *Cryptococcus neoformans*.

#### 4.1.2 Campo de aplicación

Comprende la identificación de especies de *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *Rhodotorula rubra*, *Trichosporon spp.*, *Geotrichum spp.*, *Cryptococcus neoformans*.

#### 4.1.3 Consideraciones generales

a) Determinar si el aislamiento corresponde a una cepa de *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *Rhodotorula rubra*, *Trichosporon spp.*, *Geotrichum spp.*, *Cryptococcus neoformans*.

b) El medio de cultivo que se emplea para el aislamiento primario es el ASD con antibiótico.

Las colonias de levaduras son ligeramente abombadas o planas, de consistencia mantecosa, lisa o rugosa, con olor agradable, tornándose pastosas a medida que envejecen.

c) Las colonias de *Rhodotorula rubra* se caracterizan por presentar pigmentos carotenoides que confiere a la colonia un color naranja o rojo anaranjado.

d) Microscópicamente las células de *Rhodotorula rubra* se encuentran dotadas de una fina cápsula visible al examen directo con tinta china.

e) Microscópicamente las células de *Cryptococcus neoformans* se caracterizan por presentar una cápsula de polisacárido visible al examen directo con tinta china.

#### 4.1.4 Identificación de especies del género *Candida*. Morfología de las colonias

Se caracterizan por presentar colonias cremosas de color blanco amarillento, lustrosas, poco elevadas y de bordes bien definidos.



Desarrollo de *C. albicans* sobre agar sabouraud dextrosa.



Desarrollo de *C. glabrata* sobre agar sabouraud dextrosa.

#### a) Examen microscópico

Se observan células redondas u ovaladas de tres a siete micras de diámetro, que se reproducen por blastoconidias y forman pseudomicelio en la mayoría de las especies.

#### b) Pruebas fisiológicas para identificación

##### Tubo germinativo

Permite diferenciar las especies de *Candida albicans* de las no *albicans*.

### Procedimiento

Suspender un inóculo de la cepa pura de *Candida* con 24 horas de desarrollo en 0,5 mL de suero humano o de conejo. Incubar a 35 – 37 °C por 2h y 30 min.

Colocar 2 ó 3 gotas de la suspensión en una lámina portaobjeto y cubrir con lámina cubreobjeto y observar al microscopio con objetivo de 40X Interpretación: La prueba es positiva al visualizar una estructura elongada que se origina apartir de la levadura.

Realizar esta prueba empleando cepas controles en paralelo a la cepa en estudio.

Control positivo: *C. albicans*.

Control negativo: *C. glabrata*.



Tubo germinativo positivo.  
Cepa de *Candida albicans*.



Tubo germinativo negativo.  
Cepa de *Candida glabrata*.

### Desarrollo a 42 °C

*C. albicans* y *C. dubliniensis* tienen comportamiento fisiológico y morfológico similar y la prueba que los va a diferenciar en el laboratorio de microbiología es el desarrollo a 42 °C en agar papa dextrosa.

### Procedimiento

Sembrar la cepa aislada en tubo o placa Petri que contenga agar papa dextrosa e incubar a 42 °C por 48 horas.

Interpretación:

Positivo: *C. albicans.* con desarrollo óptimo

Negativo: *C. dubliniensis* sin desarrollo

### **Producción de clamidosporas, blastoconidias y artrosporas.**

#### **Procedimiento**

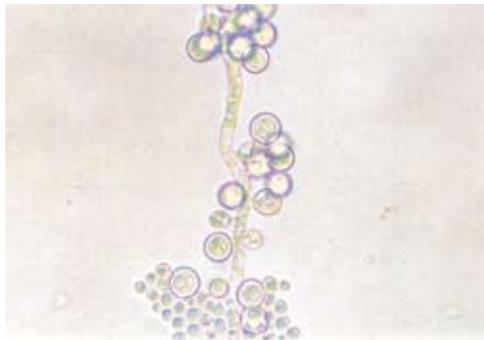
Sembrar la colonia en con estrías en paralelo sobre el medio de cultivo (agar harina de maíz, agar arroz, agar clamidospora).

Para la lectura colocar una lámina cubreobjeto estéril sobre el área sembrada e incubar a temperatura ambiente por tres a cinco días.

Colocar la placa Petri al microscopio y sin retirar la lámina cubreobjeto observar con objetivo de 10X y 40X.

Control positivo: *C. albicans.*

Control negativo: *C. glabrata.*



Clamidospora de *Candida albicans*.

#### **4.1.5 Identificación de *Rhodotorula rubra*.**

##### **a) Morfología de las colonias**

Se caracterizan por ser de color rojo - anaranjado o naranja, de aspecto cremoso o rugoso, brillante y de superficie lisa.



Desarrollo de *Rhodotorula rubra* sobre agar Sabouraud dextrosa después de 72 horas de crecimiento a temperatura ambiente.

### **b) Examen microscópico**

Se observan levaduras redondas, ovoides de 2 - 6,5 micras de diámetro, en ocasiones forman pseudomicelio rudimentario, al examen directo con tinta china se visualiza una fina cápsula.



Fina cápsula de *Rhodotorula rubra* visible al examen directo con tinta china.

#### 4.1.6 Identificación de *Trichosporon spp.*

##### a) Morfología de las colonias

Son de rápido desarrollo, liso, plegado, aterciopelado, ceroso, de color blanco - amarillento - crema. La textura plegada es más prominente en el tiempo.



Desarrollo de *Trichosporon spp.* sobre agar Sabouraud dextrosa después de 72 horas de crecimiento a 37 °C.

##### b) Examen microscópico

Se visualiza artroconidias y blastoconidias. Las blastoconidias son unicelulares y de forma variable y nacen en brotes en los ángulos de las artroconidias. La principal característica es la de presentar artroconidias usualmente en forma cúbica o de barril.



Artroconidias de *Trichosporon sp.* (objetivo de 100X).

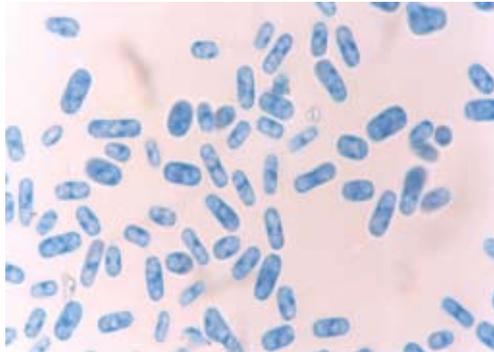
#### 4.1.7 Identificación de *Geotrichum spp.*

##### a) Morfología de las colonias

Son de crecimiento rápido, en el período de una semana presentan un color blanco - grisáceo, que posteriormente cambia a un color amarillento con aspecto ceroso, polvoriento a rugoso. La temperatura óptima de crecimiento es 25 °C, la mayoría de las cepas no desarrollan o lo hacen débilmente a 37 °C.

##### b) Examen microscópico

Se observa artroconidias unicelulares, en cadena, hialinas que resultan de la fragmentación de hifas no diferenciadas por fisión a través de un doble septo, estas estructuras tienen forma rectangular y redondeada en los extremos, semejante a un barril. Carecen de blastoconidias, conidióforos y pseudohifas.



Artroconidias de *Geotrichum spp.* (objetivo de 100X).

#### 4.1.8 Identificación de *Cryptococcus neoformans.*

##### a) Morfología de las colonias

Son mucoides y brillantes. Sobre el ASD desarrollan un color blanco amarillento, son poco elevadas y de bordes continuos, mientras que sobre el agar *niger seed* (agar semilla de girasol) desarrollan un color marrón.



Desarrollo de *Cryptococcus neoformans* sobre agar Sabouraud dextrosa después de 72 horas de crecimiento a 37 °C.

### b) Examen microscópico

Levaduras redondas de 7 a 15  $\mu\text{m}$  de diámetro, en algunos casos pueden producir blastoconidias. Su principal característica es la de presentar una cápsula que la circunda, visible al examen directo con la tinta china.

Control positivo: *Cryptococcus neoformans*.

Control negativo: *Candida albicans*.



Cápsula de polisacárido visible al examen directo con tinta china (objetivo de 100X).

