

Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas

Ministerio de Salud del Perú, Instituto Nacional de Salud

Parte 1

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 PRODUCTOS BIOLÓGICOS

Directora General Dra. Silvia Pessah Eljay

CENTRO NACIONAL DE ALIMENTACIÓN Y NUTRICIÓN

Directora General

Mg. María Inés Sánchez-Griñán

CENTRO NACIONAL DE CONTROL DE CALIDAD

Director General Q.F. Alberto Valle Vera

CENTRO NACIONAL DE SALUD INTERCULTURAL

Director General Dr. Neptalí Cueva Maza

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

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

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

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.

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.

1. 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

- **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.
- **Instituto Nacional de Salud.** Bioseguridad en laboratorios de ensayo, biomédicos y clínicos. 3ra ed. Lima: Instituto Nacional de Salud; 2005. Serie de Normas Técnicas N.º 18.
- **Instituto Nacional de Salud.** Manual de procedimientos bacteriológicos en infecciones intrahospitalarias. Lima: Instituto Nacional de Salud; 2001. Serie de Normas Técnicas N.º 28.
- **Negroni 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.

- **Campbell M, Stewart J.** Processing of individual specimens. En: *The Medical Mycology Handbook*. New York: John Wiley & Sons; 1980. p. 139-40.
- **Koneman E, Roberts G.** *Micología. Práctica de laboratorio*. 3ra ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1992.
- **Pemán J, Martín-Mazuelos E, Rubio-Calvo MC.** Guía práctica. Identificación y diagnóstico en micología médica. *Revista Iberoamericana de Micología*; 2001.
- **Arango M, Castañeda E.** *Micosis humanas. Procedimientos diagnósticos. Exámenes directos*. Bogotá: Corporación para Investigaciones Biológicas e Instituto Nacional de Salud; 1995.
- **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.
- **López Martínez R, Méndez L, Hernández F, Castañón R.** *Micología médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio*. México DF: Editorial Trillas; 1995.
- **Torres-Rodríguez, J.** Nuevos hongos patógenos oportunistas emergentes. *Rev. Iberoam. Micol.* 1996. 13: S30-S38.
- **Hazen K.** New and emerging yeast pathogens. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8(4): 462-78.
- **Sullivan D, Coleman D.** Minireview *Candida dubliniensis*: Characteristics and Identification. *J Clin Microbiol* 1998; 36(2): 329-34.
- **Fridkin S, Jarvis W.** Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9(4): 499-511.
- **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.
- **Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ.** *Atlas clinical of fungi*. 2nd ed. Reus: Universitat Rovira I Virgili; 2000.
- **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
- **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.
- **Giusiano GE.** *Malassezia*. Estado del conocimiento y perspectivas en su estudio. *Rev Argent Microbiol* 2006; 38(1): 41-48.
- **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.
- **Guého E, Midgley G, Guillot J.** 1996. The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie van Leeuwenhoek* 1995; 69: 337-55.
- **Haley L, Callaway C.** *Laboratory methods in medical mycology*. Atlanta: U.S. Department of Health, Education and Welfare. Public Health Service. CDC; 1978.

- **Bodey G. Candidiasis.** Pathogenesis, diagnosis, and treatment. 2nd ed. New York: Raven Press; 1993.
- **Laszlo A, Weyer K, Barrera L, Balandrano S, Ridderhof J, Smithwick R, et al.** Bacilos-
copia directa de BAAR. Un programa de capacitación para laboratorios. Atlanta: OMS/
UICter/CDC/OPS/INDRE/APHL; 2000.
- **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

