



PERÚ

Ministerio
de Salud

Instituto Nacional
de Salud



MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS PARA EL DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO



2017

MINISTERIO DE SALUD DEL PERÚ

MINISTRA

Patricia García Funegra

VICEMINISTRA DE SALUD PÚBLICA

Silvia Ester Pessah Eljay

VICEMINISTRO DE PRESTACIONES Y

ASEGURAMIENTO EN SALUD

Rodrigo Villaran Contavalli

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

ALTA DIRECCIÓN

Jefe Institucional

Luis Antonio Nicolás Suárez Ognio

Subjefe Institucional

Luis Rodríguez Benavides

ÓRGANOS DE LÍNEA

Centro Nacional de Alimentación y Nutrición

Director General

Médico Cirujano Nelly Mercedes Zavaleta Pimentel

Centro Nacional de Control de Calidad

Director General

Rubén Gaspar Tabuchi Matsumoto

Centro Nacional de Productos Biológicos

Directora General

Natalia Paola Ramírez Ocola

Centro Nacional de Salud Intercultural

Director General

Aldo Lucchetti Rodríguez

Centro Nacional de Salud Ocupacional y

Protección del Ambiente para la Salud

Directora General

María del Carmen Gastañaga Ruiz

Centro Nacional de Salud Pública

Director General

Luis Alberto Vergara Fernandez

ÓRGANOS DE ASESORAMIENTO

Oficina General de Asesoría Técnica

Director General (e)

Epifania Soledad Rodríguez Ampuero

Oficina General de Asesoría Jurídica

Director General

Martha Cecilia Estrella Gómez

Oficina General de Investigación y

Transferencia Tecnológica

Director General

Hans Demetrio Vasquez Soplopuco

ÓRGANOS DE APOYO

Oficina General de Administración

Director General

Cinthya Otani Cano

Oficina General de Información y Sistemas

Director General

Eduardo Henry Zorilla Sakoda

COMITÉ EDITOR

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

PRESIDENTE

Luis Antonio Nicolás Suárez Ognio

MIEMBROS

Zuño Burstein Alva

Jimmi Carreazo Pariasca

César cabezas Sánchez

Daniel Cárdenas-Rojas

Víctor Fiestas Solórzano

Elena Gonzales Achuy

Marco Bartolo Marchena

Rosalina Inga Arellano

Luis Moreno Exebio

Walter Cáceres Leturia

Joel Roque Henriquez

Ofelia Mamani Apaza

Jhonnell Alarco Urquizo

Secretaría Técnica

Bertha Huarez Sosa



PERÚ

Ministerio
de Salud

Instituto Nacional
de Salud



MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS PARA EL DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO

ELABORADO POR:

Med. Susana Zurita Macalupú
Blga. Flor Urcia Ausejo

COLABORADORA:

Tec. Lab. Alida Navarro Mariñas

Catalogación hecha por el Centro de Información y Documentación Científica del INS

Zurita Macalupú, Susana Rosa

Manual de procedimientos técnicos para el diagnóstico micológico / Elaborado por Susana Zurita Macalupú y Flor Urcia Ausejo, con la colaboración de Alida Navarro Mariñas .-- Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 2017.

134 p. : il., tab.; 14,8 x 21,0 cm.

1. MICOLOGÍA / métodos 2. TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS
DIAGNÓSTICOS 3. MICOSIS 4. TÉCNICAS DE TIPIFICACIÓN
MICOLÓGICA 5. ANTIFÚNGICOS 6. PERÚ

- I. Zurita Macalupú, Susana Rosa
- II. Urcia Ausejo, Flor Cecilia
- III. Navarro Mariñas, Flor Alida
- IV. Perú. Ministerio de Salud
- V. Instituto Nacional de Salud (Perú). Centro Nacional de Salud Pública

ISBN: 978-612-310-094-0

Hecho el Depósito Legal en la Biblioteca Nacional del Perú N° 2017-00023

Ira. edición (enero, 2017)

Tiraje: 1200 ejemplares

© Ministerio de Salud, 2017

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

Teléfono: (511) 315-6600

Página web: www.minsa.gob.pe

© Instituto Nacional de Salud, 2017

Cápac Yupanqui 1400, Jesús María, Lima, Perú

Teléfono: (511) 748-1111

Correo electrónico: postmaster@ins.gob.pe

Página Web: www.ins.gob.pe

Diagramación e Impresión por:

SOLVIMA GRAF S.A.C

R.U.C. 20382602430

Jr. Emilio Althaus N° 406, Oficina 301

Lince - Lima - Perú

La versión electrónica de este documento se encuentra disponible en forma gratuita en www.ins.gob.pe

Prohibida la reproducción total o parcial de esta obra por cualquier medio sin autorización del Instituto Nacional de Salud.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

SECCIÓN 1: GENERALIDADES

1.1. Objetivo	8
1.2. Ámbito de aplicación	8
1.3. Responsabilidades	8
1.4. Documentos de referencia	9
1.5. Definiciones y abreviaturas	10

SECCIÓN 2: DISPOSICIONES GENERALES

2.1. Bioseguridad	15
2.2. Obtención, Transporte y conservación de muestras	15

SECCIÓN 3: EXAMEN DIRECTO CON HIDRÓXIDO DE POTASIO 10%

3.1. Fundamento del método	16
3.2. Tipo de muestra.....	16
3.3. Equipos requeridos	16
3.4. Insumos requeridos	16
3.5. Condiciones previas.....	17
3.6. Procedimiento	17
3.7. Resultados	18
3.8. Interpretación de resultados	18
3.9. Control de Calidad Interno	20
3.10 Fotos de examen directo con Hidróxido de Potasio al 10%	22

SECCIÓN 4: CULTIVO Y TIPIFICACIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS

4.1. Fundamento del método	23
4.2. Tipo de muestra.....	23
4.3. Equipos requeridos	23
4.4. Insumos requeridos	23
4.5. Condiciones previas.....	24
4.6. Procedimiento	24

4.7. Resultado	24
4.8. Interpretación de resultados	25
4.9. Control de Calidad Interno	40
4.10 Fotos de cultivo y observación microscópica de hongos filamentosos.....	42

SECCIÓN 5: CULTIVO Y TIPIFICACIÓN DE HONGOS DIMÓRFICOS

5.1. Fundamento del método	47
5.2. Tipo de muestra.....	47
5.3. Equipos requeridos	47
5.4. Insumos requeridos	47
5.5. Condiciones previas.....	48
5.6. Procedimiento	48
5.7. Resultado.....	49
5.8. Interpretación de resultados	49
5.9. Control de Calidad Interno	51
5.10 Fotos de Cultivo y observación microscópica de hongos dimórficos	52

SECCIÓN 6: CULTIVO Y TIPIFICACIÓN DE HONGOS LEVADURIFORMES

6.1. Fundamento del método	54
6.2. Tipo de muestra.....	54
6.3. Equipos requeridos	54
6.4. Insumos requeridos	54
6.5. Condiciones previas.....	55
6.6. Procedimiento	55
6.7. Resultados	55
6.8. Interpretación de resultados	56
6.9. Control de calidad interno.....	58
6.10 Fotos de estructuras de hongos levaduriformes.....	59

SECCIÓN 7: DIFUSIÓN EN DISCOS PARA LA DETERMINACIÓN DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA DE HONGOS LEVADURIFORME *Candida spp.*

7.1. Fundamento del método	60
7.2. Tipo de muestra.....	60
7.3. Equipos requeridos	60
7.4. Insumos requeridos	60
7.5. Condiciones previas.....	61

7.6. Procedimiento	62
7.7. Resultados	63
7.8. Interpretación de resultados	63
7.9. Control de calidad interno	63

SECCIÓN 8: INMUNODIFUSIÓN EN GEL AGAR PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA ANTÍGENOS DE *Histoplasma capsulatum*

8.1. Fundamento del método	66
8.2. Tipo de muestra.....	66
8.3. Equipos requeridos	66
8.4. Insumos requeridos	66
8.5. Condiciones previas.....	67
8.6. Procedimiento	67
8.7. Resultados	69
8.8. Interpretación de resultados	69
8.9. Control de calidad interno.....	70
8.10 Foto de la prueba de Inmunodifusión.....	72

SECCIÓN 9: MÉTODO VOLUMÉTRICO PARA LA DETERMINACIÓN DE ESPORAS FÚNGICAS EN UFC/M³ EN UN AMBIENTE INTERNO

9.1. Fundamento del método	73
9.2. Tipo de muestra.....	73
9.3. Equipos requeridos	73
9.4. Insumos requeridos	73
9.5. Condiciones previas.....	74
9.6. Procedimiento	74
9.7. Resultados	75
9.8. Interpretación de resultados	76
9.9. Control de calidad interno.....	76

BIBLIOGRAFÍA	77
--------------------	----

ANEXOS

ANEXO I: Preparación de soluciones, medios de cultivo y coloraciones.....	80
ANEXO II: Ficha de bioseguridad <i>Candida spp.</i>	104
ANEXO III: Inmunodifusión en gel agar - plantilla de distribución de pocillos ...	106

ANEXO IV: Inmunodifusión en gel agar - mapa de distribución	106
ANEXO V: Inmunodifusión en gel agar - lectura de resultados.....	106
ANEXO VI: Listado formularios de control de calidad	107
ANEXO VII: Formularios de control de calidad	108
ANEXO VIII: Diagramas de flujo, figuras y tablas	122
ANEXO IX: Cuadro “Corrección Estadística de Feller”	128
ANEXO X. Ficha de bioseguridad de hongos ambientales.....	129

INTRODUCCIÓN

El Instituto Nacional de Salud a través del Centro Nacional de Salud Pública, promueve el fortalecimiento y la capacidad de respuesta del Sistema Nacional de la Red de Laboratorios en Salud Pública. En tal sentido, la calidad de respuesta se enmarca en generar evidencias con metodología reproducibles, estandarizadas nacional e internacionalmente.

En este contexto, el Laboratorio de Micología del Centro Nacional de Salud Pública del Instituto Nacional de Salud (INS) ha elaborado el presente Manual de Procedimientos Micológicos, a fin de actualizar y uniformizar los conocimientos referidos al diagnóstico micológico que se basa en la identificación precisa de los agentes causales de las micosis, aislados a partir de muestras clínicas representativas, así como también en pruebas de susceptibilidad antifúngica.

Los autores

SECCIÓN 1: GENERALIDADES



1.1 Objetivo

Establecer los procedimientos estándar de los métodos que se ejecutan en un laboratorio de micología.

1.2 Ámbito de aplicación

Se aplica en los laboratorios de establecimientos de salud que cuenten con personal calificado, instalaciones, equipos y materiales idóneos para llevar a cabo el diagnóstico directo, cultivo, tipificación y susceptibilidad de la micosis humana a partir de muestras de pacientes hospitalizados y pacientes ambulatorios.

1.3 Responsabilidades

- El Centro Nacional de Salud Pública (CNSP) a través de su Dirección Ejecutiva de Enfermedades Transmisibles es responsable de autorizar la elaboración, revisión y actualización del presente manual, de acuerdo con los procedimientos aprobados por el Instituto Nacional de Salud (INS).
- Los jefes o responsables de los laboratorios de salud deben asegurar el control de calidad interno, la idoneidad del personal, equipos, materiales, reactivos e instalaciones.
- El personal del establecimiento de salud es responsable de planificar las acciones, organizar, controlar y cumplir las disposiciones contenidas en el presente manual.