## 4.1.9 Identificación mediante criterios bioquímicos y enzimáticos

### 4.1.9.1 Asimilación de carbohidratos

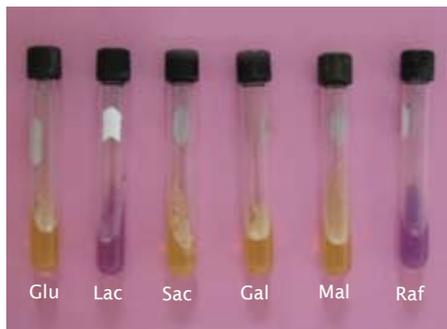
Los patrones de asimilación de azúcares (glucosa, lactosa, sacarosa, maltosa, galactosa y rafinosa) permiten identificar las diferentes especies de *Candida spp*, *Rhodotorula rubra*, *Trichosporon spp*. y *Geotrichum spp*.

Interpretación:

Positivo: viraje del color del medio de cultivo hacia el amarillo.



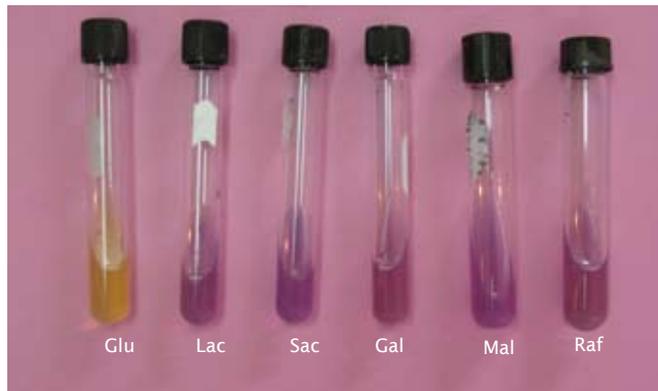
Características bioquímicas de *Rhodotorula rubra*.



Características bioquímicas de *Candida albicans*.

Negativo: no se produce viraje de color, permaneciendo el color del medio de cultivo en morado o púrpura.

Remitirse al “Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de micosis oportunistas y profundas”. Serie de Normas Técnicas N.º 23. Capítulo VI. 6.1 Identificación de *Candida sp.* 6.1.3 Asimilación de carbohidratos.



Características bioquímicas de *Candida glabrata*.

Leyenda:

Glu : glucosa  
Gal : galactosa  
Lac : lactosa  
Mal : maltosa

Sac : sacarosa  
Raf : rafinosa  
Ure : urea  
FP : formación de película

#### 4.1.9.2 Auxonograma del carbono en placa

Se fundamenta en el empleo de diversos nutrientes hidrocarbonados o nitrogenados sobre un medio sintético base, para observar el crecimiento selectivo de una levadura alrededor de los nutrientes necesarios para su desarrollo. Los medios de cultivo se comercializan deshidratados como medio base de levaduras, siendo los más usados:

- **Medio sin carbono:** sulfato amónico (5g/1), fosfato monopotásico (1g/1), sulfato de magnesio (0,5g/1), agar (20g/1)
- **Medio sin nitrógeno:** glucosa (20g/1), fosfato monopotásico (1g/1), sulfato de magnesio (0,5g/1), agar (20g/1)

Como fuente de carbono se pueden emplear todos los azúcares y alcoholes. Como sustrato nitrogenado se puede usar peptona, asparagina, úrea, sulfato de amonio, nitrato de potasio y aminoácidos diversos.

### **Preparación de medios y reactivos (ver anexo c)**

#### **Procedimiento**

- Verter en placa Petri 25 mL del medio base a 50 °C.
- Agregar 1 mL de la suspensión de levaduras (cultivo de tres días) a la escala N.º 1 de Mc Farland. Homogeneizar.
- Dejar solidificar el agar, colocar los discos impregnados con los azúcares y distribuirlos a distancias razonables.
- Incubar a 37 °C por tres días y hacer la lectura.
- Los halos de crecimiento alrededor de los discos indican la asimilación del azúcar.

#### **4.1.9.3 Producción de ureasa**

Se basa en la capacidad de producir la enzima ureasa, la cual desdobra la urea en dióxido de carbono y amonio, incrementando el pH del medio y produciendo un cambio de color rojo - púrpura en el indicador rojo de fenol.

#### **Procedimiento**

- Se utiliza el medio de Christensen, en el cual se inocula una asada de la levadura en estudio. Los medios se incuban a 37 °C du-

rante 6 h o a temperatura ambiente durante tres días.

### Interpretación

La prueba se considera positiva cuando se alcaliniza el medio lo que produce un cambio de color original (amarillo) a rosa o rojo.

Una reacción positiva a la prueba ureasa es sugestiva de pertenecer al género *Cryptococcus*, la cepa de *C. neoformans* son productoras de ureasa.



Urea (+)

Urea (-)

Positivo: *Cryptococcus neoformans*.

Negativo: *Candida albicans*.

#### 4.1.9.4 Formación de película

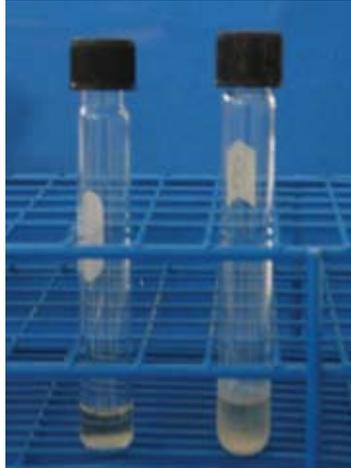
Algunas especies de *Candida*, *Geotrichum* y *Trichosporon* producen una película y gas sobre la superficie del medio de cultivo (caldo Sabouraud).

#### Procedimiento

- Inocular una asada de la colonia de levadura, en un tubo de vidrio que contenga caldo Sabouraud.
- Incubar a temperatura ambiente (25 °C) por tres días.

### Interpretación

- Se considerará como prueba positiva si se produce una película sobre la superficie del medio de cultivo.



Caldo negativo de *C. albicans*      Caldo positivo de *C. tropicalis*

#### 4.1.9.5 Susceptibilidad a cicloheximida

Permite distinguir aquellas levaduras que son resistentes o sensibles a la cicloheximida o actidione.

##### Procedimiento

- Se realiza subcultivando la cepa sobre agar micosel o agar micobiótico.
- Incubar a temperatura ambiente por tres días.

##### Interpretación

- Cepas que se desarrollen sobre el medio de cultivo se considerarán como resistentes.



Cepa resistente a la cicloheximida  
*C. guilliermondii*

Cepa sensible a la cicloheximida  
*C. tropicalis*

#### 4.1.9.6 Prueba de reducción del nitrato

La capacidad que tienen algunas cepas de levaduras de producir nitritos a partir de nitratos (presencia de enzimanitrato reductasa Sc.)

##### Procedimiento

- Coger con ayuda de un hisopo de algodón, dos a tres colonias aisladas de un cultivo de 48 -72 h de crecimiento en cualquier medio de cultivo habitual.
- El hisopo inoculado se presiona con firmeza contra el fondo de un tubo vacío para que se desprendan los microorganismos contenidos en la fibra de algodón.
- Incubar el tubo con el hisopo a 45 °C por diez minutos.
- Sacar el hisopo y agregar al tubo, dos gotas de alfa - naftlamida (reactivo A) y dos gotas de ácido sulfanílico (reactivo B).
- Reintroducir el hisopo en el tubo para que absorba los reactivos.

### **Interpretación:**

- El desarrollo de un color rojo brillante en el hisopo es positivo.
- Negativo sólo cuando el hisopo retiene el color de la colonia.

Positivo: *Cryptococcus. albidus var albidus*

Negativo: *C. neoformans*

#### **4.1.9.7 Prueba de la fenoloxidasa**

Capacidad de *C. neoformans* de formar un pigmento marrón o negro, denominado melanina, a partir de compuestos difenólicos. La producción de este pigmento mediante la prueba de la L - dopa - citrato férrico, es realizada por la enzima fenoloxidasa.

La reacción positiva se evidencia con la producción de un pigmento marrón oscuro o negro alrededor de la colonia de *C. neoformans*.