- Hemocultivo: cultivo microbiológico de la sangre.
- Levadura: hongo unicelular redondeado u ovoide que se reproduce sexual o asexual-
mente.
- Hongo: organismo eucariote que pertenece al reino fungi.
- Hifas cenocíticas: hifas no septadas o no tabicadas.
- 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.
- Cápsula: envoltura hialina y gelatinosa que rodea a una célula, formada generalmente de
polisacáridos.
- Candidiasis diseminada: infección producida por el género *Candida* que se expande a
diversos órganos.
- Blastoconidia: conidio holoblástico que se produce en forma solitaria, sincronógena o en
cadenas.
- Pseudomicelio: conjunto de pseudohifas.
- Tubo germinativo: primordio hifal a partir de un conidio.
- Clamidoconidio: conidio tálico, redondo de pared gruesa y de gran tamaño, producido
por modificación de una célula hifal preexistente, considerada de reproducción o de re-
sistencia. También se le denomina como clamidospora.
- Arthroconidias: conidio tálico producido por fragmentación de la hifa y que se libera por
un proceso de rexólisis o de esquizólisis.
- Hongos filamentosos: hongos de aspecto algodonoso que en general se desarrollan como
saprofitos.
- 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 general-
mente tiene septos.
- Fiálide: 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 en-
teroblásticos.

- Conidio: propágulo originado por un proceso de reproducción asexual.
- Conidióforo: hifa especializada sobre la cual se originan directa o indirectamente los conidios.
- Esclerote: masa densa de hifas o pseudoparénquimas que forma una unidad reproductora.
- Métula: rama estéril situada debajo de las fiálides en los géneros *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp.
- Esporodocio: estructura análoga a los apotecios, pero productora de conidios.
- Dematiáceo: hongo provisto de pigmento marrón oscuro o negro, perteneciente a la familia dematiaceae.
- Anélide: célula conidiógena generalmente en forma de botella, caracterizada por presentar una cicatriz en forma de anillo después de cada conidiación.
- Esporangióforo: hifa especializada portadora de un esporangio.
- Esporangio: estructura generalmente vesiculosa que contiene a las esporangiosporas.
- Apófisis: parte abultada de un esporangióforo inmediatamente por debajo de la columna.
- Estolón: hifa horizontal al sustrato, presente en los mucorales, que comunica a dos esporangióforos y de la cual se pueden originar los rizoides.
- Rizoide: rama corta y delgada de un talo semejante a una raíz vegetal.
- 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.
- Esquizolisis: proceso enzimático de separación conidial conidio-célula conideógena o conidio-conidio, a través de la fisión de un septo doble.
- Holoblástico: reproducción asexual por blastoconidios que involucra a toda la fúngica a través de un proceso blástico.
- Enteroblástico: conidio producido por un proceso blástico en donde sólo participa la pared del hongo.
- Reproducción asexual: multiplicación celular por mitosis y que en los hongos da por resultado la producción de conidios.
- Apotecio: ascocarpo abierto plano o en forma de copa.

1.5. Responsabilidades

- 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.
- La Oficina General de Información y Sistemas, supervisa la elaboración, revisión y actualización del presente procedimiento.

- El director general del CNSP, supervisa la aplicación del presente procedimiento en la unidad orgánica a su cargo.
- El director ejecutivo de la dirección ejecutiva de enfermedades transmisibles cumple y hace cumplir lo establecido en este procedimiento.
- El personal profesional y técnico del laboratorio de micología del CNSP, elabora el presente procedimiento.
- 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.
- Los responsables de los establecimientos de salud son los encargados de disponer, supervisar y designar al personal calificado para aplicar las disposiciones establecidas en el presente procedimiento.
- El personal designado debe de aplicar las instrucciones contenidas en el presente procedimiento.

2. 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

- 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.
- Considerar las medidas de asepsia al obtener la muestra, para evitar contaminaciones en los hemocultivos.
- 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.
- 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®).
- 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

- 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.

- 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.
- 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.

- En el caso de los varones deben de retraer el prepucio y las mujeres separar los labios para evitar contaminación exógena.
- 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.

- 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.

- 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.

- 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

- Se realiza en el quirófano o consultorio bajo las más rigurosas reglas de asepsia.
- 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

- 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 éste 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.

- 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.

- 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.

- 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 está 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.