- El personal médico, técnico y operativo es responsable de seguir las especificaciones técnicas contenidas en el presente manual y aplicar los procedimientos específicos indicados.

1.4 Documentos de referencia

- Instituto Nacional de Salud. Manual de procedimientos de laboratorio para la obtención y envío de muestras. Lima: INS; 1997. Serie de Normas Técnicas N.º 15.
- Instituto Nacional de Salud. Manual de bioseguridad en laboratorios de ensayo, biomédicos y clínicos. 3.a ed. Lima: INS; 2005. Serie de Normas Técnicas N.º 18.
- Instituto Nacional de Salud. Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para el diagnóstico de micosis oportunistas y profundas. Lima: INS; 1997. Serie de Normas Técnicas N.º 23.
- Instituto Nacional de Salud. Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas. Lima: INS; 2007. Serie de Normas Técnicas N.º 44.
- Peman, Javier; Martín-Mazuelos Estrella; Rubio Calvo, M. Carmen. Guía práctica. Identificación y diagnóstico en Micología clínica. Revista Iberoamericana de Micología. Edición Ergon. Madrid, España. 2001.
- Arango, Myrtha; Castañeda, Elizabeth. Micosis humanas. Procedimientos diagnósticos. Exámenes directos. Editorial Presencia. Santafé de Bogotá. 1995.
- Negroni, Ricardo. Manual de procedimientos para laboratorios de Micología Médica. Buenos Aires, Argentina. 2000.
- Campbell, Mary; Stewart, Joyce. The Medical Mycology Handbook. Editorial United States of America. 1980.
- López-Martínez R, Méndez-Tovar LJ, Hernández-Hernández F, Castañón-Olivares R. Micología médica: Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio. Edit. Trillas. México D.F. 1995.
- Koneman, Elmer; Roberts, Glenn. Micología: Práctica de Laboratorio. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 1992.

- Clinical and Laboratory Standards Institute National Committee for Clinical Laboratory Standards Reference. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Guideline. Second Edition. CLSI document M44-A2. Wayne, PA: Volume 29 Number 17. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.

1.5 Definiciones y abreviaturas

- **Aseptado.** Referente al filamento fúngico, que carece de septos. Sinónimo de cenocítico.
- **Anticuerpo.** Son glicoproteínas del tipo gamma globulina, que se encuentran de forma soluble en la sangre u otros fluidos corporales de los vertebrados, y son empleados por el sistema inmunitario para identificar y neutralizar elementos extraños tales como hongos, bacterias, virus o parásitos.
- **Antígeno.** Es una sustancia que desencadena la formación de anticuerpos y puede causar una respuesta inmune. Los antígenos son usualmente proteínas o polisacáridos.
- **Blastoconideo.** Conideo holoblástico que se produce en forma solitaria, sincronógena o en cadenas.
- **Cápsula.** Envoltura hialina y gelatinosa que rodea a una célula, formada generalmente por mucopolisacáridos.
- **Cepa ATCC.** Es un material biológico de referencia certificado. La colección certifica que se suministra una determinada cepa, que es un cultivo puro, al cual se le ha realizado pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares.
- **Clamidoconidio o clamidospora.** Conideo tálico, redondo, de pared gruesa y de gran tamaño, producido por modificación de una célula hifal preexistente, considerada de reproducción o resistencia. Anteriormente conocido como clamidospora.
- **Conidio.** Estructuras propagativas no móviles de los hongos producidas al extremo de un conidióforo.
- **Conidióforo.** Hifa especializada sobre la cual se originan directa o indirectamente los conideos.
- **Dermatofito.** Hongo queratonofílico que pertenece a uno de los géneros siguientes: *Trichophyton*, *Microsporum* o *Epidermophyton*.

- **Dimorfismo.** Propiedad que tienen algunos hongos patógenos de presentar una morfología en vida libre y otra diferente, en fase parasitaria.
- **Escamas.** Son colecciones de partículas del epitelio queratinizado de piel, uñas y/o pelo.
- **Espora.** Estructura producida por un proceso sexual (oospora, zigospora, ascospora, basidiospora). Las estructuras asexuales contenidas en los esporangios de los mucorales también se denominan esporas (esporangiosporas)
- **Esporas fúngicas.** Son células reproductivas producidas por los hongos.
- **Esporangiospora.** Espora asexual que se produce dentro de un esporangio.
- **Esporangio.** Estructura generalmente vesiculosa que contiene a las esporangiosporas.
- **Esporangióforo.** Hifa especializada portadora de un esporangio.
- **Esterigma.** Punto de estrechamiento que origina una basidiospora sobre un basidio.
- **Equipo colector Zefon A-6 de partículas microbianas.** Es un instrumento que está basado en el principio del muestreador de aire Andersen, el cual aspira aire a través de 400 agujeros perforados en un cono colector. El volumen de aire aspirado es un valor constante, equivalente a un 1 ACFM (28,3 L por minuto). El flujo de aire resultante es dirigido sobre una placa Petri estándar de agar. Después del ciclo de colección, la placa Petri es incubada y se cuentan las unidades formadoras de colonias (UFC).
- **Fermentación.** Capacidad de algunos hongos de utilizar diversos azúcares como fuente de energía con producción de ácido y gas.
- **Fialide.** Estructura conidiógena generalmente en forma de botella en la cual se producen los conidios en forma basipeta; el primer conidio es holoblástico y los siguientes son enteroblásticos.
- **Gemación.** Forma de multiplicación de las levaduras en donde la célula hija se desarrolla a partir de un brote (gema o yema) de la célula madre.
- **Halo de inhibición.** Este es un resultado cualitativo, cuyo diámetro será directamente proporcional a la potencia del antifúngico frente al hongo en cuestión e inversamente proporcional a la concentración inhibitoria mínima (CIM) del agente antifúngico.

- **Hifa.** Se visualiza como elemento hialino de forma alargada y/o tabicada. Representa la unidad estructural de la mayoría de hongos.
- **Hifa en espiral.** Hifa torcida es espiras.
- **Hialino.** Incoloro, transparente.
- **Hidróxido de potasio al 10%.** Es una solución que disuelve la queratina y aclara la capa cornea de la piel y los anexos cutáneos, sin afectar la morfología de los elementos fúngicos, permitiendo una mejor visualización de los mismos.
- **Inmunidad.** Estado de resistencia que suele provenir de la presencia de anticuerpos o células que poseen una acción específica contra el microorganismo causante de una enfermedad infecciosa o contra su toxina.
- **Inmunodifusión.** Técnica para la identificación de cualquiera de las inmunoglobulinas y se basa en la presencia de un precipitado visible, resultado de la combinación antígeno-anticuerpo.
- **Levadura.** Se visualizan como elemento hialino de forma esférica u ovalada que pueden presentar brote y/o pseudohifas.
- **Levadura.** Hongo unicelular redondeado u ovoide que se reproduce sexual o asexualmente.
- **Levaduriforme.** Célula fúngica que tiene forma de levadura.
- **Macroconidia.** Se denomina también cloterosporos o husos. Son conidias que pueden alcanzar tamaño muy grande por estar constituidas por varias células pueden tener una o dos paredes externas, lisas o rugosas; poseen dos extremos, uno basal, que les sirve para insertarse, y otro distal; este último puede ser puntiagudo, rombo o doblado; las macroconidias pueden nacer solitarias; o bien en grupos o en racimos; en la generalidad de los casos se forman a partir de conidióforos.
- **Metula.** Rama estéril situada debajo de las fialides en los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*.
- **Micelio.** Conjunto de hifas que constituye el cuerpo (talo) de un hongo.
- **Micelio Aéreo.** Micelio que se desarrolla sobre el sustrato y en el cual se encuentran las estructuras reproductoras.

- **Micelio vegetativo.** Conjunto de hifas que se desarrollan en el interior del sustrato y su función principal es nutricional.
- **Microconidia.** Se denominan también aleurias, son muy pequeñas y generalmente unicelulares; son en la mayor parte de los casos sésiles y se forman desordenadamente, en general presentan la forma ovoide o ligeramente alargadas.
- **Oportunista.** Microorganismo que habitualmente no causa enfermedad, pero que al producirse algún fenómeno de inmunosupresión en el huésped, lo puede infectar.
- **Queratina.** Proteína fibrosa y resistente que representa la mayor parte del material contenido en las células que forman la epidermis de la piel.
- **Septo.** Elemento formado de la pared de la hifa, limitando una articulación, pero permitiendo la circulación citoplasmática entre las células por uno o varios poros.
- **Pseudohifa.** Estructura filamentosa resultante del desarrollo de blastoconidios que permanecen unidos por sus extremos, aunque la separación entre cada célula es completa y no existe comunicación citoplasmática.
- **Pseudomicelio.** Conjunto de pseudohifas.
- **Susceptibilidad antifúngica.** Proceso conocido habitualmente como antifungigrama, guía la elección del tratamiento antimicótico. Se utilizan diferentes métodos como difusión con discos y la microdilución. La información que se genera (sensible, intermedio o resistente) predice la eficacia clínica en la elección de un antimicótico.
- **Unidades formadoras de colonia/metro cúbico (UFC/M3).** Es un valor que indica el grado de contaminación microbiológica de un ambiente. Expresa el número relativo de microorganismos de un taxón determinado en un volumen de un metro cúbico.
- **Uniseriado.** Cabeza aspergilar en la cual se observa que las fialides se originan directamente de la vesícula y que carecen de metulas.

SIGLAS

APD	Agar papa dextrosa
ASD	Agar Sabouraud dextrosa
BHI	Infusión cerebro corazón
CIM	Concentración mínima inhibitoria
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CNSP	Centro Nacional de Salud Pública
CYA	Agar extracto de levadura
EPP	Equipo de protección personal
KOH	Hidróxido de potasio
MEA	Agar extracto de malta
NBS 2	Nivel de bioseguridad 2
OA	Agar harina de avena
SSE	Solución salina estéril
ATCC	American Type Culture Collection
ACFM	Pie cubico por minuto
ISO	Organización internacional de normalización
UFC	Unidades formadoras de colonia

SECCIÓN 2: DISPOSICIONES GENERALES



2.1 Bioseguridad

Es un conjunto de medidas preventivas, destinadas a proteger la salud y seguridad del personal, durante su trabajo en los laboratorios donde se manipula productos biológicos y químicos. El principal producto biológico que se procesa en las pruebas de diagnóstico micosis humana son escamas de piel, uñas, pelo, mucosa, sangre, suero sanguíneo, biopsias, líquido cefalorraquídeo y secreciones.

Los laboratorios donde se realizan estas pruebas diagnósticas son de nivel de bioseguridad 2, por lo que el personal deberá usar equipo de protección personal y aplicar las medidas generales de bioseguridad, contenidas en el Manual de bioseguridad en laboratorios de ensayo, biomédicos y clínicos. 3.ª ed. Lima: INS; 2005. Serie de Normas Técnicas N.º 18.

2.2 Obtención, transporte y conservación de muestras

Para la obtención, transporte y envío de muestras, aplicar lo consignado:

- Manual de Procedimientos de Laboratorio para la Obtención y Envío de Muestras. Lima: INS; 1997. Serie de Normas Técnicas N.º 15.
- Manual de Procedimientos y Técnicas de Laboratorio para el Diagnóstico de Micosis Oportunistas y Profundas. Lima: INS; 1997. Serie de Normas Técnicas N.º 23.
- Manual de Procedimientos y técnicas de Laboratorio para la Identificación de Principales Hongos Oportunistas Causantes de Micosis Humanas. Lima: INS; 2007. Serie de Normas Técnicas N.º 44.