### **Procedimiento**

- Inocular una a dos colonias de la levadura en estudio, sobre la superficie de cada cuadrado de papel Whatman N.º 1.
- Incubar en cámara húmeda a 28 °C de 3 a 18 h.
- Para la producción de un pigmento marrón o negro.

### **Interpretación**

Positivo: *Cryptococcus neoformans*.

Negativo: *Candida albicans*.

#### **4.1.9.8 Otras técnicas de identificación**

##### **4.1.9.8.1 Identificación bioquímica enzimática**

Entre estas metodologías tenemos a los medios de cultivo que emplean

sustratos cromogénicos que permiten el aislamiento e identificación de algunas especies del género *Candida*. Entre los medios cromogénicos comercialmente disponibles tenemos al: CHROMagar Candida®, Cromogen albicans®, Candida ID®, Albicans ID2®, CandiSelect®, Fluoroplate Candida®, Agar SDCA - MUAG®.

Se describen sistemas enzimáticos que usan un sustrato cromogénico para detectar las enzimas MUGAL y PRO por lo que no requieren el uso de lámpara ultravioleta, entre ellos tenemos a Candida albicans Screen®, Murex C. albicans CA50®.

También hay sistemas enzimáticos disponibles que permiten la identificación rápida de *C. albicans* a partir de una colonia desarrollada sobre cualquier medio de cultivo convencional, éstos sistemas detectan una o dos enzimas  $\beta$  - galactosaminidasa y L - prolina aminopeptidasa, presentes sólo en *C. albicans*. Para detectar estas enzimas los sistemas comerciales pueden utilizar sustratos fluorogénicos y cromogénicos.

Entre otras metodologías de identificación se encuentran los sistemas enzimáticos que emplean sustratos fluorogénicos, requiriendo para ello el uso de una lámpara ultravioleta de 365 nm, es el caso del BactiCard Candida®.

El medio CHROM agar *Candida*, es importante para identificar las especies del género *Candida* en función de los colores como:

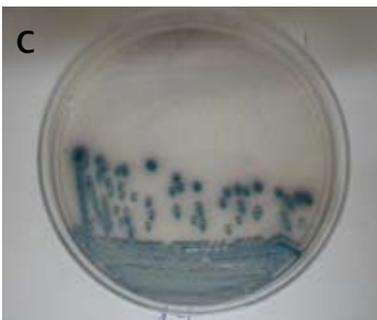
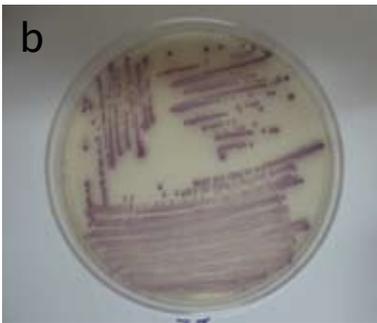
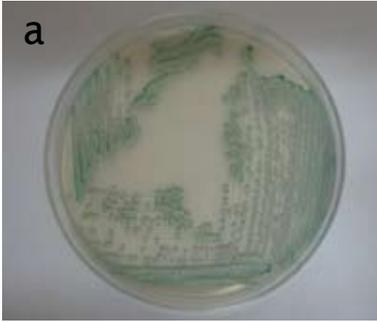
*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. glabrata*.

### Procedimiento

- La siembra se realiza a partir de cepas muestras biológicas y se incuban a temperaturas de 30 a 37 °C durante 48 horas.

### Interpretación

- *C. albicans*, son lisas y de color verde esmeralda.
- *C. dubliniensis*, de color verde oscuro.
- *C. tropicalis* colonia de color azul oscuro con un halo púrpura-marrón en el medio de cultivo.
- *C. krusei*. colonias rugosa con el centro rosado y el borde blanco.
- *C. glabrata*, colonia de color violeta morado.



Desarrollo de *Candida albicans* (a), *Candida krusei* (b) y *Candida tropicalis* (c) sobre CHROM agar Candida.

#### 4.1.9.8.2 Identificación por asimilación de nutrientes

Existen diferentes sistemas de identificación semiautomatizados basados en paneles o galerías que contienen los nutrientes, como por ejemplo: Auxacolor®, Uni - Yeast - Tek®, API 20 C AUX®, Galeria ID 32C®, Sistema Vitek®.

Entre los sistemas automáticos tenemos: *Sistema Vitek 2®*, *Biolog YT MicroPlate®*, *Rapid Yeast Identification Panel MicroScan®*.

También hay sistemas de identificación rápida de levaduras mediante pruebas bioquímicas y enzimáticas, como: *Rapid Yeast Plus System®*, *Fungiscreen 4H®*.  
Api 20 CAUX®

La galería API 20 CAUX se compone de 20 cúpulas con sustratos deshidratados que permiten realizar 19 pruebas de asimilación. Las cúpulas se inoculan con un medio mínimo semisólido y las levaduras sólo se reproducen si son capaces de utilizar el sustrato correspondiente.



La lectura de estas reacciones se hace por comparación con un control de crecimiento y la identificación se obtiene, a partir de un código numérico, mediante un catálogo analítico o un programa informático.

#### **4.1.9.8.3 Identificación mediante aspectos inmunológicos**

Estas metodologías permiten la rápida identificación de aislamientos de *C. albicans* y *C. krusei*, mediante aglutinación de partículas de látex, usando anticuerpos monoclonales específicos para ambas especies. Entre los kits disponibles tenemos a: Bichro - látex albicans®, krusei - color®.

## **4.2 IDENTIFICACIÓN DE *Malassezia furfur*.**

### **4.2.1 Objetivo**

Describir los procedimientos para la identificación de cepas de *Malassezia furfur*.

### **4.2.2 Campo de aplicación**

Comprende la identificación de cepas de *Malassezia furfur*.

### **4.2.3 Consideraciones generales**

Las levaduras de *Malassezia furfur* por ser lipofílicas, se desarrollan en medios de cultivo que contengan en su composición aceites naturales u otras sustancias grasas, siendo el método más común el cultivo en ASD que contiene cicloheximide o actidione y aceite de oliva, sin embargo existen medios de cultivo alternativos como el agar de Dixón que en su formulación incluye al glicerol mono - oleato que estimula el crecimiento *in vitro* de la levadura. La identificación se basa en comparar características morfológicas y fisiológicas.

#### 4.2.4 Identificación de *Malassezia furfur*.

##### a) Morfología de las colonias

Se caracterizan por ser redondas de consistencia cremosa y de color blanco amarillento.

##### b) Examen microscópico

Se observa células globosas, elipsoidales a cilíndricas que se reproducen por gemación.

Aplicar el procedimiento descrito en el “Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de micosis oportunista y profundas”. Serie de Normas Técnicas N.º 23. Capítulo V. 5.1 Reactivos. 5.1.1 Hidróxido de Potasio.

##### 4.2.4.1 Prueba de la catalasa

Consiste en determinar la presencia de la enzima catalasa.

Colocar una gota de peróxido de hidrógeno (agua oxigenada) 10 vol. en una lámina portaobjeto y agregar una suspensión de la levadura.

Positivo: presencia de burbujas.

Negativo: ausencia de burbujas.

##### 4.2.4.2 Asimilación del *tween* 20, 40, 60 y 80.

Preparar soluciones de 0,1; 0,5; 1; 5 y 10% de *tween* 20, 40, 60 y 80 en agar peptona glucosa (1 y 2%) e incubar a 32 °C por siete días.

El inóculo se prepara a una suspensión de 10<sup>7</sup> mL<sup>-1</sup> en agua destilada estéril.

##### 4.2.4.3 Desarrollo a diferentes temperaturas.

Se siembra la cepa en el agar de Dixón y se incuba a 32, 37 y 40 °C durante siete días.



## SECCIÓN 5

*Identificación  
de principales  
hongos  
filamentosos*



# IDENTIFICACIÓN DE PRINCIPALES HONGOS FILAMENTOSOS

## 5.1 IDENTIFICACIÓN DE *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *Fusarium solani*, *Scedosporium apiospermum*, *Mucor spp.* *Rhizopus oryzae* y *Absydia corymbifera*.

