

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 2

5. 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 o Czapek a 25°C (ver **figura 21**).

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.

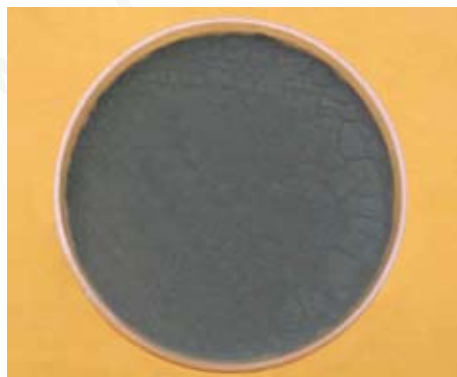


Figura 21. Características macroscópicas de *A. fumigatus*.

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

Presentan conidióforo corto, liso de hasta 300 μm de longitud y de 5 a 8 μm de diámetro, vesícula de 20 a 30 μm de diámetro con fiálides (6 a 8 μm 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 μm de diámetro (ver **figura 22**).

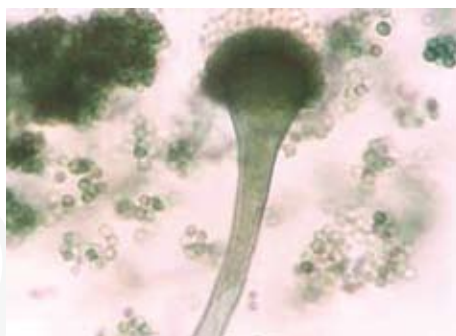


Figura 22. Características microscópicas de *A. fumigatus*.

5.1.4.3. Morfología de las colonias de *Aspergillus flavus*

Las colonias desarrollan rápidamente sobre ASD o agar Czapek a 25°C 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 granulosas, ocasionalmente algodonosas en el centro o margen de la colonia. El reverso de la colonia es incoloro (ver **figura 23**).

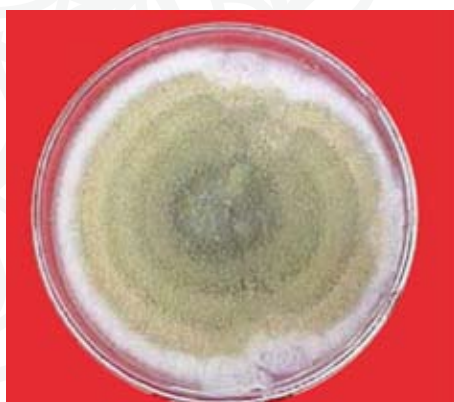


Figura 23. Características macroscópicas de *A. flavus*.

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

Los conidióforos no ramificados de pared gruesa, hialinos, rugosos, de ≥ 1 mm de longitud y de 10 a 20 μm de diámetro. Las vesículas son globosas o subglobosas de 10 a 65 μm de diámetro produciendo fiálides uniobiseriadas alrededor de la vesícula (ver **figura 24**).

Los conidios son de color verde amarillentos, lisos o finamente rugosos, esféricos o subesféricos con un diámetro de 3,5 a 4,5 μm . Los esclerotes pueden estar presentes.

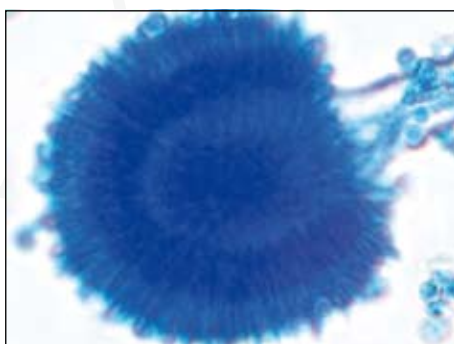


Figura 24. Características microscópicas de *A. flavus*.

5.1.4.5. Morfología de las colonias de *Aspergillus niger*

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

El color de las colonias al principio es blanco a amarillo, luego es negro (ver **figura 25**).