SECCIÓN 3:

EXAMEN DIRECTO CON HIDRÓXIDO DE POTASIO AL 10%



3.1 Fundamento del método

El hidróxido de potasio al 10%, es una solución que disuelve la queratina y se utiliza para muestras clínicas con abundantes células y restos celulares, sin afectar la morfología de los elementos fúngicos, permitiendo una mejor visualización de los mismos.

3.2 Tipo de muestra

Muestras clínicas de piel, uña y cabello.
Secreciones: vaginal, ótica, heridas.

3.3 Equipos requeridos

Microscopio binocular.
Mechero Bunsen.

3.4 Insumos requeridos

Materiales

- a. Lámina portaobjeto 75 x 25 mm, limpia y desengrasada.
- b. Lámina cubreobjetos 22 x 22 mm.
- c. Pipeta de transferencia estéril de 2 mL.
- d. Frasco color ámbar y con tapa.

- e. Asa de siembra.
- f. Guantes estériles descartables.
- g. Respirador N95.
- h. Mandil o chaqueta.
- i. Plumón marcador.
- j. Bolsas de bioseguridad para eliminar residuos.
- k. Contenedor para residuos sólidos.
- l. Papel toalla.
- m. Papel plastificado.
- n. Contenedor de plástico para material punzocortante.

Reactivo

- a. Hidróxido de potasio al 10% (KOH 10%).
- b. Hipoclorito de sodio comercial.

3.5 Condiciones previas

Preparar el hidróxido de potasio al 10% (ver Anexo I: Soluciones, medios de cultivo y coloraciones).

3.6 Procedimiento

- a. Con un plumón marcador, escribir en el borde de la lámina portaobjeto el código de la muestra clínica a examinar.
- b. Dispensar una gota del KOH al 10% en el centro de la lámina portaobjeto.
- c. Esterilizar a la llama el asa de siembra.
- d. Agregar con el asa de siembra, sobre la gota del KOH 10%, una porción de la muestra clínica a examinar.
- e. Colocar una laminilla cubreobjetos encima de la preparación y dejar a temperatura ambiente por tres minutos.
- f. Observar al microscopio con objetivos de 10X y 40X.

3.7 Resultados

Negativo: ausencia de elementos fúngicos

Positivo: se observa elementos fúngicos y se reporta de la siguiente manera:

- Presencia de hifas hialinas y tabicadas.
- Presencia de levaduras.
- Presencia de hifas y levaduras.

3.8 Interpretación de resultados

En algunos casos el resultado positivo se asocia a los siguientes géneros o especies:

Eumicetales (examen macroscópico de granos)

- 1 Granos negros, redondos o lobulados..... 2
- 2 Granos duros y quebradizos de 0,5 a 1mm de diámetro *M. mycetomatis*
- 2' Granos blandos al principio y después muy duros, de 1mm de diámetro..... *M. grisea*

Eumicetales (examen microscópico de granos)

Se observan hifas filamentosas gruesas, vesiculosas de 2 a 5 μ de diámetro *Madurella spp.*

Actinomicetales (examen macroscópico de granos)

- 1 Granos amarillentos, consistencia blanda, lobulados..... 2
- 1' Granos blanco amarillentos, algunos de color rosado, consistencia blanda, lobulados..... 3
- 1'' Granos rojo coral, consistencia dura, redondos u ovals 4
- 2 Granos que miden entre 150 a 500 μ de diámetro *Nocardia spp.*

- 3 Granos de 1 a 5 mm de diámetro*Actinomadura madurae*
- 4 Granos de 200 a 500 μ de diámetro*Actinomadura pelletieri*

***Actinomicetales* (examen microscópico de granos)**

Se observan elementos bacilares filamentosas, menor de 1μ de diámetro.....

.....
Nocardia spp

Sporothrix schenckii

- 1 Se observan levaduras redondas u ovoides, cuerpos en forma de cigarro o cuerpos asteroides.

Paracoccidiodes brasiliensis

- 1 Se observan levaduras redondas cuya característica es la de tener dos o más brotes en la superficie en la forma de “timón de barco” 2
- 2 En ocasiones, estos blastoconidios se disponen en forma catenulada y las gemaciones tienen una base muy estrecha..... 3
- 3 En ocasiones las levaduras son ovales o elípticas; cuando son jóvenes miden entre 5 y 10 μ y las maduras de 30 a 50 μ

***Otras Levaduras* (hifas, pseudohifas, blastoconidias)**

- 1 Si se observan verdaderas hifas que se fragmentan en arthroconidias sugiere especies de *Geotrichum spp* y *Trichosporon spp*.
- 2 Si se observan arthroconidias y blastoconidias que nacen en brotes de los ángulos de las arthroconidias con aspecto de “oreja de conejo” sugiere especies de *Trichosporon spp*. Y si tiene aspecto de “palo de hockey” sugiere especies de *Geotrichum spp*.
- 3 Si se observan blastoconidias y pseudohifas con puntos regulares de estrechamiento, sugiere alguna especie de *Cándida spp*.

- 4 Blastocnidios en pequeñas cantidades, muy esparcidas o en pequeños grupos a lo largo de las pseudohifas, sugiere *Cándida tropicalis*.
- 5 Blastocnidios producidos en densos racimos regulares espaciados a lo largo de las pseudohifas, sugiere *Cándida albicans*
- 6 Blastocnidios elongados dispuestos en racimo paralelos que parecen troncos en una corriente de agua, sugiere *Cándida pseudotropicalis*.

3.9 Control de calidad interno

a. Material de referencia

- Escamas positivas y negativas

b. Mantenimiento

- Mantener, según corresponda, en sobres de papel kraft, codificados a temperatura ambiente entre 18 °C a 25 °C.

c. Frecuencia de uso

- Usar cada vez que se prepara la solución de hidróxido de potasio al 10% (KOH 10%)

d. Criterios de control

Es aceptado si la lectura microscópica corresponde a las características fúngicas de la muestra referencial, utilizando el hidróxido de potasio al 10%.

- Positivo: se observan elementos fúngicos.
- Negativo: no se observan elementos fúngicos.

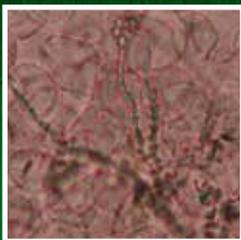
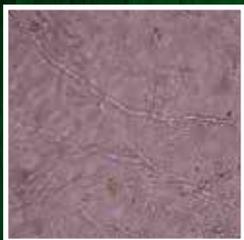
e. Cuando no se cumple con los criterios del control interno

- Repetir la preparación de la solución de hidróxido de potasio al 10% (KOH 10%)

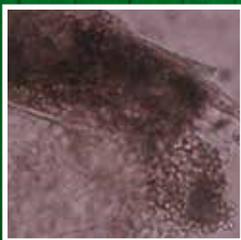
f. Registro

- Registrar en el cuaderno de preparación de hidróxido de potasio al 10%.
- Ver Anexo I: soluciones, medios de cultivo y coloraciones.
- Formularios de control de calidad: FOR-001 control de calidad de hidróxido de potasio al 10%.

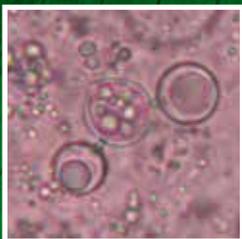
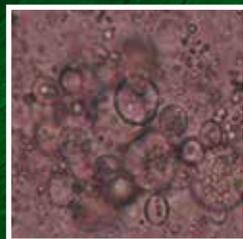
3.10 FOTOS : EXAMEN DIRECTO CON HIDRÓXIDO DE POTASIO AL 10%



Hifas hialinas septadas



Cabello con invasión endotrix



Levaduras redondas con dos o más brotes en la superficie en la forma de "timón de barco u orejas de ratón"

SECCIÓN 4:

CULTIVO Y TIPIFICACIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS



4.1 Fundamento del método

El cultivo es un procedimiento de diagnóstico específico que nos permite tipificar con certeza el género y la especie causal de la micosis causada por hongos filamentosos. El diagnóstico se basa fundamentalmente en el uso de claves taxonómicas que aplica criterios morfológicos, macro y microscópicos, relacionado con la fase de reproducción asexual, que observamos en el cultivo.

4.2 Tipo de muestra

Muestras de piel, uñas, pelo, mucosa, úlcera, esputo, líquidos corporales, material purulento, biopsia o cepa.

4.3 Equipos requeridos

- a. Microscopio binocular.
- b. Incubadora a $37\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$
- c. Mechero Bunsen.

4.4 Insumos requeridos

Materiales

- a. Asa de siembra.
- b. Tubo de cultivo de 13 x 100mm.

- c. Algodón.
- d. Plumón marcador.
- e. Papel plastificado.
- f. Respirador N95.
- g. Papel toalla.
- h. Contenedor para eliminar los residuos.
- i. Bolsas de bioseguridad.

Medios de cultivo

- a. Agar Sabouraud dextrosa (ASD).
- b. Agar papa dextrosa (APD) u otro medio de cultivo especializado.

Reactivos

- a. Hipoclorito de sodio comercial.

4.5 Condiciones previas

- a. Preparar los medios de cultivo agar Sabouraud dextrosa (ASD) con cloranfenicol, agar papa dextrosa (PDA) u otro medio de cultivo especializado.
- b. Ver Anexo I: Soluciones, medios de cultivo y coloraciones.
- c. Formulario de control de calidad: FOR-002 control de calidad medios de cultivo.

4.6 Procedimiento

- a. Procesar las muestras de forma inmediata, preferentemente.
- b. Sembrar la muestra en cuatro tubos con el medio de cultivo elegido
- c. Incubar entre 25 °C a 30 °C entre 7 a 30 días como máximo

4.7 Resultado

A partir de las colonias que han crecido en los tubos con el medio de cultivo elegido, identificar el género y especie del hongo filamentoso.

Morfología macroscópica

- El color de las colonias presentan, en general, colores claros, desde tonos blanquecinos, verdes, amarillentos a marrón claro o negro.

Morfología microscópica

- Las características microscópicas, determina su identificación en la mayoría de casos.
- Observar al microscopio a 40X y aplicar los siguientes criterios de las claves taxonómicas.