### 5.1.1 Objetivo

Describir los procedimientos para la identificación de las cepas de *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *Fusarium spp.*, *Scedosporium apiospermum*, *Mucor spp.* y *Rhizopus oryzae*.

### 5.1.2 Campo de aplicación

Comprende la identificación de cepas de *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *Fusarium sp.*, *Scedosporium apiospermum*, *Mucor sp.* y *Rhizopus oryzae*.

### 5.1.3 Consideraciones generales

Determinar si el aislamiento corresponde a una cepa de *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *Fusarium spp.* *Scedosporium apiospermum*, *Mucor spp.* o *Rhizopus oryzae*.

### 5.1.4 Identificación de *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, y *A. niger*.

#### 5.1.4.1. Morfología de las colonias de *Aspergillus fumigatus*.

Las colonias desarrollan con rapidez sobre ASD Czapek a 25 °C.

La textura de las colonias es aterciopelada, afelpada, vellosa o algo plegada, con margen blanquecino o *beige*.

El color inicialmente es blanco virando en aproximadamente siete días a un verde azulado por la producción de conidias. El reverso de la colonia es incoloro.



Característica macroscópica de *A. fumigatus*.

#### 5.1.4.2. Características microscópicas de las colonias de *Aspergillus fumigatus*.

Presentan conidióforo corto, liso de hasta 300  $\mu\text{m}$  de longitud y de 5 a 8  $\mu\text{m}$  de diámetro, vesícula de 20 a 30  $\mu\text{m}$  de diámetro con fiáldes (6 a 8  $\mu\text{m}$  de largo), uniseriada, ocupando 2/3 de la vesícula.

Los conidios en cadenas forman una compacta columna sobre la vesícula, son de color verde, finamente rugosos, globosos o subglobosos y de 2 a 3  $\mu\text{m}$  de diámetro.



Características microscópicas de *A. fumigatus*.

#### 5.1.4.3 Morfología de las colonias de *Aspergillus flavus*.

Las colonias desarrollan rápidamente sobre ASD o agar Czapek a 25 y 37 °C en cinco a siete días. El color es verde - amarillo. La textura de las colonias es pulverulenta con surcos radiales, rugosas o granuladas, ocasionalmente algodonosas en el centro o margen de la colonia. El reverso de la colonia es incoloro.

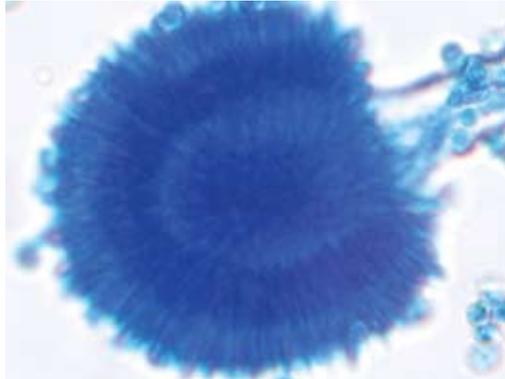


Características macroscópicas de *A. flavus*.

#### 5.1.4.4 Características microscópicas de las colonias de *Aspergillus flavus*.

Los conidióforos no ramificados de pared gruesa, hialinos, rugosos, de  $\geq 1$   $\mu\text{m}$  de longitud y de 10 a 20  $\mu\text{m}$  de diámetro. Las vesículas son globosas o subglobosas de 10 a 65  $\mu\text{m}$  de diámetro produciendo fiáldes uniobiserialadas alrededor de la vesícula.

Los conidios son de color verde amarillentos, lisos o finamente rugosos, esféricos o subsféricos con un diámetro de 3,5 a 4,5  $\mu\text{m}$  de diámetro. Los esclerotes pueden estar presentes.



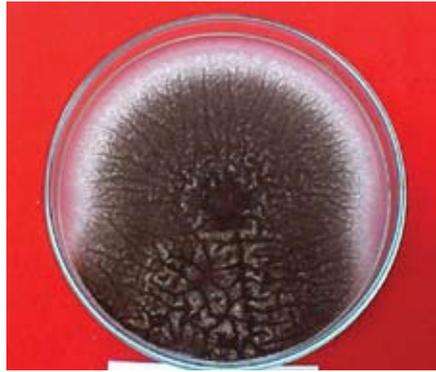
Características microscópicas de *A. flavus*.

#### 5.1.4.5 Morfología de las colonias de *Aspergillus niger*.

Colonias de rápido desarrollo sobre ASD o agar Czapek a 25 y 37 °C.

El color de las colonias al principio es blanco a amarillo, luego es negro.

La textura de las colonias es granular. El reverso de la colonia es incoloro o crema.



Características macroscópicas de *A. niger*.

#### 5.1.4.6 Características microscópicas de las colonias de *Aspergillus niger*.

Los conidióforos son de pared lisa, hialina o pigmentada y miden de 1,5 a 3 mm de largo y de 15 a 20  $\mu\text{m}$  de diámetro. La vesícula es globosa con 50 - 100  $\mu\text{m}$  de diámetro y produce fiálides alrededor de ella. Las fiálides son biseriadas, las ramas primarias miden 30  $\mu\text{m}$  de largo y pueden estar tabicadas, mientras que las secundarias son cortas y miden 8  $\mu\text{m}$  de longitud, a partir de las cuales brotan los conidios, los cuales son globosos y rugosos con 4 a 5  $\mu\text{m}$  de diámetro, de color castaño o marrón a negro.



Características microscópicas de *A. niger*.

## 5.1.5 Identificación de *Fusarium solani*.

### 5.1.5.1 Morfología de las colonias.

Las colonias tienen un rápido desarrollo a 25 y 37 °C (siete días). El color de las colonias es blanco, crema, pardo claro o pardo rojizo mezcladas con zonas de color púrpura; raramente en cepas de aislamientos clínicos pueden presentar masas mucosas verdes azuladas, formadas por macroconidias que nacen de esporoquios.

La textura es algodonosa o lanosa. La colonia puede ser inhibida por la cicloheximida.



Características macroscópicas de *F. solani*.

### 5.1.5.2 Características microscópicas de las colonias

Se caracteriza por presentar conidióforos de esporoquios cortos, ramificados. Conidióforos de hifas aéreas generalmente no ramificados, muy largos, reducidos a una simple fálide más o menos cilíndrica, en cuyo ápice se puede encontrar un conidio no desprendido.

Macroconidias en masas mucosas, hialinos, mayormente con tres septos, ligeramente curvados, fusiformes, pero con extremos mas o menos redondeados  $28 - 50 \times 4 - 6 \mu\text{m}$ . Microconidias en masas mucosas, hialinos, lisos, generalmente unicelulares, pueden ser ligeramente curvados, elipsoidales o subcilíndricos de  $7 - 16 \times 2,5 - 4,5 \mu\text{m}$ . Presencia de clamidosporas terminales e intercalares, lisas o verrugosas, parduzcas y de hasta  $10 \mu\text{m}$  de ancho.



Características microscópicas de *F. solani*.

## 5.1.6 Identificación de *Scedosporium apiospermum*.

### 5.1.6.1. Morfología de las colonias.

Crecimiento moderadamente rápido a  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , y también desarrollar a  $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (siete días), de color blanco y textura algodonosa, pero a medida que se incrementa la esporulación el color cambia a gris o gris pardusco. El reverso de las colonias es amarillo pálido a marrón oscuro o negro dependiendo de la edad del cultivo.

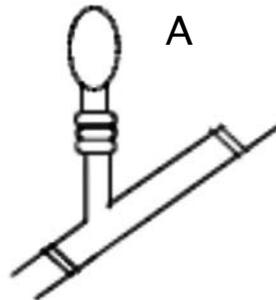
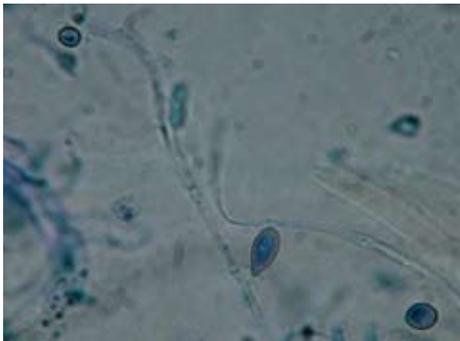
Las cepas aisladas de muestras clínicas raramente desarrollan la fase sexual. Crece sobre medios de cultivo que contienen clorhexidina.