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

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 μm de diámetro. La vesícula es globosa con 50-100 μm de diámetro y produce fiálides alrededor de ella. Las fiálides son biseriadas, las ramas primarias miden 30 μm de largo y pueden estar tabicadas, mientras que las secundarias son cortas y miden 8 μm de longitud, a partir de las cuales brotan los conidios, los cuales son globosos y rugosos con 4 a 5 μm de diámetro, de color castaño o marrón a negro (ver **figura 26**).



Figura 25. Características macroscópicas 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°C 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 esporodoquios (ver **figura 27**).



Figura 26. Características microscópicas de *A. niger*.

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

5.1.5.2. Características microscópicas de las colonias

Se caracteriza por presentar conidióforos de esporodoquios cortos, ramificados. Conidióforos de hifas aéreas generalmente no ramificados, muy largos, reducidos a una simple fiálide 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 más o menos redondeados 28–50 x 4–6 μm (ver **figura 28**). Microconidias en masas mucosas, hialinos, lisos, generalmente unicelulares, pueden ser ligeramente curvados, elipsoidales o subcilíndricos de 7–16 x 2,5–4,5 μm . Presencia de clamidosporas terminales e intercalares, lisas o verrugosas, parduzcas y de hasta 10 μm de ancho.



Figura 27. Características macroscópicas de *F. solani*.

5.1.6. Identificación de *Scedosporium apiospermum*

5.1.6.1. Morfología de las colonias

Crecimiento moderadamente rápido a 25°C, y también pueden desarrollar a 40°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 (ver **figura 29**). 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.

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 solitarios y sésiles desarrollándose de las hifas del micelio, lisos, de color pardo amarillento, ovals o elipsoidales (5–12 x 4–6,5 µm) con la base truncada (**figura 30 A**).

Presenta anillos hialinos acentuados.

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 algodonosa (ver **figura 31**).

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 hialinas, siendo visibles si el esporangio se encuentra intacto. Los esporangios son esféricos o redondos (50–300 µm de diámetro) y de color gris a negro, estando llenos de esporas (ver **figura 32**).

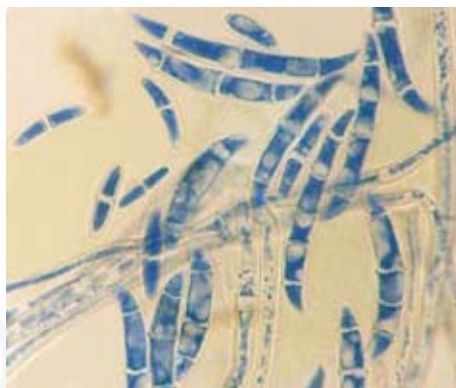


Figura 28. Características microscópicas de *F. solani*.



Figura 29. Características macroscópicas de *S. apiospermum*.

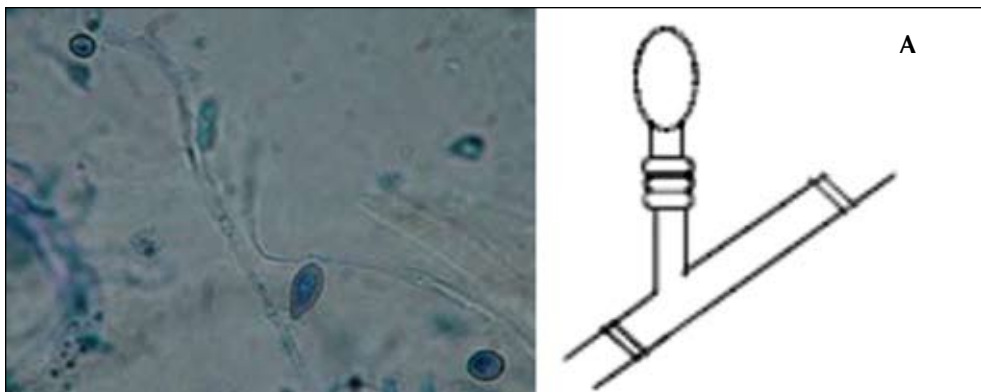


Figura 30 y 30A. Características microscópicas de *S. apiospermum*.