4.8 Interpretación de resultados

Dermatofitos (ver figuras)

- | | | |
|---|--|--------------------------------|
| 1 | Macroconidios presentes..... | 2 |
| | No se observan macroconidios..... | 6 |
| 2 | Macroconidios en forma de huso, de paredes gruesas y rugosas y frecuentemente con un pico terminal característico. Están formadas normalmente por más de seis células (Figura 1)... <i>M. canis</i> (Figura 1.4) | |
| | Macroconidios, cuando se presentan, similares a los de <i>M. canis</i> , aunque de mayor longitud y con paredes más lisas. Se observan formas con una constricción en la zona central del macroconidio (Figura 1.3b). Con frecuencia la presencia de macroconidios es escasa, o no se llegan a observar Clamidosporas terminales (Figura 1.3k)e hifas pectinadas características (Figura 1.3ñ). En contraste con <i>M.canis</i> , no se desarrolla o presenta crecimiento escaso en el medio de arroz..... <i>M. audouinii</i> | |
| | Macroconidios de paredes delgadas | 3 |
| 3 | Macroconidios de paredes rugosas | 4 |
| | Macroconidios de paredes lisas | 5 |
| 4 | Macroconidios abundantes, fusiformes y simétricos, conteniendo hasta seis células (Figura 1.3c) | <i>M. gypseum</i> (Figura 1.5) |

- 5 Macroconidios alargados en forma decigarro habano (Figura 1.3d) no siempre presentes. Abundantes microconidios redondeados formando grupos que asemejan racimos de uva inmadura (Figura 1.3i). Presencia de hifas espiriladas (Figura 1.3n). Ureasa positivo. Ensayo de perforación del pelo positivo *T. mentagrophytes*^b (Figura 1.6)

Microconidios piriformes, estrechos, en forma de lágrima, aislados y dispuestos lateralmente en las hifas (Figura 1.3j). Macroconidios generalmente no presentes. Cuando se presentan, similares a los de *T. mentagrophytes* (Figura 1.3e). Reverso de la colonia rojizo; se estimula la producción de este pigmento rojizo en PDA. Ureasa negativo. Ensayo de perforación del pelo negativo..... *T. rubrum*^c

Macroconidios ovales en forma de porra, aislados o en racimos (Figura 1.3f). Ausencia de microconidios. Clamidosporas abundantes.....*E. floccosum* (Figura 1.7)

- 6 Microconidios abundantes..... 7
 Microconidios escasos o no se observan..... 8

- 7 Abundantes microconidios redondeados formando grupos que asemejan racimos de uva inmaduros (Figura 1.3i). Presencia de hifas espiriladas (Figura 1.3n). Ureasa positivo. Ensayo de perforación del pelo positivo *T. mentagrophytes*^b

Microconidios piriformes y estrechos, en forma de lágrima, aislados y dispuestos lateralmente en las hifas (Figura 1.3j) Reverso de la colonia rojizo; se estimula la producción de este pigmento en PDA. Ureasa negativo.

Ensayo de perforación del pelo negativo..... *T. rubrum*^c
 Microconidios de mayor tamaño, en forma de porra más o menos alargados. Algunos en forma de globo (Figura 1.3h). Crece poco en ausencia de tiamina. Infección del pelo tipo endotrix *T. tonsurans* (Figura 1.8)

- 8 Crecimiento moderadamente rápido (Colonias > 15 mm de diámetro en días) 9
 Crecimiento lento (Colonias < 10 mm de diámetro en 7 días 10

- 9 Microconidios, si se detectan, pequeños, en bajo número y en forma de porra. Similares a los de otras *Microsporum* spp. (Figura 1.3g). Clamidosporas terminales (Figura

- 1.3k) e hifas pectinadas características (Figura 1.3ñ). No se desarrolla o presenta un crecimiento escaso en el medio de arroz.....*M audouinii*
- 10 Colonias color púrpura oscuro, violeta. No se detectan conidios. Escaso crecimiento en ausencia de tiamina.
Infección del pelo tipo endotrix*T. violaceum*
- Colonias con coloraciones claras, blanquecinas, grisáceas, marronáceas... 11
- 11 Clamidosporas en cadenas largas densamente compactadas (Figura 1.3l). Algunas hifas en candelabro (Figura 1.3o) y/o terminadas en cabeza de clavo (Figura 1.3p). La mayoría de cepas requieren tiamina^d o tiamina e inositol. Infección del pelo tipo ectotrix megasporado.....*T. verrucosum*
- No se observan conidios. Típicas hifas en candelabro (Figura 1.3o) y/o terminadas en cabeza de clavo (Figura 1.3p). No requieren tiamina. Infección del pelo tipo fávico.....*T. schoenleinii*
- b:** *Trichophyton mentagrophytes* está considerado como un complejo de especies (*T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* (variedad granular), *T. mentagrophytes* var. *erinacei*, *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, *T. mentagrophytes* var. *nodular* (*T. krajdenui*), *T. mentagrophytes* var. *quinckeanum*). Según autores algunas de estas variedades son consideradas como especies independientes o sinónimos de *T. mentagrophytes*. En contraste con *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*, *T. mentagrophytes* var. *erinacei* y *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* pueden presentar microconidios alargados (en forma de porra de pequeño tamaño) en vez de redondeados.
- c:** *T. rubrum* está considerado como un complejo de especies. Para algunos autores las especies *T. fischeri*, *T. kanei*, *T. raubitscheckii*, son consideradas como variedades o sinónimos de *Trichophyton rubrum*. Algunas de las diferencias que presentan son: *T. fischeri* (especie no patógena), *T. kanei* (ausencia de microconidios; ureasa positivo débil), *T. raubitscheckii* (ureasa positivo).
- d:** Se han descrito cepas aisladas de tiñas de ovejas que no necesitan tiamina e/o inositol (*T. verrucosum* var. *autotrophicum*). En un estudio sobre los requerimientos nutricionales de esta especie se cita que el 84% de las cepas se desarrollaron en el medio conteniendo tiamina e inositol, el 16% en el medio conteniendo tiamina y ninguna cepa se desarrolló en el medio sin vitamina.

Aspergillus spp. (ver figuras)

1	Ascomas presentes en cultivo	2
1'	Ascomas ausentes en cultivo.....	11
2	Colonias de crecimiento disperso; cabezas conidiales verdes, fuertemente columnares y uniseriadas; ascoma no rodeado por células de Hülle; ascosporas con crestas ecuatoriales muy desarrolladas..... <i>A. fischeri</i> (= <i>Neosartoria fischeri</i>)	
2'	Sin tales características	3
3.	Pared del ascoma sin células de Hülle.....	4
3'	Pared del ascoma rodeada de células de Hülle	8
	Ascosporas menores de 6 µm en su eje longitudinal	5
4'	Ascosporas de 6-7 µm en su eje longitudinal	
	<i>A. glaucus</i> (= <i>Eurotium herbariorum</i>)	
5	Ascosporas de hasta 5 µm longitud.....	6
5'	Ascosporas de 4.5-6 µm longitud	<i>A. hollandicus</i>
 (= <i>Eurotium amstelodami</i>)	
6	Ascosporas con una cresta ecuatorial pronunciada..... <i>A. chevalieri</i>	
 (= <i>Eurotium chevalieri</i>)	
6'	Ascosporas con un marcado surco ecuatorial	7
7	Colonias de color rojo teja.....	<i>A. rubrobrunneus</i>
7'	Colonias de color verde opaco.....	<i>A. reptans</i>
 (= <i>Eurotium repens</i>)	
8	Ascomas amarillos o verdes, formando agregados; ascosporas pálidas.....	9
8'	Ascomas de color rojizo o púrpura; ascosporas de color rojo purpura	10
9	Conidióforos parduscos; ascosporas lisas, 6,4 - 8 x 5,6 - 6.4 µm	<i>A. flavipes</i>
 (= <i>Fennellia flavipes</i>)	
9'	Conidióforos hialinos: ascosporas espinulosas, 4,5 - 6 x 3,2 - 4.8 µm.....	
 <i>A. niveus</i> (= <i>Fennellia nivea</i>)	
10	Colonias formadas por hifas estériles, setiformes, y conidióforos	<i>A. unguis</i>
 (= <i>Emericella unguis</i>)	

10'	Colonias con setas ausentes	<i>A. nidulas</i>	
	(= <i>Emericella nidulans</i>)	
11	Colonias de tonalidades verdes		12
11'	Colonias de otros colores.....		25
12	Vesículas claviformes		13
12'	Vesículas mayormente no claviformes.....		14
13	Conidióforos de 2-4 mm long.	<i>A. clavatus</i>	
13'	Conidióforos más cortos de 1 mm.....	<i>A. clavato-nanicus</i>	
14	Cabezas conidiales estrictamente uniseriadas.....		15
14'	Cabezas conidiales biseriadas o uni y biseriadas en la misma colonia.....		19
15	Cabezas conidiales formando una columna compacta; conidios esféricos	<i>A. fumigatus</i>	
15'	Cabezas conidiales radiadas o columnares; conidios no esféricos.....		16
16	Cabezas conidiales radiadas de jóvenes; fialides desarrollándose por encima de la mitad de la vesícula o por casi toda la vesícula.....	<i>A. penicellioides</i>	
16'	Cabezas conidiales columnares; fialides desarrollándose solo por encima de la mitad de la vesícula		17
17	Colonias en agar Czapek o MEA de 4-5 cm diám. a las 3 semanas ...	<i>A. caesiellus</i>	
17'	Colonias menores de 4 cm diámetro a las 3 semanas.....		18
18	Columnas conidiales largas y torcidas, de color verde oliva oscuro; conidios Marcadamente verrugosos	<i>A. restrictus</i>	
18'	Columnas conidiales más cortas, de color verde grisáceo; conidios ligeramente verrugosos.....	<i>A. conicus</i>	
19	Cabezas conidiales estrictamente biseriadas		20
19'	Cabezas conidiales uni- y biseriadas.....		24
20	Estipe del conidióforo de color pardo rojizo		21
20'	Estipe del conidióforo no pigmentado		22
21	Vesículas dobladas, formando un ángulo recto con el estipe	<i>A. deflectus</i>	
21'	Vesículas sin tal característica; presencia de hifas estériles, setiformes.....	<i>A. ungis</i>	

22	Colonias eventualmente verde amarillentas o verde azuladas	23
22'	Colonias verdes y blancas.....	<i>A. janus</i>
23	Colonias de color amarillo-naranja a verde amarillento.....	<i>A. versicolor</i>
23'	Colonias verde-azules y con tonalidades pardo rojizas.....	<i>A. sydowii</i>
24	Colonias en agar Czapek siempre de color verde amarillentas; conidios equinulados	<i>A. flavus</i>
24'	Colonias en agar Czapek con tonalidades parduscas al envejecer; conidios de irregularmente equinulados a lisos	<i>A. oryzae</i>
25	Cabezas conidiales estrictamente uniseriadas, radiadas, de color negro.....	<i>A. japonicus</i>
25'	Cabezas conidiales biseriadas o uni- y biseriadas en la misma colonia	26
26	Cabezas conidiales estrictamente biseriadas	27
26'	Cabezas conidiales uni- y biseriadas.....	32
27	Colonias negras.....	<i>A. niger</i>
27'	Colonias no negras.....	28
28	Colonias de color gris verdoso; conidios marcadamente verrugosos; células de Hülle típicamente presentes, frecuentemente alargadas, curvadas o sigmoides	<i>A. ustus</i>
28'	Colonias de otros colores; conidios lisos o finamente verrugosos.....	29
29	Cabezas conidiales formando una columna compacta; colonias de color amarillo pardusco, volviéndose de color avellana al envejecer	<i>A. terreus</i>
29'	Cabezas conidiales de radiadas a débilmente columnares.....	30
30	Colonias de color pardo pálido a rosadas; estipe de los conidióforos lisos; esclerocios ausentes	<i>A. carneus</i>
30'	Colonias de amarillas a ocre; estipes verrugosos o equinulados; esclerocios presentes	31
31	Esclerocios de color rosado a vináceos.....	<i>A. ochraceus</i>
31'	Esclerocios de blancos a color crema.....	<i>A. sclerotiorum</i>
32	Colonias blancas	<i>A. candidus</i>
32'	Colonias de otros colores.....	33

- 33 Colonias de color beige pálido a pardo rojizo; conidios lisos; esclerocios presentes *A. alliaceus*
 33' Colonias pardo oscuras; conidios equinulados; esclerocios ausentes...*A. tamarii*