Características macroscópicas de *S. apiospermum*.

#### 5.1.6.2. Características microscópicas de las colonias.

Células conidiógenas (anélides) casi cilíndricas, se desarrollan directamente sobre hifas indiferenciadas o a partir de conidióforos escasamente ramificados. Los conidios se acumulan en masas mucosas sobre las anélides o



Características microscópicas de *S. apiospermum*.

solitarios y sésiles desarrollándose de las hifas del micelio, lisos, de color pardo amarillento, ovales o elipsoidales (5 - 12 x 4 - 6,5  $\mu\text{m}$ ) con la base truncada.

Presenta anillos hialinos acentuados (figura A).

### 5.1.7 Identificación de *Mucor spp.*

#### 5.1.7.1. Morfología de las colonias.

Las colonias desarrollan rápidamente a 25 °C, cubriendo la superficie del medio de cultivo; crecen pobremente a 37 °C.

El color de las colonias es blanquecino al inicio, con el tiempo cambia a marrón. El reverso de la colonia es blanquecino. La textura es algo-donosa.



Características macroscópicas de *Mucor spp.*

#### 5.1.7.2. Características microscópicas de las colonias.

Presentan hifas aseptadas y gruesas. Se caracteriza por presentar esporangióforos, esporangios. Carecen de apófisis, estolón y rizoides. Las columnelas son hialina, siendo visibles si el esporangio se encuentra intacto. Los esporangios son esféricos o redondos (50 - 300  $\mu\text{m}$

diámetro) y de color gris a negro, estando llenos de esporas.



Características microscópicas de *Mucor spp.*

## 5.1.8 Identificación de *Rhizopus oryzae*.

### 5.1.8.1 Morfología de las colonias.

Colonias de crecimiento rápido a 37 °C a los cuatro días llegan a ocupar totalmente la placa Petri. Inicialmente son blancas pero luego cambian a gris parduscas. No desarrollan a 45 °C.

### 5.1.8.2 Características microscópicas de las colonias.

El micelio carece de septos. Presentan estolones y rizoides. Los esporangióforos no son ramificados, tienen una longitud de 2 mm, generalmente están en grupos, formando verticilos en cuya base se sitúan los rizoides. Las apófisis pueden estar presentes pero son poco evidentes. Presentan esporangios esféricos cuyo ancho es de 50 a 300  $\mu\text{m}$ , los cuales son de color gris pardusco a negro. La columela es subsférica abarcando entre 50 a 70% del esporangio. Las esporangiosporas son angulares y con estrias longitudinales, grisáceas, subes-

féricas o elipsoidales con dimensiones de 6 a 8 x 4 a 5  $\mu\text{m}$ .

### **5.1.9 Identificación de *Absidia corymbifera*.**

#### **5.1.9.1 Morfología de las colonias.**

Colonias que desarrollan rápidamente a los cuatro días, incubando a 37 °C, abarcando la totalidad de la placa Petri. Son colonias de textura algodonosa y de color blanco a pardo.

#### **5.1.9.2 Características microscópicas de las colonias.**

Se caracteriza por presentar hifas aseptadas. Desarrollan rizoides y estolones. Los esporangióforos nacen a partir de los estolones y entre los rizoides, únicos o en grupo



# ANEXOS

*Anexos*



### TÉCNICA DE LISIS CENTRIFUGACIÓN

- 1) Emplear guantes estériles en todo el procedimiento.
- 2) Desinfectar el tapón de goma del tubo *Isolator 10* con alcohol yodado, sin inundar la cavidad. Dejar secar.
- 3) Abrir el sistema *vacoutainer* y colocar la aguja al portatubos.
- 4) Insertar el tubo *Isolator 10* en el portatubos hasta la línea marcada.
- 5) Localizar el área de venopunción y limpiar con algodón impregnado con alcohol al 70%.
- 6) Repetir la limpieza, pero con algodón impregnado con yodo povidona al 2%. Dejar actuar por un minuto.
- 7) No volver a palpar la vena.
- 8) Realizar la venopunción.
- 9) Empujar el tubo hasta el fondo del portatubos o hasta que la sangre fluya al interior del tubo.
- 10) Cuando se llene el tubo (10 mL) retirarlo del portatubo.
- 11) Invertir el tubo cuidadosamente por 4 ó 5 veces, facilitando la lisis celular y evitar la coagulación de la sangre.
- 12) Retirar la aguja del portatubo y desechar apropiadamente.
- 13) Transportar al laboratorio en forma segura.
- 14) Procesar de inmediato, de lo contrario colocar el tubo a temperatura ambiente.

- 15) Centrifugar empleando rotores de 35° de inclinación a 3000 g por 30 minutos.
- 16) Retirar cuidadosamente los tubos de la centrífuga y colocarlos en un gradilla, evitando la mezcla del sobrenadante y sedimento.
- 17) Desinfectar el tapón de goma con alcohol yodado, sin inundar la cavidad. Dejar secar.
- 18) Colocar la gradilla en la prensa *Isostat* y cubrir cada tapón con una cápsula estéril *Isostat*.
- 19) Colocar cada tubo con su cápsula, debajo de la prensa y empujar rápidamente el asa de la prensa hacia abajo.
- 20) Colocar el asa en posición original y realizar la maniobra con cada tubo.
- 21) Retirar la gradilla de la prensa.
- 22) A partir de aquí, se empleará una cabina de seguridad biológica.
- 23) Introducir la punta de una pipeta en el tubo a través de la membrana de la cápsula, manteniendo el tubo comprimido.
- 24) Introducir la pipeta hasta que el bulbo haga contacto con la cápsula.
- 25) Absorber cuidadosamente el sobrenadante.
- 26) Distribuir equitativamente el sedimento en placas Petri conteniendo agar Sabouraud dextrosa y con la punta de la pipeta sembrar en zigzag.
- 27) Desechar la pipeta.
- 28) Colocar las placas sembradas hacia arriba a 35 °C y a las 24 horas se invierte su posición.
- 29) Examinar diariamente por siete días.

## PREPARACIÓN DE REACTIVOS

### B.1 HIDRÓXIDO DE POTASIO

- Pesar:
  - Hidróxido de potasio 10 g
  - Agua destilada 100 mL
- Mezclar para disolver totalmente el KOH.
- Guardar a temperatura ambiente en frasco de color ámbar.
- Se puede agregar glicerina al 10% para tener preparaciones de mayor duración reduciendo la evaporación.
- También se puede agregar dimetilsulfóxido (DMSO) al 40% para reducir o eliminar la necesidad de calentar el preparado.

### B.2 TINTA CHINA

En una lámina portaobjeto colocar:

- Tinta china 1 gota
- Agua destilada o solución fisiológica 1 - 2 gotas
- Emulsificar la muestra.
- Colocar laminilla cubreobjeto.

### B.3 AZUL DE LACTOFENOL

Es empleado para examinar muestras obtenidas a partir de los cultivos. El fenol mata al hongo, el ácido láctico es un agente aclarante que preserva la estructura del hongo, la glicerina previene la desecación y el azul de algodón colorea la quitina y celulosa del hongo.

- Solución A:
  - Fenol (cristales) 20 g
  - Acido láctico 20 g
  - Glicerina 40 mL
  - Mezclar.
  
- Solución B:
  - Azul de algodón 0,05 g
  - Agua destilada 20 mL

Mezclar las soluciones A y B. Conservar a temperatura ambiente hasta por seis meses.

### B.4 COLORACIÓN GIEMSA

#### SOLUCIÓN CONCENTRADA DEL COLORANTE

- Pesar:
  - Giemsa en polvo 0,6 g
  - Metanol 50,0 mL
  - Glicerina neutra 50,0 mL
  
- Pulverizar cristales del colorante antes de pesar.
- Macerar el polvo en un mortero con 30 mL de glicerina.
- Transferir la mezcla a un frasco limpio y completar el volumen de glicerina.
- Colocar al baño María a 55 °C por dos horas.
- Utilizar 20 mL de alcohol para remover el colorante adherido al mortero.
- Retirar el frasco del baño María, dejar enfriar y adicionar el alcohol que fue usado para lavar el mortero y el resto del alcohol.