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 verticilios en cuya base se sitúan los rizoides. Las apófisis pueden estar presentes pero son poco evidentes.



Figura 31. Características macroscópicas de *Mucor spp.*

Presentan esporangios esféricos cuyo ancho es de 50 a 300 μm, los cuales son de color gris pardusco a negro. La columela es subesférica abarcando entre 50 a 70% del esporangio. Las esporangiosporas son angulares y con estrías longitudinales, grisáceas, subesféricas o elipsoidales con dimensiones de 6 a 8 x 4 a 5 μm.

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.



Figura 32. Características microscópicas de *Mucor spp.*

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

Anexo A

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 3.000 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.

Anexo B

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 mLMezclar.

- 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 ₂ HPO ₄	6,77 g
KH ₂ PO ₄	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_3	5 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	11,7 g
Na_2HPO_4	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
 α -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
 Na_2HPO_4 (0,067 M) 0,951 g
Agua destilada 100 mL

B. Fosfato de potasio monobásico
 KH_2PO_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-dihidroxi-fenilalanina)

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.

Anexo C

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 1.000 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	1.000 mL
- Disolver los ingredientes por 15 minutos en un poco de agua.
- Agregar el volumen restante y ebulir.
- Autoclavar a 121°C por 15 minutos.
- Repartir en tubos de vidrio estériles en posición de plano inclinado.

C.4. 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.5. Agar arroz

- Pesar:

■ Arroz	200 g
■ Agar	15 g
■ Agua destilada	1.000 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.6. 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	1.000 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 abyssinica*) 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	1.000 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	1.000 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 No. 1

Clave para identificar *Trichosporon spp.*

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

Clave No. 2

Clave morfológica para identificar *Geotrichum spp.*

- 1 a. Colonias que crecen rápidamente; hifas marginales de 12 µm de ancho, a menudo con ramificación dicotómica..... *G. candidum.*
- 1 b. Colonias de moderado crecimiento; hifas marginales de 4 µm de ancho; sin ramificación dicotómica → 2.
- 2 a. Conidias simpodiales que se producen abundantemente desde cicatrices
..... *G. capitatum.*
- 2 b. Conidias sympodiales ausentes..... *G. clavatum.*