***Fusarium spp.* (ver figuras)**

- 1 Colonias de crecimiento lento (menos de 2 cm de diám. en 7-10 días)2
 1' Colonias de crecimiento rápido (más de 2 cm, usualmente entre 4-8 cm a los 7 – 10 días).....4
 2 Macroconidios largos, 15-65 x 2.5-4 µm, 1 a 5 septos; clamidosporas ausentes *F. aquaeductuum*
 2' Macroconidios más cortos, usualmente menores de 25 µm long, de hasta 3 septos clamidosporas presentes o ausentes3
 3 Colonias con tonalidades anaranjadas; macroconidios fuertemente curvados con extremos puntiagudos; clamidosporas presentes *F. dimerum*
 3' Colonias de color blanquecino a beige; macroconidios rectos o ligeramente curvados con extremos más atenuados; clamidosporas ausentes.
 *F. tabacinum*
 4 Microconidios abundantes.....5
 4' Microconidios escasos o ausentes; macroconidios la mayoría de 3-5(7) septos, 20-46 x 3-5.5 µm; conidios blásticos y células conidiógenas poliblasticas abundantes *F. incarnatum* (= *F. semitectum*)
 5 Microconidios formando cadenas.....6
 5' Microconidios no formando cadenas.....7
 6 Microconidios creciendo exclusivamente de a partir de monofálides
F. verticillioides
 6' Microconidios creciendo a partir de polifálides y monofálides.....
F. proliferatum
 7 Células conidiógenas poliblasticas presentes.....8
 7' Células conidiógenas poliblasticas ausentes 10
 8' Colonias de color rojo o con áreas rojizas; clamidosporas abundantes; conidios blásticos predominantes, elipsoidales *F. chlamydosporum*

- 8' Colonias de color rosado o con tonalidades vináceas o de color violeta; clamidosporas ausentes; conidios blásticos menos abundantes.....9
- 9 Microconidios creciendo de conidióforos erectos y ramificados, de ovales a fusiformes, nunca piriformes..... **F. subglutinans**
- 9' Microconidios creciendo de conidióforos prostrados, usualmente no ramificados, microconidios piriformes pueden estar presentes **F. sacchari**
- 10 Microconidios creciendo generalmente a partir de monofálides cortas y laterales; colonias púrpuras; esporodoquios anaranjados.....**F. oxysporum**
- 10' Microconidios creciendo a partir de monofálides muy largas; colonias de color crema, azul-verdosas o azules; esporodoquios nunca anaranjados..... **F. solani**

***Acremonium* spp.**

- 1 Termofílico o termotolerante..... 2
- 1' No termofílico..... 3
- 2 Conidios unicelulares, rectos, ovoides, claviformes o piriformes, de 3-6 µm long.....**A. alabamensis**
- 2' Conidios 1-3 septos, falciformes, de 7-10 µm long.....**A. falciforme**
- 3 Conidios de color verde oliva, ovoides **A. roseogriseum**
- 3' Conidios hialinos..... 4
- 4 Conidios formando cabezas mucilaginosas..... 5
- 4' Conidios formando cadenas 7
- 5 Conidios curvados, reniformes o alantoides 6
- 5' Conidios rectos, ovoides o cilíndricos..... 8
- 6 Conidióforos ramificados; ápice de las fálides con paredes engrosadas **A. recifei**
- 6' Conidióforos consistentes en una sola fálide, delgada; ápices de paredes no engrosadas **A. curvulum**
- 7 Conidios fusiformes de ápices redondeados, 4,2 - 6,9 µm long.....**A. hyalinulum**
- 7' Conidios de subsféricos a anchamente elipsoidales, menores de 4 µm long **A. blochii**

- 8 Conidios ovoides, de tamaño uniforme; colonias de crecimiento lento de 3-7 mm de diám. en 10 días..... **A. potronii**
- 8' Conidios cilíndricos, generalmente de tamaño variable; colonias de crecimiento rápido9
- 9 Clamidosporas presentes..... **A. kiliense**
- 9' Clamidosporas ausentes**A. strictum**

Cladosporium y Cladophialophora

- 1 Conidióforos nodulosos y de crecimiento continuo2
- 1' Conidióforos sin tal característica.....3
- 2 Conidióforos más largos de 500 µm; conidios de paredes lisas.....
Cladosporium oxysporum
- 2' Conidióforos más cortos de 500 µm; conidios de paredes rugosas
Cladosporium herbarum
- 3 Conidios en su mayoría esféricos o subesféricos de pared rugosa
Cladosporium sphaerospermum
- 3' Conidios elipsoidales, fusiformes, limoniformes o cilindros 4
- 4 Crece a 40 °C; conidios de pared lisa, más largos de 6 µm.....
Cladophialophora bantiana (= *Cladosporium bantianum* y *C. trichoides*)
- 4' No crecen a 40 °C 5
- 5 Crecen a 37 °C; conidios de hasta 6 µm long..... 6
- 5' No crecen a 37 °C; conidios más largos..... 7
- 6 Conidios de pared rugosa; ramoconidios y células conidiógenas con dentículos muy poco diferenciados **Cladophialophora carrionii**
(= *Cladosporium carrionii*)
- 6' Conidios siempre lisos; ramoconidios y células conidiógenas con dentículos muy pronunciados..... **Cladophialophora devriesii**
(= *Cladosporium devriesii*)
- 7 Cadenas de conidios largas (de hasta 20 conidios); conidios de hasta 15 µm long., siempre lisos; ramoconidios y células conidiógenas con dentículos muy poco diferenciados.....**Cladosporium elatum**

- 7' Cadenas de conidios cortas (de hasta seis conidios); conidios de hasta 7 μm long., lisos o rugosos; ramoconidios con denticulos muy evidentes
Cladosporium cladosporoides

***Paecilomyces* spp.**

- 1 Ascomas presentes en cultivo; termofílico ***P. crustaceus***
 (= ***Thermoascus crustaceus***)
- 1' Ascomas ausentes en cultivo; mesófilo o termotolerante..... 2
- 2 Colonias de color pardo amarillento o beige, con un dulce aroma ***P. variotii***
- 2' Colonias blancas o de otros colores, no aromáticas..... 3
- 3 Colonias de color vináceo a violeta..... 4
- 3' Colonias de otros colores..... 5
- 4 Estipe del conidióforo pigmentado y de paredes verrugosas ***P. lilacinus***
- 4' Estipe del conidióforo hialino y de paredes lisas..... ***P. marquandii***
- 5 Colonias de color verde; conidios esféricos, de 2,5 - 3,2 μm diám ***P. viridis***
- 5' Colonias rosadas; conidios de fusiformes a cilíndricos, 3-4 x 1-2 μm diám
 ***P. fumosoroseus***
- 5'' Colonias de color crema; conidios fusiformes, algunas veces cilíndricos, 4 –
 7,4 x 1,2-1,7 μm diám..... ***P. javanicus***

***Penicillium* spp. (ver figuras)**

- 1 Conidióforos no ramificados (monoverticilados) 2
- 1' Conidióforos ramificados (bi- o triverticilados) 3
- 2 Colonias en agar CYA o MEA exceden los 30 mm diám. en 7 días; no crecen a 37 °C; conidios verrugosos..... ***P. spinulosum***
- 2' Colonias en agar CYA o MEA no exceden los 25 mm diám. en 7 días; crecen a 37 °C; conidios lisos ***P. decumbens***
- 3 Penicilio predominantemente triverticilado..... 4
- 3' Penicilio predominantemente biverticilado..... 7

- 4 Colonias en agar CYA y/o MEA exceden los 30 mm diám en 7 días5
- 4' Colonias en agar CYA y/o MEA no exceden los 30 mm diám en 7 días6
- 5 Exudado, pigmento soluble y/o reverso de la colonia de color amarillo brillante; conidios de color azul o azul verdoso ***P. chrysogenum***
- 5' Exudado, pigmento soluble y/o reverso de la colonia de color pardo anaranjado; conidios de color verde ***P. expansum***
- 6 Fíalides comúnmente de 4.5-6 μm long, cilíndricas, sin un cuello bien diferenciado, estipe del conidióforo liso, sinemas o fascículos presentes
..... ***P. griseofulvum***
- 6' Fíalides excediendo los 6 μm long, en forma de botella, con un cuello bien diferenciado, estipe del conidióforo verrugoso; sinemas o fascículos ausentes..... ***P. commune***
- 7 Penicilio biverticilado o, menos frecuentemente, más complejo; longitud entre fíalides y métulas parecida; fíalides acerosas o de acerosas a ampuliformes8
- 7' Penicilio biverticilado o irregularmente monoverticilado; fíalides en forma de botella mucho más cortas que las métulas; reverso de la colonia usualmente amarillo brillante ***P. citrinum***
- 8 Colonias en MEA y/o CYA exceden los 22 mm diám en 7 días9
- 8' Colonias en MEA y/o CYA no exceden los 12 mm diám en 7 días.....
P. rugulosum
- 9 Conidios de paredes verrugosas; esporulación abundante.....10
- 9' Conidios de paredes lisas; esporulación escasa ***P. marneffe***
- 10 Conidios elipsoidales; métulas y fíalides muy juntas; fíalides acerosas.....
.....
P. purpurogenum
- 10' Conidios esféricos; métulas divergentes; fíalides de acerosas a ampuliformes ***P. verruculosum***

Phialophora, Phaeoacremonium y Lecythophora

- 1 Colonias de color crema o de tonalidades rosadas a rosa salmón, pudiendo oscurecer con el tiempo, con escaso micelio aéreo 2

- 1' Colonias siempre de colores pardos y micelio aéreo abundante..... 3
- 2 Colonias siempre de color rosa o rosa salmón; clamidosporas ausentes
..... ***Lecythophora hoffmannii*** (= *Phialophora hoffmannii*)
- 2' Colonias inicialmente de color crema, oscureciendo especialmente en el centro debido a la presencia de clamidosporas de color pardo oscuro a negruzcas..... ***Lecythophora mutabilis*** (= *Phialophora mutabilis*)
- 3 Conidios dimórficos: junto a unos de pardos y esféricos, otros de alantoides a cilíndricos e hialinos; collarettes de las fíalides como alerones
..... ***Phialophora richardsiae***(=*Pleurostomophora richardsiae*)
- 3' Conidios de un solo tipo, típicamente hialinos..... 4
- 4 Collarettes de las fíalides en forma de vaso o embudo y de color más oscuro que el resto de la fíalide..... 5
- 4' Collarettes de otras formas, generalmente cilíndricos y poco evidentes, y de color parecido al resto de la fíalide.....6
- 5 Collarete en forma de embudo, no más largo que ancho
..... ***Phialophora verrucosa***
- 5' Collarete en forma de vaso, usualmente más largo que ancho.....
..... ***Phialophora americana***
- 6 Clamidosporas presentes, de color pardo oscuro; conidios anchamente elipsoidales ***P. bubakii***
- 6' Clamidosporas ausentes; conidios alantoides al menos en parte..... 7
- 7 Conidióforos ramificados con aspecto de pequeños penicilos; conidios predominantemente alantoides ***P. repens***
- 7' Conidióforos reducidos a una simple fíalide o ligeramente ramificados; conidios elipsoidales y alantoides..... 8
- 8 Fíalides constreñidas en la base; en MEA el reverso de las colonias es de color gris ceniza a color miel ***Phaeoacremonium inflatipes***
- 8' Fíalides no constreñidas en la base; en MEA el reverso de las colonias es de color ante a gris oliváceo ***Phaeoacremonium parasiticum***
(= *Phialophora parasitica*)

Scopulariopsis spp.