- Dejar madurar el colorante durante dos semanas y luego filtrar.
- Guardar el filtrado en frasco ámbar.

#### SOLUCIÓN TAMPÓN pH 7,2

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,77 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,59 g
Agua destilada	1 L

#### SOLUCIÓN DE TRABAJO

Solución concentrada del colorante	2 mL
Solución tampón	6 mL
Mezclar la solución antes de usarla	

## B.5 COLORACIÓN GRAM

#### SOLUCIÓN DE CRISTAL VIOLETA

- SOLUCIÓN A

Cristal violeta	4,0 g
Etanol	20,0 mL

Disolver el colorante en etanol y diluir la solución al 1:10 en agua destilada.

- SOLUCIÓN B

Oxalato de amonio	0,8 g
Agua destilada	80,0 mL

Disolver el oxalato en el agua destilada. Mezclar una parte de la solución A con cuatro partes de la solución B.

- SOLUCIÓN DE YODO (LUGOL)

Yodo	1 g
Yoduro de potasio	2 g

Disolver el yodo y el yoduro en 5 mL de agua destilada y completar a un volumen de 240 mL con agua destilada.

- **CONTRACOLORANTE (COLORANTE DE FONDO)**  
Safranina O al 2,5% en alcohol al 95% 10 mL  
Agua destilada 100 mL
- Fijar el frotis con calor o metanol.
- Agregar el cristal violeta. Dejar un minuto.
- Lavar con agua.
- Aplicar lugol. Dejar un minuto.
- Lavar con agua.
- Decolorar con etanol al 95% por 30 segundos.
- Agregar Safranina O. Dejar por 10 segundos.
- Lavar con agua y dejar secar.
- Examinar al microscopio empleando los objetivos de 40X y 100X.

## B.6 REDUCCIÓN DEL NITRATO

- **MEDIO 5X.**  
KNO<sub>3</sub> 5 g  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O 11,7 g  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,14 g  
Solución de cloruro de benzalconio al 17% 1,2 mL  
Agua destilada 200 mL

### Preparación

- Rehidratar con agua destilada los componentes.
- Calentar suavemente hasta disolver.
- Distribuir en un frasco.
- Autoclavar a 121 °C por 15 minutos.
- Dejar enfriar antes de su empleo y refrigerar (4 °C a 10 °C) para su conservación.

### Reactivos

- **Reactivo B**  
Acido sulfanílico 0,16 g  
Acido acético 5M\* 20 mL

- Reactivo A.

$\alpha$ - naftilamina	0,1 g
Acido acético 5M*	20 mL

\*: El ácido acético 5M es preparado adicionando una parte de ácido acético glacial a 25 partes de agua destilada.

## B.7 SOLUCIÓN DE L - DOPA - CITRATO FÉRRICO.

- *Buffer* fosfato

A. Fosfato de sodio dibásico.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (0,067 M)	0,951 g
Agua destilada	100 mL

B. Fosfato de potasio monobásico

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (0,067 M)	0,912 g
Agua destilada	100 mL

Se mezclan volúmenes iguales de A y B (pH final 6,8)

- Solución de L - dopa (L - B - 3,4 - dihidroxifenilalanina)

Suspender la L - dopa en una a tres gotas de dimetilsulfóxido  
Agregar agua destilada hasta alcanzar una concentración final de 3 mg/mL

- Solución de citrato férrico.

Disolver el citrato férrico en agua destilada hasta alcanzar una concentración de 1 mg/mL. Calentar suavemente hasta disolver.

- Solución de L - dopa - citrato férrico.

Solución de L - dopa	1 mL
Solución de citrato férrico	0,5 mL
Buffer fosfato	3,5 mL

Esta solución debe tener un color azul claro.



## PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

### C.1 AUXONOGRAMA DEL CARBONO EN PLACA (ASIMILACIÓN DE CARBOHIDRATOS)

Medio base: se usa como soporte de los discos de azúcares y para observar el crecimiento de las levaduras para su posterior identificación.

- Pesar:
  - Extracto de levadura                      0,67 g
  - Agar noble                                      20 g
  - Agua destilada                                1000 mL
- Disolver los ingredientes en agua destilada.
- Poner en ebullición por un minuto.
- Autoclavar a 121 °C por 15 minutos.
- Conservar en refrigeración a 4 °C.

#### **Discos de azúcares para el auxonograma del carbono**

- Discos de papel filtro estéril de 5 mm de diámetro.
- Carbohidratos (glucosa, lactosa, sacarosa, maltosa, galactosa y rafinosa); 20 g de cada uno.
- Agua destilada 100 mL por carbohidratos.

### Procedimiento

- Disolver cada tipo de azúcar en 100 mL de agua.
- Esterilizar por filtración.
- Sumergir en las distintas soluciones de azúcares durante 24 horas.
- Colocar los discos de papel en una placa Petri y colocar en estufa a 37 °C por 24 horas.
- Guardar los discos en un frasco estéril de boca ancha.

## C.2 AGAR ACEITE DE OLIVA

- Pesar:
  - Agar Sabouraud dextrosa 6,5 g
  - *Tween* 80 2 mL
  - Aceite de oliva 2 mL
  - Vitamina A 10 gotas
  - Cloramfenicol 0,5 g
  - Agua destilada 100 mL
- Disolver el agar Sabouraud dextrosa en agua destilada.
- Agregar los demás ingredientes.
- Esterilizar a 121 °C por 15 minutos.
- Almacenar a 4 °C.

## C.3 AGAR DE DIXON MODIFICADO

- Pesar:
  - Extracto de Malta 36 g
  - Peptona 6 g
  - Agar 12 g
  - Buey de bilis disecada 20 g
  - *Tween* 40 10 mL
  - Monooleato de glicerol 2 mL
  - Acido oleico 2 mL
  - Agua destilada 1000 mL
- Disolver los ingredientes por 15 minutos en un poco de agua.

- Agregar el volumen restante y ebullición.
- Autoclavar a 121 °C por 15 minutos.
- Repartir en tubos de vidrio estériles en posición de plano inclinado.

## C.5 CALDO SABOURAUD

- Seguir las indicaciones proporcionadas por el fabricante.
- Autoclavar a 121 °C por 15 minutos.
- Dispensar alicuota de 7,5 mL en tubo de vidrio estéril con tapa rosca.
- Almacenar a 4 °C.

## C.6 AGAR ARROZ

- Pesar:
 

· Arroz	200 g
· Agar	15 g
· Agua destilada	1000 mL
- Hervir el arroz durante 30 minutos.
- Filtrar con gasa.
- Completar al volumen final.
- Agregar el agar.
- Autoclavar a 121 °C por 15 minutos.
- Repartir en placa Petri estéril.
- Conservar en refrigeración a 4 °C.

## C.7 AGAR HARINA DE MAÍZ

Se utiliza para la producción de pseudohifas de levaduras del género *Candida* y producción de clamidoconidios de *C. albicans*.

- Composición:
 

· Harina de maíz	62,5 g
· Agua destilada	1500 mL

- *Tween* 80 15 g
- Agar 19 ml
- Procedimiento:
  - Disolver la harina de maíz en el agua destilada.
  - Dejar reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
  - Filtrar a través de papel filtro y reconstituir el anterior volumen.
  - Añadir el agar.
  - Añadir el *tween* 80,
  - Esterilizar a 120 °C durante 20 minutos.

## C.7 AGAR PAPA DEXTROSA

Permite la observación de las levaduras a diferentes temperaturas.

- Pesar:
  - Papa 200 g
  - Dextrosa 10 g
  - Agar 20 g
  - Agua destilada 1000 mL
- Pelar y cortar la papa en trozos pequeños. Disolver la dextrosa en agua y agregar los demás ingredientes. Hervir 30 minutos y filtrar con gasa. Completar el volumen. Esterilizar a 121 °C por 15 minutos. Repartir.

## C.8 AGAR MICOSEL O MICOBIÓTICO

Permite distinguir la susceptibilidad a la cicloheximida o actidione.