Clave No. 3

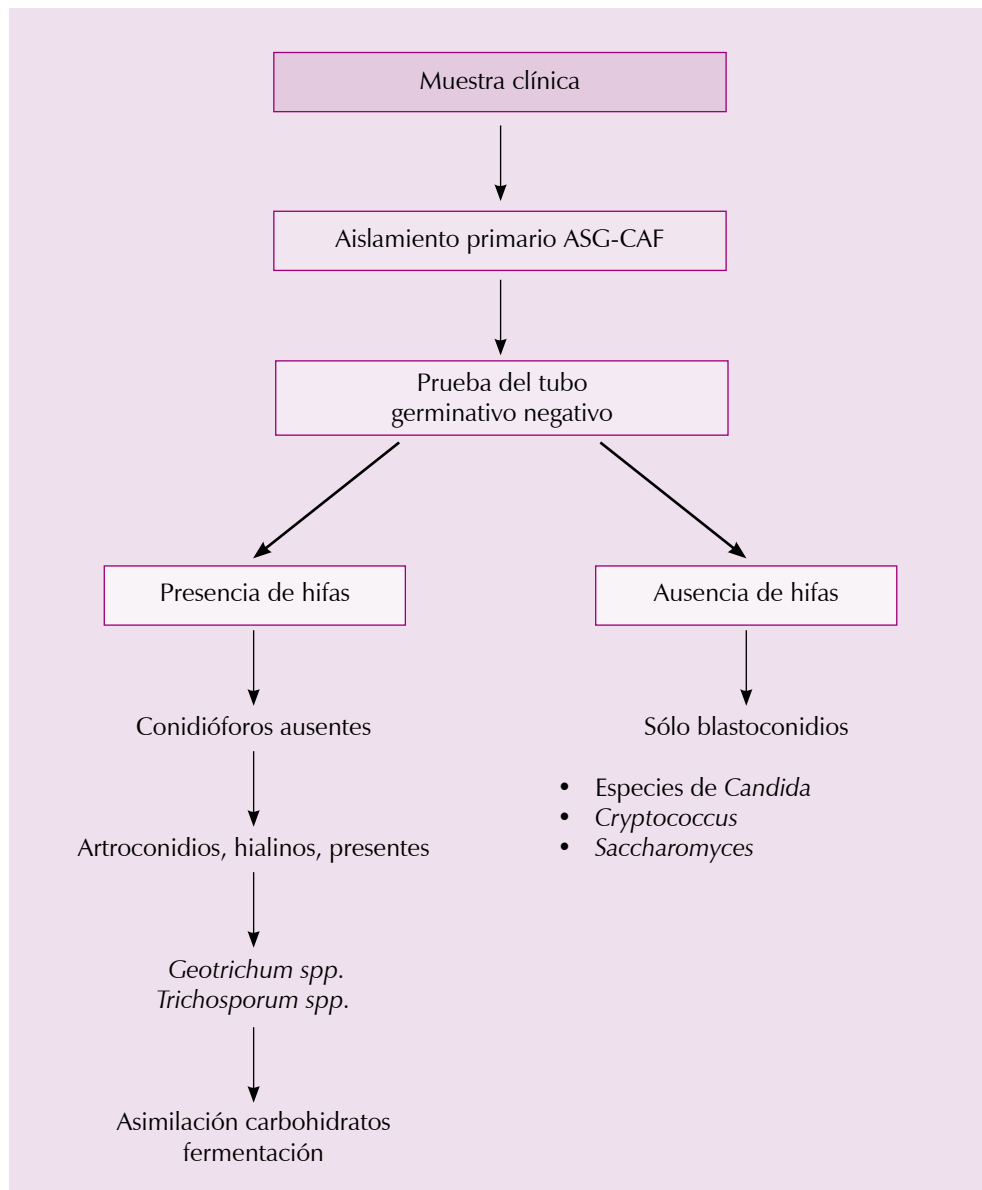
Clave fisiológica para identificar *Geotrichum spp.*

- 1 a. Asimilan D-Xilosa.....*G. candidum.*
- 1 b. No asimilan D-Xilosa → 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 para *Trichosporon* y *Geotrichum*

Procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas



Anexo F

Tabla 1. Características morfológicas y fisiológicas de las 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 guillermundii</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	-	Resistente
<i>C. kefyi</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 2. Características bioquímicas de las principales levaduras de importancia en salud pública

Especies	GLU	LAC	SAC	MAL	GAL	RAF	URE	Reducción de nitrato	Fenoxidasas
<i>Candida albicans</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>Candida dubliniensis</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>C. tropicalis</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>C. glabrata</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C guillermundii</i>	+	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>C. kefyi</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 3. Características fisiológicas de *Malassezia furfur* y *M. pachydermatis* causantes de infección sistémica

Especies	Catalasa	ASG* 32°C	DIXON **			Tween 80 0,1%	Tween 40 0,5%	Tween 20 10%
			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 Dixon a 32°C, 37°C y 40°C.

Tabla 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	-	+	-	+	-
Mio-inositol	-	+	+	+	-
37°C	+	-	+	+	v
0,1% Cicloheximida	+	-	v	+	+
Apresoria	-		+	-	+

Tabla 5. Características fisiológicas de especies de *Geotrichum spp.*

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

Tabla 6. Características morfológicas de las principales especies de *Aspergillus spp.*

Especie	Colonia		Conidióforos	Vesícula	Número de filas de fiálides	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	Rugosa (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