- 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

- Desinfectar con alcohol la zona cutánea alrededor de la inserción del catéter.
- Retirar el catéter.
- Asépticamente, cortar 5 cm del extremo distal e introducir en un contenedor estéril con tapa rosca.
- Rotular y enviar al laboratorio.
- 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 pericatóter.

- Obtener la muestra pasando una torunda en una zona de 2 cm alrededor de la inserción del catéter.
- Introducir la torunda en un medio de transporte (solución salina estéril 0,85%).
- Rotular y enviar al laboratorio.
- 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

- Desinfectar la zona por punzar con yodopovidona al 2%.
- El médico debe de realizar la punción en los espacios intervertebrales L3–L4, L4–L5 o L5–S1.
- Al llegar al espacio subaracnoideo, retirar el estilete y dejar fluir libremente la muestra.
- Recoger un volumen mínimo del espécimen de 5 mL en un tubo estéril con tapa rosca.
- 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*.

3. 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

- 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 inocula 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.

- 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).
- Para las técnicas automatizadas seguir las recomendaciones de los fabricantes de cómo 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

- 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.
- Inocular 1 ó 10 μ L de orina no centrifugada en una placa Petri que contenga agar sabouraud dextrosa con antibiótico (ASD).
- Incubar a 35–37°C por 48–72 horas en aerobiosis.
- En la infección del tracto urinario, el valor del recuento de colonias en la orina no está 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 1.000 UFC/mL: generalmente corresponde a ausencia de infección, con excepción si la muestra fue obtenida por punción suprapúbica.
- Candiduria entre 1.000 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.
- 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

- Transvasar la muestra a una placa Petri estéril. Realizar lavados con solución salina estéril con antibióticos (cloramfenicol al 0,05%).
- Seccionar y triturar la muestra en trozos de 1 a 2 mm con ayuda de pinza y bisturí estéril para obtener un espécimen homogeneizado.
- Flamear al mechero cuatro láminas portaobjetos y en la cara flameada realizar improntas para hacer examen en fresco y coloraciones como Gram y Giemsa.
- 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

- Los métodos más empleados son las técnicas semicuantitativa de Maki y cuantitativa de Brum–Buisson.
- 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.
- 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⁽¹⁾.

⁽¹⁾ Incubación:

- Agar sangre: a 35–37°C, 72 h
- Medio líquido: 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

- 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 0,5 g/L. Evitar el uso de cicloheximida debido a que puede inhibir el desarrollo de mohos, principalmente *Aspergillus spp.*, *Penicillium marneffeii*, y *Cryptococcus neoformans*.
- El LBA se debe de colocar en recipiente estéril y con tapa rosca. La muestra se centrifuga (1.500 g o 3.000 rpm por 30 minutos) y a partir del sedimento se realiza el cultivo.
- 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.
- Los cultivos se deben controlar hasta 45 días.

3.7. Cultivo de líquido cefalorraquídeo

- 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.
- Centrifugar la muestra a 1.500 g o 3.500 rpm por 15 minutos. El sobrenadante puede ser empleado para realizar pruebas serológicas de detección de antígeno de *C. neoformans*.
- 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 aumenta en forma directamente proporcional al volumen de muestra.

- 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.

4. 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 micro-morfología, 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 (ver **figuras 1 y 2**).

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.



Figura 1. Desarrollo de *C. albicans* sobre agar sabouraud dextrosa.

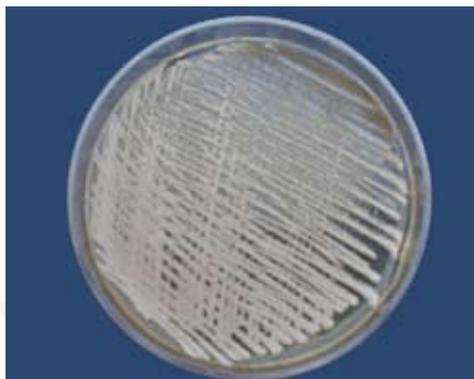


Figura 2. Desarrollo de *C. glabrata* sobre agar sabouraud dextrosa.