- Seguir las indicaciones proporcionadas por el fabricante.
- Autoclavar a 121 °C por 15 minutos.
- Dispensar en tubo de vidrio estéril y colocar en forma de plano inclinado.
- Almacenar a 4 °C.

## C.9 AGAR CZAPEK – DOX

Se emplea para la identificación de *Aspergillus spp* y *Penicillium spp*.

- Pesar:
 

· Sacarosa	30	g
· Nitrato de sodio	2	g
· Fosfato dipotásico	1	g
· Sulfato de magnesio	0.5	g
· Cloruro de potasio	0.5	g
· Sulfato ferroso	10	mg
· Agar	15	g
· Agua destilada	1000	mL
- Disolver por calor todos los ingredientes.
- Colocar en ebullición por diez minutos.
- Esterilizar a 121 °C por 15 minutos.
- Envasar.

## C.10 AGAR SEMILLA DE GIRASOL (AGAR DE STAIB O AGAR NIGER SEED)

El medio de cultivo contiene ácido cafeico contenido en el extracto de la semilla de girasol (*Guizzotia abbisinica*) que permite detectar la enzima fenol oxidasa desarrollada por *Cryptococcus neoformans*. La reacción enzimática produce melanina, la cual es absorbida por la pared celular del hongo produciendo un color marrón.

- Pesar:
 

· Glucosa	1,0	g
· Creatina	0,78	g
· Agar	18,0	g
· Cloramfenicol	0,05	g
· Extracto de semilla de girasol	350	mL
- Calentar hasta disolver. Distribuir 50 – 100 mL por frasco. Autoclavar a 121 °C por 15 minutos.
- La preparación del extracto consiste en:

- Pulverizar las semillas de girasol.
- Pesar 70 g del pulverizado y suspenderlo en 350 mL de agua destilada. Hervir. Filtrar con gasa. Autoclavar 15 minutos a 121 °C. Mantener en refrigeración con cierre hermético.
- En el momento de usar, fundir el medio y plaquear. Emplear un control positivo de *Cryptococcus neoformans*, el cual desarrollará una pigmentación marrón y un control negativo de *Candida spp.* que desarrollará de color blanco.

## C.11 AGAR SABOURAUD DEXTROSA

Se le emplea para el aislamiento primario, identificación y mantenimiento de la mayoría de los hongos patógenos. Para mejorar la inhibición bacteriana se puede adicionar cloramfenicol 0,5 g/L.

- Pesar:

· Peptona	10 g
· Glucosa	20 g
· Agar	20 g
· Agua destilada	1000 mL
- Disolver los ingredientes en el agua destilada.
- Controlar el pH a 5,6.
- Esterilizar a 121 °C por 15 minutos.
- Verter en tubos o placas.

## C.12 MEDIO BASE PARA AZÚCARES

Se emplea para proporcionar los requerimientos nutricionales para el desarrollo de levaduras.

### MEDIO BASE

- Pesar:

· Peptona	5 g
· Extracto de carne	1 g
· Cloruro de sodio	5 g
· Agar	15 g
· Agua destilada	990 mL

- Púrpura de bromocresol 10 mL

- Disolver y autoclavar.
- El pH final es de 5,6.

#### INDICADOR

- Pesar:
  - Púrpura de bromocresol 0,1 g
  - Hidróxido de sodio 0,01 N 18,5 mL
- Diluir a 250 mL con agua destilada obteniendo una concentración al 0,04%.

#### AZÚCARES

- Pesar 10 g de cada uno de los siguientes azúcares: glucosa, lactosa, sacarosa, galactosa, maltosa y rafinosa.
- Disolver en agua destilada estéril y esterilizar por filtración (diámetro del filtro 0,2 µm)
- Concentración final de cada azúcar: 10%.

Mezclar cada azúcar con el medio base que se encuentra a 45-50 °C. Repartir en tubos de vidrio con tapa rosca. Controlar a 37 °C por 24 horas.

### C.13 AGAR INFUSIÓN CEREBRO CORAZÓN

Este medio de cultivo favorece la conversión de algunos hongos dimórficos. Para la preparación seguir las recomendaciones proporcionadas por el fabricante.

### C.14 AGAR UREA

Permite evidenciar la producción de ureasa por *Cryptococcus neoformans*, algunas especies de *Candida sp.* *Rodotorula spp.* y *Trichosporon spp.*

- Pesar:
  - Dextrosa 1 g
  - Peptona 1 g

· Cloruro de sodio	5	g
· Monofosfato de potasio	2	g
· Urea	20	g
· Agar	15	g
· Rojo fenol	12	mg
· Agua destilada	1000	mL

- Disolver la urea en 100 mL de agua destilada y esterilizar por filtración.
- Disolver los ingredientes restantes en 900 mL de agua destilada.
- Esterilizar a 121 °C por 15 minutos.
- Enfriar hasta unos 45- 50 °C.
- Agregar la solución de urea en un área estéril.

# ANEXO D

## CLAVE N.º 1

### CLAVE PARA IDENTIFICAR *Trichosporon spp.*

- 1 a. Crecimiento con melibiosa  $\Rightarrow$  2.
- 1 b. No crecen con melibiosa  $\Rightarrow$  3
- 2 a. Tolerante a cycloheximida..... *T. mucoides.*
- 2 b. No toleran la cycloheximida..... *T. cutaneum.*
- 3 a. Crecen con myo-inositol, no crecen con L-arabinosa..... *T. inkin.*
- 3 b. Crecen con myo-inositol, crecen con L-arabinosa  $\Rightarrow$  4.
- 4 a. Colonias con escaso desarrollo, talo consistente de  
clampas de células merstemáticas.....  
..... *Fisussuricella filamenta, T. asteroides.*
- 4 b. Colonias y microscopía  $\Rightarrow$  5.
- 5 a. Apresorio presente en microcultivo..... *T. ovoide.*
- 5 b. Apresorio ausente en microcultivo  $\Rightarrow$  6.
- 6 a. Artroconidia en forma de barril; talos no meristemáticos.....  
..... *T. asahii.*
- 6 b. Artroconidias elongadas, o talos mersitemáticos.....  
..... *T. asteroides.*

## CLAVE N.º 2

### CLAVE MORFOLÓGICA PARA IDENTIFICAR *Geotrichum spp.*

- 1 a. Colonias que crecen rápidamente; hifas marginales de 12  $\mu\text{m}$  de ancho, a menudo con ramificación dicotómica..... *G. candidum.*
  - 1 b. Colonias de moderado crecimiento; hifas marginales de 4  $\mu\text{m}$  de ancho; sin ramificación dicotómica  $\Rightarrow$  2.
  - 2 a. Conidias simpodiales que se producen abundantemente desde cicatrices ..... *G. capitatum.*
  - 2 b. Conidias sympodiales ausentes..... *G. clavatum.*
- 