- 1 Anélides de base hinchada, menores de 10 μm de largo y con una zona apical menor de 2 μm ancho; colonias grises o casi negras.....*S. brumptii*
- 1' Anélides cilíndricas o con la base ligeramente hinchada, usualmente más largas de 10 μm , con una zona apical de 2,5 - 4 μm ; colonias de otros colores2
- 2 Colonias blancas o de color crema;.....3
- 2' Colonias de color ante o marrón oscuro5
- 3 *Microascus manginii*
- 3' Ascomas ausentes4
- 4 Conidios lisos, ovoides y de ápice puntiagudo, de 8 - 14 x 5 - 6 μm ; colonias aterciopeladas o pulverulentas, de blancas a color crema.....
.....*S. acremonium*
- 4' Conidios equinulados o verrugosos, de globosos a ovoides, con ápice redondeado, de 5 - 8 x 5 - 7 μm ; colonias de flocosas a fasciculadas y de color blanco*S. flava*
- 5 Conidios lisos.....6
- 5' Conidios marcadamente verrugosos, de 5 - 8 x 5 - 7 μm*S. brevicaulis*
- 6 Colonias de color marrón oscuro casi negras al envejecer; anélides en grupos de 2 - 10 sobre cortos conidióforos *S. fusca*
- 6' Colonias de color ante o avellana; anélides en grupos de 2 - 4.....
..... *S. koningii*

Mucor spp.

- 1 Esporangióforos no ramificados o solo ligeramente.....2
- Esporangióforos repetidamente ramificados3
- 2 Esporangiosporas esféricas, 3,4 - 5,4 μm diam*M. amphibiorum*
- Esporangiosporas elipsoidales, 5,7 - 8,7 x 2,7 - 5,4 μm*M. hiemalis*

- 3 Crece a 40 °C..... *M. indicus*
No crece a 40 °C..... 4
- 4 Esporangiosporas ornamentadas y esféricas.....5
Esporangiosporas lisas y de otras formas.....6
- 5 Crece a 37 °C; esporangiosporas conspicuamente verrucosas *M. velutinosus*
No crece a 37 °C; esporangiosporas finamente verrucosas.....*M. plumbeus*
- 6 Esporangiosporas elipsoidales7
Esporangiosporas de otras formas8
- 7 Esporangiosporas 4 - 7 µm de ancho; no crece a 35 °C..... *M. racemosus*
Esporangiosporas 2 - 3 µm de ancho; crece a 35 °C *M. ellipsoideus*
- 8 Esporangiosporas ovales o subesféricas, 5-8 x 4,5-6 µm; esporangióforos con zonas hinchadas; columela ligeramente oblada (más ancha que larga).....*M. ramosissimus*
Esporangiosporas de diferentes formas; esporangióforos sin hinchamientos; columela elipsoidal, ovoide o esférica.....9
- 9 Esporangiosporas 4,4 - 6,8 x 3,7 - 4,7 µm*M. circinelloides*
Esporangiosporas 5,5 - 17,6 x 3,4 - 12,8 µm.....*M. lusitanicus*

Rhizopus y Rhizomucor

- 1 Esporangióforos solitarios, ramificados hacia el ápice; esporangio sin apósisis2
Esporangióforos sin tales características3
- 2 No crece a 40 °C; esporangiosporas de forma variable; clamidosporas presentes; *Rhizomucor variabilis*
Crece a 40 °C; esporangiosporas esféricas o subesféricas; clamidosporas ausentes.....*Rhizomucor pusillus*
- 3 Esporangiosporas con espículas; crece a 50 - 52 °C.....*Rhizopus rhizopodiformis*
Esporangiosporas con estriadas longitudinales..... 4
- 4 No crece a 37 °C; rizoides muy ramificados..... *Rhizopus stolonifer*
Crece a 37 °C; rizoides poco ramificados *Rhizopus oryzae* (= *R. arrhizus*)

Alternaria spp.

- 1 Colonias de crecimiento rápido entre 50 a 70 mm, en agar harina de avena (OA), 25 °C, 7 días, verde oliváceas, algodonosas, pulverulenta si están muy esporuladas.....2
- 1' Colonias de crecimiento rápido entre 50 a 60 mm, en agar harina de avena (OA), 25 °C, 7 días, blanco grisáceas y algodonosas debido a su escasa esporulación2
- 2 Conidióforos cilíndricos, ocasionalmente ramificados, con 1 a 3 septos, de hasta 50 µm de longitud.....3
- 2' Conidióforos raramente ramificados, de hasta 85 µm de longitud.....3
- 3 Conidios formando largas cadenas acrópetas escasamente ramificadas, septados longitudinal y transversal, paredes intensamente rugosas, ovoides o ampuliformes, 20 a 60 x 8 a 18 µm..... *Alternaria alternata*
- 3' Conidios formando cadenas acrópetas ramificadas con una predominancia de septos transversales, pared lisa o ligeramente rugosa, ovoides, aunque tiende a deformarse y volverse tubuliformes, 12 a 30 x 7 a 9 µm.....
..... *Alternaria infectoria*

Curvularia spp.

- 1 Colonias de crecimiento rápido entre 45 a 50 mm, en agar harina de avena (OA), 25 °C, 7 días, grises o pardos negruzcas, algodonosas.....2
- 2 Conidióforos no ramificados, conidios con tres septos, ovoides o anchamente mazudos, 20 a 30 x 8 a 12 µm, curvados *Curvularia lunata*
- 2' Conidióforos no ramificados, conidios de mayor tamaño, predominantemente con cuatro septos, ovoides o anchamente mazudos, 18 a 37 x 8 a 14 µm, curvados..... *Curvularia geniculada*

Scedosporium spp.

- 1 Colonias de crecimiento moderadamente rápido, entre 35-40 mm, en agar papa dextrosa (APD), 25 °C, 7 días, blancas y algodonosas, pero a medida que aumenta la esporulación se vuelven de color gris o gris pardusco.....
..... *Scedosporium apiospermum*

- 2 Colonias de crecimiento moderado, entre 18 - 23 mm, en agar papa dextrosa (APD), 25 °C, 7 días, verde grisáceo, generalmente mucosas con micelio aéreo algodonoso y blanquecino en el centro..... *Scedosporium prolificans*
- 3 Conidióforos escasamente ramificadas, células conidiógenas (anélides) más o menos cilíndricas, desarrollándose directamente sobre hifas indiferenciadas o a partir de conidióforos *Scedosporium apiospermum*
- 4 Conidióforos cortos, generalmente ramificados, con más de una célula conidiógena (anélide) por rama. Anélides creciendo solitarias de las hifas o en pequeños grupos de las ramas de los conidióforos.....
..... *Scedosporium prolificans*
- 5 Conidios acumulándose en masas mucosas sobre las anélides o solitarios y sésiles desarrollándose de las hifas del micelio, lisos, de color pardo amarillento, ovales o elipsoidales, 5 - 12 x 4 - 6,5 µm, con la base anchamente truncada..... *Scedosporium apiospermum*
- 6 Conidios en masas mucosas, lisos, subhialinos o de color pardo oliváceo, ovoides, 4,5 - 8 x 3 - 6 µm. Pueden desarrollarse también conidios sésiles sobre las hifas indiferenciadas que suelen ser más oscuras y más hinchadas
..... *Scedosporium prolificans*

4.9 Control de calidad interno

a. Material de referencia

- Cultivo y lámina montada de cepas referenciales de hongos filamentosos remitidas por el Laboratorio de Referencia Nacional de Micología/INS y/o Cepas ATCC correspondiente.

b. Mantenimiento

- Mantener en vial de agua destilada estéril, codificado a temperatura ambiente. Reactivar cada 06 meses en medio de cultivo especializado y realizar el montaje de lámina para su uso.

c. Frecuencia de uso

- Utilizar cada vez que se emplea la clave taxonómica.

d. Criterios de control

- Clave Taxonómica.

e. En caso no se cumpla con los criterios del control interno:

- Repetir el ensayo.

f. Registro

- Registrar en el Formulario Control de Calidad: FOR-003 Control de Calidad de Hongos Filamentosos Dermatofitos, FOR-0004 Control de Calidad de Hongos Filamentosos Especie de *Aspergillus*, FOR-005 Control de Calidad de Hongos Filamentosos Especie de *Fusarium*.

4.10 FOTOS DE CULTIVO DE HONGOS FILAMENTOSOS



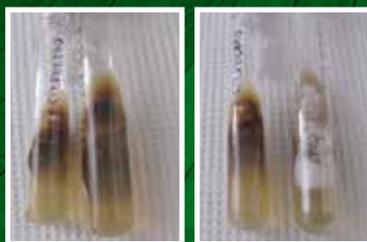
Microsporium canis



Trichophyton rubrum

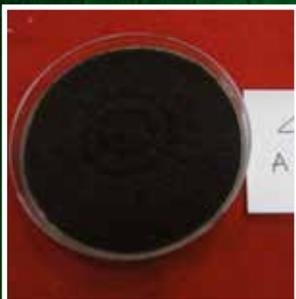


Trichophyton mentagrophytes



Trichophyton tonsurans

4.10 FOTOS DE CULTIVO DE HONGOS FILAMENTOSOS



Aspergillus niger



Penicillium purpurogenum



Cladosporium cladosporoides



Fusarium solani

4.10 FOTOS DE CULTIVO DE HONGOS FILAMENTOSOS



Phialophora verrucosa



Paecilomyces variotii



Penicillium citrinum



Aspergillus flavus

FOTOS DE OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE HONGOS FILAMENTOSOS



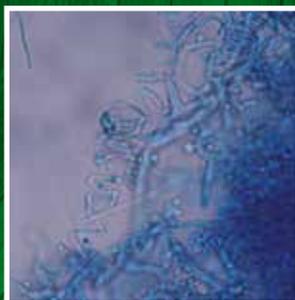
Epidermophyton floccosum



Microsporium canis



Microsporium gypseum

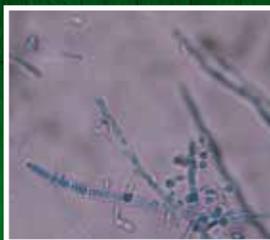


Trichophyton mentagrophytes

FOTOS DE OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE HONGOS FILAMENTOSOS



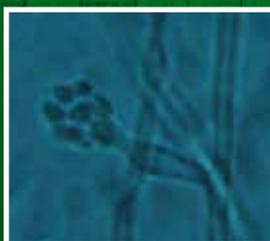
Trichophyton rubrum



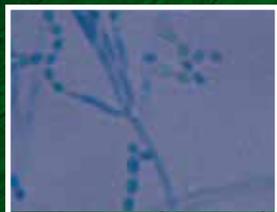
Trichophyton tonsurans



Cladosporium cladosporioides



Phialophora verrucosa



Paecilomyces variotii



Aspergillus clavatus

SECCIÓN 5: CULTIVO Y TIPIFICACIÓN DE HONGOS DIMÓRFICOS



5.1 Fundamento del método

El cultivo es un procedimiento de diagnóstico específico que nos permite tipificar con certeza el género y la especie causal, de la micosis subcutánea, causada por hongos dimórficos. El diagnóstico se basa fundamentalmente en criterios morfológicos, macro y microscópicos, relacionado con la fase filamentosa y levaduriforme que nos permite observar el cultivo. Así como también del uso de pruebas bioquímicas diferenciales, según corresponda.

5.2 Tipo de muestra

Muestras de piel, mucosa, úlcera, esputo, líquidos corporales, material purulento, biopsia, y/o cepa.