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* (ver **figura 3**).

Control negativo: *C. glabrata* (ver **figura 4**).



Figura 3. Tubo germinativo positivo. Cepa de *Candida albicans*.



Figura 4. 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 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* (ver figura 5).

Control negativo: *C. glabrata*.

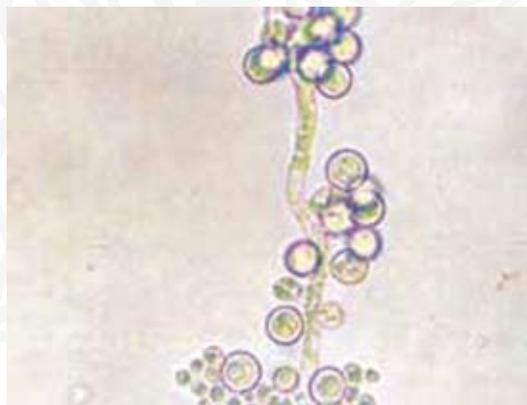


Figura 5. Clamidospora de *Candida albicans*.

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 (ver figura 6).

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 (ver figura 7).



Figura 6. Desarrollo de *Rhodotorula rubra* sobre agar Sabouraud dextrosa después de 72 horas de crecimiento a temperatura ambiente.

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 (ver **figura 8**).

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 (ver **figura 9**).

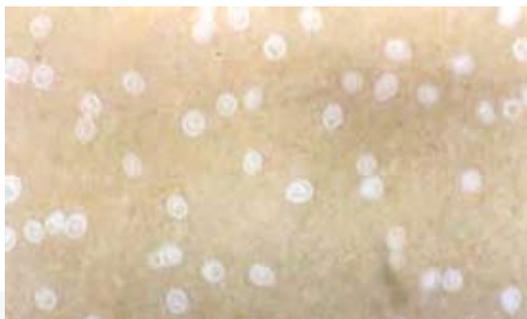


Figura 7. Fina cápsula de *Rhodotorula rubra* visible al examen directo con tinta china.

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 (ver **figura 10**).



Figura 8. Desarrollo de *Trichosporon spp.* sobre agar Sabouraud dextrosa después de 72 horas de crecimiento a 37°C.



Figura 9. Artroconidias de *Trichosporon sp.* (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 (ver **figura 11**).

b) Examen microscópico

Levaduras redondas de 7 a 15 μm 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* (ver **figura 12**).

Control negativo: *Candida albicans*.

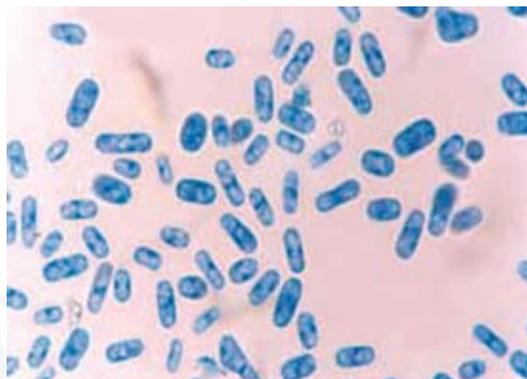


Figura 10. Arthroconidias de *Geotrichum* spp. (objetivo de 100X).

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 (ver **figuras 13, 14 y 15**).

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.

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:



Figura 11. Desarrollo de *Cryptococcus neoformans* sobre agar Sabouraud dextrosa después de 72 horas de crecimiento a 37°C.



Figura 12. Cápsula de polisacárido de *Cryptococcus neoformans* visible al examen directo con tinta china (objetivo de 100X).

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

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 durante 6 horas o a temperatura ambiente durante tres días.



Figura 13. Características bioquímicas de *Rhodotorula rubra*. Convenciones: Glu: glucosa; Sac: sacarosa; Mal: maltosa; Raf: rafinosa; Lac: lactosa; Gal: galactosa; Ure: urea.