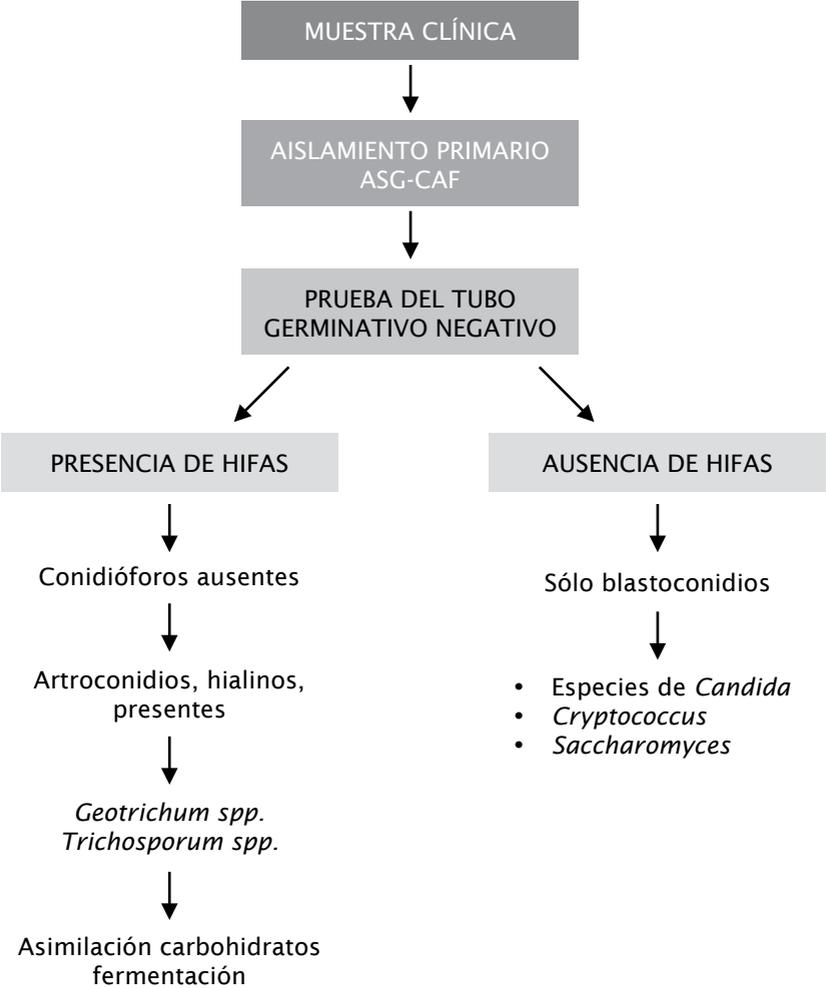
## CLAVE N.º 3

### CLAVE FISIOLÓGICA PARA IDENTIFICAR *Geotrichum spp.*

- 1 a. Asimilan D - Xylosa.....*G. candidum.*
  - 1 b. No asimilan D - Xylosa  $\Rightarrow$  2.
  - 2 a. Asimilan celobiosa, salicina y arbutina.....*G. clavatum.*
  - 2 b. No asimilan celobiosa, salicina y arbutina.....*G. capitatum.*
-

## ANEXO E

### **FLUJOGRAMA DE IDENTIFICACIÓN N.º 1.** *Trichosporon y Geotrichum*



# ANEXO F



**TABLA N.º 1**

**CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y FISIOLÓGICAS DE PRINCIPALES LEVADURAS DE IMPORTANCIA EN SALUD PÚBLICA**

ESPECIES	TG	CHL	TINTA CHINA	PH	FP	ART	LEV	37°C	42°C	SUSCEPTIBILIDAD A LA CICLOHEXIMIDA
<i>Candida albicans</i>	+	+	-	+	-	-	+	+	+	Variable
<i>Candida dubliniensis</i>	+	+	-	+	-	-	+	+	-*	Variable
<i>C. tropicalis</i>	-	-	-	+	+	-	+	+		Sensible
<i>C. glabrata</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	-	Sensible
<i>C. guilliermondii</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	-	Resistente
<i>C. kefyr</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	-	Resistente
<i>C. parapsilosis</i>	-	-	-	+	-	-	+	+	-	Sensible
<i>C. krusei</i>	-	-	-	+	+	-	+	+	-	Sensible
<i>Geotrichum capitatum</i>	-	-	-	+	+	+	+	-*	-	Sensible
<i>Rhodotorula rubra</i>	-	-	+	-	-	-	+	+	-	Variable
<i>Cryptococcus neoformans</i>	-	-	+	-	-	-	+	+		Sensible
<i>Trichosporon mucoides</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	-	Resistente

(\*) Reacciones variables

**TG** : Tubo Germinativo  
**CHL** : Clamidosporas  
**FP** : Formación de película  
**ART** : Artroconidia

**LEV** : Levaduras  
**PH** : Seudohifas/Hifas  
**42 °C** : Desarrollo a 42 °C  
**37 °C** : Desarrollo a 37 °C

TABLA N.º 2

**CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE PRINCIPALES LEVADURAS DE  
IMPORTANCIA EN SALUD PÚBLICA**

ESPECIES	GLU	LAC	SAC	MAL	GAL	RAF	URE	REDUCCIÓN DE NITRATO	FENOLOXIDASA
<i>Candida albicans</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>Candida dubliniensis</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	
<i>C. tropicalis</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	
<i>C. glabrata</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	
<i>C guilliermondii</i>	+	-	+	+	+	+	-	-	
<i>C. kefir</i>	+	+	+	-	+	+	-	-	
<i>C. parapsilosis</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	
<i>C. krusei</i>	+	-	-	-	-	-	-*	-	
<i>Geotrichum capitatum</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Cryptococcus neoformans</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Rhodotorula rubra</i>	+	-	+	+	+/-	+	+	-	
<i>Trichosporon mucoides</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	

**GLU** : Asimilación de glucosa  
**GAL** : Asimilación de galactosa  
**LAC** : Asimilación de lactosa  
**URE** : Degradación de urea

**MAL** : Asimilación de maltosa  
**RAF** : Asimilación de rafinosa  
**SAC** : Asimilación de sacarosa

(\*) Reacciones variables.

**TABLA N.º 3**  
**CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DE *Malassezia furfur* y *M. pachydermatis* CAUSANTES DE INFECCIÓN SISTÉMICA**

ESPECIES	CATALASA	ASG*		DIXON **		
		32 °C	37 °C	32 °C	37 °C	40 °C
<i>M. furfur</i>	+	-	+	+	+	+
<i>M. pachydermatis</i>	+/-	+	+	+	+	-

(\*): Desarrollo sobre agar Sabouraud dextrosa sin suplemento lipídico.

(\*\*): Desarrollo sobre agar de Dixón a 32, 37 y 40 °C.

TABLA N.º 4

CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN  
DE ESPECIES DE *Trichosporon spp.*

	<i>asahii</i>	<i>cutaneum</i>	<i>inkin</i>	<i>mucoides</i>	<i>ovoides</i>
L- Arabinosa	+	+	-	+	
Sorbitol	-	+	-	+	V
Melibiosa	-	+	-	+	-
Myo-inositol	-	+	+	+	-
37 °C	+	-	+	+	V
0,1 % Cycloheximida	+	-	V	+	+
Apresoria	-		+	-	+

TABLA N.º 5

CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DE ESPECIES  
DE *Geotrichum spp.*

	<i>candidum</i>	<i>capitatum</i>	<i>clavatum</i>
Cellobiosa	-	-	+
D-Xylosa	+	-	-
Salicina	-	-	+
Vitamina libre	+	-	-
Arbutina	-	-	+
Crecimiento a 37 °C	V	+	+

**TABLA N.º 6**  
**CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LAS PRINCIPALES ESPECIES**  
**DE *Aspergillus spp.***

ESPECIE	COLONIA		CONIDIÓFOROS	VESÍCULA	NUMERO DE FILAS DE FIALIDES	OTRAS ESTRUCTURAS
	COLOR	TEXTURA				
<i>A. fumigatus</i>	Verde azul oscuro	Pulverulenta	Lisos (300 µm)	Abultada. (20 - 30 µm)	1	
<i>A. flavus</i>	Verde amarillo	Rugosa	Rugosos (2 mm)	Esféricas y voluminosas. (35 - 45 µm)	1 - 2	
<i>A. niger</i>	Negro	Granular	Lisos y largos (6 mm)	Hemisférica y muy voluminosa. (50 - 75 µm)	2	
<i>A. glaucus</i>	Verde amarillo	Rugosa	Liso	Redonda y columnar	1	Cleistotecio

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS  
DE LABORATORIO PARA LA  
IDENTIFICACIÓN DE LOS PRINCIPALES  
HONGOS OPORTUNISTAS CAUSANTES  
DE MICOSIS HUMANAS se terminó  
de imprimir en los talleres gráficos  
de Fimart S.A.C. - Telf.: 424-0662  
Av. Del Río 111 - Pueblo Libre  
Lima - Perú

ISBN: 978-9972-857-62-1



Instituto Nacional de Salud  
Jirón Cápac Yupanqui 1400, Lima 11, Perú  
Apartado Postal 471, teléfono: (0511) 471-9920 Fax: (0511) 471-0779  
Correo electrónico: [revmedex@ins.gob.pe](mailto:revmedex@ins.gob.pe)  
Página web: [www.ins.gob.pe](http://www.ins.gob.pe)