5.3 Equipos requeridos

- a. Microscopio binocular.
- b. Incubadora.
- c. Mechero Bunsen.

5.4 Insumos requeridos

Materiales

- a. Asa de siembra.
- b. Tubo de cultivo de 13 x 100mm.

- c. Algodón.
- d. Plumón marcador.
- e. Papel plastificado.
- f. Respirador N95.
- g. Papel toalla.
- h. Contenedor para eliminar los residuos.
- i. Bolsas de bioseguridad.

Medios de cultivo

- a. Agar Sabouraud dextrosa (ASD) en tubo e inclinado en pico de flauta.
- b. Agar cerebro corazón (BHA) u otro medio de cultivo especializado en tubo.

Reactivos

- a. Hipoclorito de sodio comercial.

5.5 Condiciones previas

- a. Preparar el medio de cultivo agar Sabouraud dextrosa (ASD) con cloranfenicol, y agar cerebro corazón (BHA) u otro medio de cultivo especializado.
- b. Ver Anexo I: Soluciones, medios de cultivo y coloraciones.
- c. Formulario de control de calidad: FOR-002 Control de Calidad Medios de Cultivo.

5.6 Procedimiento

- a. Procesar la muestra de forma inmediata, preferentemente.
- b. *Fase filamentosa*: sembrar la muestra en cuatro tubos de agar Sabouraud dextrosa (ASD) con cloranfenicol, incubar a temperatura ambiente entre 25 °C a 30 °C por 6 a 30 días como máximo
- c. *Fase levaduriforme*: sembrar la muestra en cuatro tubos de agar cerebro corazón (BHA) e incubar a 37 °C por 10 a 15 días.
- d. Realizar las pruebas bioquímicas, según corresponda.

5.7 Resultado

A partir de las colonias que han crecido en el medio de cultivo seleccionado, identifica el género y especie del hongo dimórfico.

Morfología macroscópica

- Las colonias presentan en general tonos desde blanquecinos, marrón claro a negro.

Morfología microscópica

- Las características microscópicas determinan su identificación en la mayoría de casos.
- Observar al microscopio y aplicar los criterios de las claves taxonómicas.

5.8 Interpretación de resultados

Observar al microscopio con el objetivo 40X para la fase filamentosa y para la fase levaduriforme emplear el lente de inmersión y aplicar los criterios de las claves taxonómicas

Madurella spp.

- 1 Colonias crecimiento lento, superficie plana o convexa, aspecto veloso, color blancas al inicio después toman un pigmento marrón oscuro que difunde al medio*M. mycetomatis*
- 2 Colonias de crecimiento lento, superficie plana, centro cerebriforme, aspecto aterciopelado, color verde grisáceo *M. grisea*
- 3 Filamentos septados y ramificados, con vesículas de 20 a 25 μ de diámetro, conidios piriformes en número reducido y fialides también escasos
.....*M. mycetomatis*
- 4 Filamentos septados de 1 a 3 μ de diámetro, no presenta conidiación de ningún tipo.....*M. grisea*

Actinomicetales

- 1 Colonias rugosas de aspecto y consistencia ceracea de color blanco amarillento o anaranjado.....2
- 1' Colonias de aspecto cerebriforme o membranoso, de color beige o ligeramente rosa.....3
- 1'' Colonias de aspecto granuloso, al inicio de color blanco, después rosa y por último rojo cereza.....4

- 2 Filamentos finos, cortos o largos, con ramificaciones en número variable, formados por elementos bacilares o cocoides con un diámetro menor a 1 μ *Nocardia spp.*

- 3 Filamentos largos, ramificados, de diámetro menor a 1 μ , se observan cadenas de artrosporas esféricas..... *Actinomadura madurae*

- 4 Filamentos finos, formados por elementos bacilares.... *Actinomadura pelletieri*

Actinomicetales (pruebas bioquímicas diferenciales, ver FOR-007 Control de Calidad de Hongos Dimórficos Especie de *Actinomicetales*)

Sporothrix schenckii (fase filamentosa)

1. Colonias blancas, en agar papa dextrosa (APD), después de un periodo de 10 a 15 días esta toma un color marrón claro, llegando a ser casi negra en un periodo de 30 a 45 días2

2. Micelio fino, formado por hifas de 1 a 2 μ de diámetro, con conidióforos de dimensiones variables que presentan acúmulos de microconidios2
- 2' Microconidios creciendo simpodialmente sobre dentículos situados en el ápice de las células conidiógenas3

3. Conidios piriformes de 1-6 μ de diámetro..... *Sporothrix schenckii*

Sporothrix schenckii (Fase levaduriforme)

1. Colonia de aspecto cremosa de color amarillento en agar cerebro corazon (BHA).....2
2. Blastoconidios alargados de 4 a 6 μ de diámetro.....*Sporothrix schenckii*

5.9 Control de calidad interno

a. Material de referencia

- Cultivo y lámina montada de cepas referenciales de hongos dimórficos remitidas por el Laboratorio de Referencia Nacional de Micología/INS y/o Cepas ATCC correspondiente.

b. Mantenimiento

- Mantener el vial de agua destilada estéril, codificado y a temperatura ambiente. Reactivar cada 06 meses en medio de cultivo especializa y realizar el montaje de lámina para su uso.

c. Frecuencia de uso

- Utilizar cada vez que se usa la clave taxonómica.

d. Criterios de control

- Clave Taxonómica.

e. En caso no se cumpla con los criterios del control interno

- Repetir el ensayo.

f. Registro

- Registrar en el Formulario Control de Calidad, según corresponda: FOR-006 Control de Calidad de Hongos Dimórficos *Sporothrix schenckii*, FOR-007 Control de Calidad de Hongos Dimórficos Especie de *Actinomicetales*.

5.10 FOTOS DE CULTIVO DE HONGOS DIMORFICOS



Sporothrix schenckii Fase Micelial

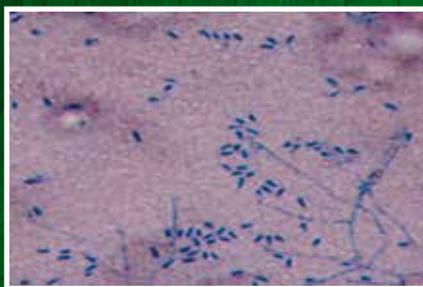


Histoplasma capsulatum - Fase micelial

5.10 FOTOS DE CULTIVO Y OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE HONGOS DIMÓRFICOS



Histoplasma capsulatum -
Fase levaduriforme



Sporothrix schenckii Fase Micelial

SECCIÓN 6:

CULTIVO Y TIPIFICACIÓN DE HONGOS LEVADURIFORMES



6.1 Fundamento del método

El cultivo y las pruebas bioquímicas para levaduras es un procedimiento de diagnóstico específico, que nos permite tipificar con certeza el género y la especie causal, de la micosis causada por hongos levaduriforme. El diagnóstico se basa fundamentalmente en criterios morfológicos, macro y microscópicos, así como también del uso de pruebas bioquímicas diferenciales, según corresponda.

6.2 Tipo de muestra

Muestras de piel, mucosa, ulcera, esputo, líquidos corporales, material purulento, biopsia, y/o cepa.

6.3 Equipos requeridos

- a. Microscopio binocular.
- b. Incubadora
- c. Mechero Bunsen.

6.4 Insumos requeridos

Materiales

- a. Asa de siembra.
- b. Tubo de cultivo de 13 x 100mm.
- c. Algodón.

- d. Plumón marcador.
- e. Papel plastificado.
- f. Respirador N95.
- g. Papel toalla.
- h. Contenedor para eliminar los residuos.
- i. Bolsas de bioseguridad.

Medios de cultivo

- a. Agar Sabouraud dextrosa (ASD) en terminación en pico de flauta.
- b. Otro medio de cultivo especializado.

Reactivos

- a. Hipoclorito de sodio comercial.

6.5 Condiciones previas

- a. Preparar de medios de cultivo agar Sabouraud dextrosa (ASD) con cloranfenicol u otro medio de cultivo especializado.
- b. Ver Anexo I: Soluciones, medios de cultivo y coloraciones.
- c. Formulario de control de calidad: FOR-002 Control de Calidad Medios de Cultivo.

6.6 Procedimiento

- a. Procesar la muestra de preferencia inmediatamente.
- b. Sembrar la muestra en cuatro tubos, con agar Sabouraud dextrosa (ASD) con cloranfenicol, incubar entre 25 °C a 30 °C por 3 a 15 días como máximo.
- c. Realizar las pruebas bioquímicas, según corresponda, ver tablas y diagrama de flujo.

6.7 Resultado

A partir de las colonias que han desarrollado en los tubos del medio de cultivo seleccionado; realizar las pruebas bioquímicas, según corresponda, ver tablas y diagrama de flujo.

Morfología macroscópica

- Las colonias presentan tonalidades desde blanquecinos a rojizo por lo general.

Morfología microscópica

- En la mayoría de los casos, las características microscópicas no determinan su identificación.
- Observar al microscopio y aplicar los criterios de las claves taxonómicas.

6.8 Interpretación de resultados

Observar al microscopio con el objetivo a 40X y aplicar los criterios de las claves taxonómicas

Levaduras

1. En medio de cultivo de agar Sabouraud dextrosa (ASD) las levaduras suelen ser completas, abombadas o planas, consistencia mantecosa, lisas o rugosas
 - 1a. En general, las colonias de levaduras no desarrollan micelio aéreo. Ciertas especies de levaduras pueden formar micelio verdadero como *Geotrichum spp* y *Trichosporon spp*.
 - 1b. Colonias de aspecto y consistencia mucoide, sugiere *Cryptococcus neoformans*.
 - 1c. Colonias cremosas de color blanco amarillento. Lustrosas, poco elevadas y de bordes bien definidos sugiere *Cándida spp*.
 - 1d. Colonias aracniformes lejos de las estrías en el agar que dan un aspecto de arbusto, sugiere *Cándida parapsilosis*.
 - 1e. Colonias cremosas o rugosas de color rojo-anaranjado o naranja, sugiere *Rhodotorula spp*.
2. En medio agar Sabouraud dextrosa (ASD) cubierto con ácidos grasos de cadena larga (aceite de oliva), a 35 °C durante 2 a 4 días, se desarrollan colonias de consistencia cremosa, sugiere *Malassezia spp*.

Levaduras (tubo germinal)

1. Extensión filamentosa de la levadura..... 2
2. No tiene estrechamiento en su origen, su ancho suele ser la mitad de la célula progenitora y su longitud tres a cuatro mayor que la célula madre
..... *Cándida albicans*

Levaduras (clamidosporas)

1. Clamidoconidios redondas u ovals, de 6-12 μm de diámetro y pared gruesa2
2. Clamidoconidios sostenidas aisladamente o en racimos, habitualmente en los ápices de pseudohifas.....3
3. Clamidoconidios con pseudohifas y blastoconidios.....*Cándida albicans*

Especies de *Cándida* (pruebas bioquímicas y fisiológicas, ver FOR-008 Control de Calidad de Especie de *Cándida*; ver FOR-009 Control de Calidad de Otras Levaduras)

Especies de *Malassezia* (pruebas bioquímicas y fisiológicas, ver FOR-010 Control de Calidad de Especie de *Malassezia*)

Cryptococcus neoformans (examen directo de la muestra con tinta china)

1. Levaduras exhibiendo algunos brotes con una intersección con cuello angosto2
2. Levaduras de 2 a 10 μm , rodeadas por una capsula gruesa habitualmente fácil de ver porque no es atravesado por las partículas de tinta.....3
3. Levaduras ampliamente espaciadas debido a la presencia de gruesas capsulas*Cryptococcus neoformans*.