Figura 14. Características bioquímicas de *Candida albicans*. Convenciones: Glu: glucosa; Lac: lactosa; Sac: sacarosa; Gal: galactosa; Mal: maltosa; Raf: rafinosa.



Figura 15. Características bioquímicas de *Candida glabrata*. Convenciones: Glu: glucosa; Lac: lactosa; Sac: sacarosa; Gal: galactosa; Mal: maltosa; Raf: rafinosa.

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 (ver figura 16).



Figura 16. 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 (ver figura 17).

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 (ver figura 18).

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 enzima nitrato reductasa).



Figura 17. Caldo negativo de *C. albicans* y caldo positivo de *C. tropicalis*.

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 melamina, 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*.



Figura 18. Cepa resistente de *C. guillermontii* a la cicloheximida y cepa sensible de *C. tropicalis* a la cicloheximida.

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 β -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 de 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 (ver **figura 19**).
- *C. dubliniensis*, de color verde oscuro.
- *C. tropicalis*, colonia de color azul oscuro con un halo púrpuramarrón en el medio de cultivo (ver **figura 19**).
- *C. krusei*, colonias rugosa con el centro rosado y el borde blanco (ver **figura 19**).
- *C. glabrata*, colonia de color violeta morado.

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 (ver **figura 20**).

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 mo-

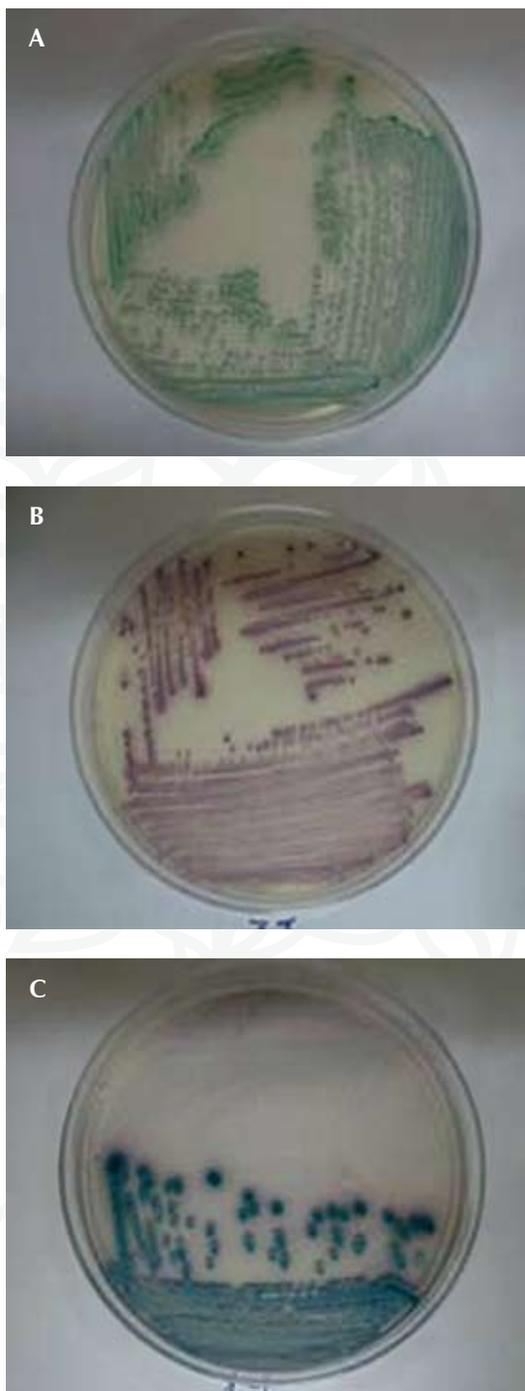


Figura 19. Desarrollo de *Candida albicans* (A), *Candida krusei* (B) y *Candida tropicalis* (C) sobre CHROM agar Candida.