Cryptococcus neoformans (pruebas bioquímicas y fisiológicas, ver FOR-009
Control de Calidad de Otras Levaduras)

6.9 Control de calidad interno

a. Material de referencia

- Cultivo y lámina montada de cepas referenciales de hongos levaduriformes remitidas por el Laboratorio de Referencia Nacional de Micología/INS y/o Cepas ATCC correspondiente.

b. Mantenimiento

- Mantener el vial agua destilado estéril, codificado, a temperatura ambiente, entre 15 °C a 25 °C. Reactivar cada 06 meses en medio de cultivo especializado y realizar el montaje de lámina para su uso.

c. Frecuencia de uso

- Utilizar cada vez que se emplee la clave taxonómica.

d. Criterios de control

- Clave taxonómica.

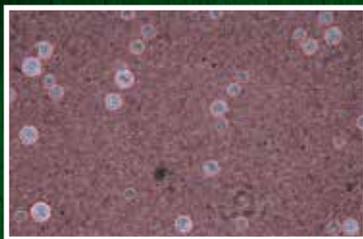
e. En caso no se cumpla con los criterios del control interno

- Repetir el ensayo.

f. Registro

- Registrar en Formulario Control de Calidad según corresponda: FOR-008 Control de Calidad de Especie de *Cándida*, FOR-009 Control de Calidad de Otras Levaduras, FOR-010 Control de Calidad de Especie de *Malassezia*, FOR-011 Control de Calidad de Mantenimiento de Cepas Referenciales.

6.10 FOTOS DE ESTRUCTURAS LEVADURIFORMES



Presencia de levaduras encapsuladas compatibles con *Cryptococcus neoformans*



Candida albicans: Tubo Germinativo



Candida albicans : Clamidosporas

SECCIÓN 7:

DIFUSIÓN EN DISCOS PARA LA DETERMINACIÓN DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA DE HONGOS LEVADURIFORME *Candida spp.*



7.1 Fundamento del método

El método de disco difusión consiste en depositar en la superficie de una placa de agar Mueller Hinton II modificado (MHm) previamente inoculada con la cepa *Candida spp.*, discos de papel de filtro impregnados con los diferentes antifúngicos fluconazol (25 µg) y voriconazol (1 µg). Tan pronto el disco impregnado en antifúngico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antifúngico difunde por el agar, formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 24 a 48 h de incubación, los discos pueden, o no, aparecer rodeados por una zona de inhibición de crecimiento de *Candida spp.*

7.2 Tipo de muestra

Las muestras son cepas *Candida spp.* que provienen de aislamientos de muestras clínicas

7.3 Equipos requeridos

- a. Vórtex.
- b. Incubadora.
- c. Autoclave.

7.4 Insumos requeridos

Materiales

- a. Fluconazol (Cartucho por 50).

- b.** Voriconazol (Cartucho por 50).
- c.** Solución salina estéril.
- d.** Placas Petri de 90 mm.
- e.** Tubos de vidrio con tapa rosca.
- f.** Pinzas planas estériles.
- g.** Asa de siembra.
- h.** Reglas de 30 cm.
- i.** Hisopos estériles.
- j.** Gradillas para tubos 13X100 mm.
- k.** Mecheros de alcohol.
- l.** Guantes.
- m.** Respirador N95.
- n.** Gorros descartables.

Medios de cultivo

- a.** Mueller-Hinton.
- b.** Agar Sabouraud glucosa.

Reactivos

- a.** Azul de metileno (0,1 g).
- b.** Glucosa (20 g).
- c.** Escala Mc Farland 0,5.

Material de referencia

- a.** *Candida krusei* ATCC 6258.
- b.** *Candida parapsilosis* ATCC 22019.
- c.** *Candida albicans* ATCC 90028.
- d.** *Candida tropicales* ATCC 750.

7.5 Condiciones previas

- a.** Preparar los medios de cultivo agar Sabouraud dextrosa (ASD) con cloranfenicol y Mueller-Hinton.
- b.** Ver Anexo I: Soluciones, medios de cultivo y coloraciones, Anexo II: Ficha de bioseguridad *Candida* spp.

- c. Formulario de control de calidad: FOR-002 Control de Calidad Medios de Cultivo y FOR-012 Control Calidad Interno y Reporte de Resultado del Método Difusión en Discos para la Determinación de Susceptibilidad Antifúngica de Hongos Levaduriforme *Candida* spp.

7.6 Procedimiento

a. Preparación del inóculo y siembra

- Se parte de un cultivo puro con 24 h de incubación a 37 °C.
- Se toma con la punta del asa de siembra la cepa y se la resuspende en un tubo con 5 mL de SSE.
- Homogeneizar con vórtex y ajustar la turbidez a 0,5 en la escala Mc Farland (equivale a $1 \times 10^6 - 5 \times 10^6$ UFC/mL). Este inóculo suspendido usarlo inmediatamente.
- Colocar el hisopo dentro del tubo que contiene la suspensión del inóculo. Embeber y rotar contra las paredes del tubo para eliminar el exceso de líquido.
- Sembrar cuidadosamente (sin presionar el hisopo) la placa de Mueller-Hinton II modificado (MHm) en tres direcciones, para obtener crecimiento uniforme en toda la superficie de la misma.
- Colocar la placa con la tapa hacia arriba a temperatura ambiente durante 10-15 min, para que se absorba la humedad. Evitar tiempos más prolongados de secado.
- Colocar inmediatamente el disco de fluconazol y voriconazol en placas Petri correspondiente de forma equidistante.

b. Colocación de los discos e incubación

- Dejar a temperatura ambiente el frasco con los discos durante 5-10 min.
- Extraer el disco del frasco con una pinza estéril de punta fina.
- Apoyar el disco en la superficie del agar, de la placa previamente inoculada por el método de hisopado y presionar suavemente en el centro del disco con la punta de la pinza.

- Distribuir los discos de modo que queden a 20 mm del borde de la placa, y separados entre sí por 40 mm.
- Dejar la placa con la tapa hacia arriba a temperatura ambiente durante 10 a 15 min antes de ser colocado en la incubadora.
- Colocar la placa invertida en la incubadora a 37 °C durante 24 h.
- Si transcurridas las 24 h de incubación, los halos no son claramente distinguibles, prolongar la incubación 24 h más para dar lugar al crecimiento de especies de desarrollo más lento.

7.7 Resultados

- Medir el diámetro del halo externo de la zona de inhibición con una regla o caliper.
- La zona a medir es la definida por las colonias con desarrollo confluyente. Dentro de la zona de inhibición pueden desarrollar colonias con crecimiento inhibido que muestran un diámetro menor al de las colonias externas. Estas colonias deben ser consideradas dentro del halo de inhibición.

7.8 Interpretación de resultados

- Para la interpretación de los resultados se tendrá como referencia los puntos de corte establecidos para los discos de fluconazol (25 µg) y voriconazol (1 µg), utilizados con *Candida* spp.

Disco	Sensible	S-DD*	Resistente
Fluconazol	>/= 19	15-18	</=14
Voriconazol	>/=17	14-16	</=13

7.9 Control de calidad interno

a. Material de referencia

- Se emplearán como control de calidad las cepas de *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida albicans* ATCC

90028 y *Candida tropicales* ATCC 750; ya que poseen estabilidad genética y su concentración mínima inhibitoria (CMI), ha sido determinada repetidamente. En la siguiente tabla se muestra los **rangos de aceptación**.

DISCO	<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	<i>Candida tropicales</i> ATCC 750
Fluconazol	-	22-33	28-39	26-37
Voriconazol	16-25	28-37	31-42	26-40

b. Mantenimiento

- Mantener el vial en agua destilada estéril a temperatura ambiente, entre 15 °C a 25 °C.
- Reactivar cada 06 meses en el medio de cultivo especializado.

c. Frecuencia de uso

- Utilizar cada vez que se realiza el método de ensayo.

d. Criterio de control

- Aceptación
 - Debe cumplir: con el 100% de concordancia dentro de los RANGOS DE ACEPTACION establecidos para la cepas referenciales *Cándida krusei* ATCC 6258; *Cándida parapsilosis* ATCC 22019; *Cándida albicans* ATCC 90028 y *Cándida tropicales* ATCC 750.
 - Debe cumplir: con la turbidez a la escala 0,5 de Mac Farland (equivale a $1 \times 10^6 - 5 \times 10^6$ UFC/mL)
 - Debe cumplir: con la distribución de los discos, según puntos equidistantes, correspondientes a los diferentes antifúngicos.

- Rechazo
- Si no cumple con los tres criterios de aceptación referido en párrafo: “Aceptación” será rechazado.

e. En caso no se cumpla con los criterios del control interno

- Repetir el ensayo.

f. Registro

- Registrar en Formulario Control de Calidad según corresponda: FOR-012 Control Calidad Interno y Reporte de Resultado del Método Difusión en Discos para la Determinación de Susceptibilidad Antifúngica de Hongos Levaduriforme *Candida* spp.

SECCIÓN 8:

INMUNODIFUSIÓN EN GEL AGAR PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA ANTÍGENOS DE *Histoplasma capsulatum*



8.1 Fundamento del método

La prueba se basa en la detección de anticuerpos contra antígenos de *Histoplasma capsulatum*. Para ello, la prueba se realiza en un medio de soporte, que es el gel de agarosa difundida en una lámina portaobjeto, donde se hacen cinco orificios de 2 mm de diámetro distribuidos de manera equidistante, luego se coloca el antígeno, suero control y las muestras problemas, difundiendo los en el gel para formar complejos antígeno-anticuerpo, lo que da lugar a una reacción de precipitación, por lo que se observa bandas en el gel.

8.2 Tipo de muestra

Suero

8.3 Equipos requerido

- Agitador magnético con calefacción.
- Balanza electrónica.
- Horno microondas.

8.4 Insumos requeridos

Materiales

- a. Tips T-200.
- b. Micropipeta P-20.

- c. Pipeta descartable 5mL.
- d. Pro-pipeteador.
- e. Placa descartable de 90 x 150 (cámara húmeda).
- f. Lamina de inmunodifusión.
- g. Sacabocados.
- h. Plantilla para distribución de pocillos.
- i. Guantes.
- j. Mascarillas.
- l. Gorros y botas desechables.

Reactivos

- a. Antígeno *Histoplasma capsulatum*.
- b. Control positivo antisuero *Histoplasma capsulatum*.
- c. Gel de agarosa 1,5% para inmunodifusión.

8.5 Condiciones previas

- a. Preparar el gel de agarosa 1,5% para inmunodifusión y la plantilla de pocillos según mapa de distribución.
- b. Ver Anexo I: Soluciones, medios de cultivo y coloraciones, Anexo III: Plantilla de Distribución de Pocillos, Anexo IV: Mapa de Distribución y Anexo V: Lectura de Resultados.
- c. Formulario de control de calidad: FOR-002 Control de Calidad Medios de Cultivo y FOR-013 Control Calidad Interno y Reporte de Resultado de Inmunodifusión en Gel Agar.

8.6 Procedimiento

a. Preparación de gel de agarosa 1,5% para inmunodifusión

- Preparación de 500 mL de buffer barbital
 - Agregar en orden 0,92 g de ácido dietilbarbitúrico; 2,05 g de acetato de sodio y 5,16 g de dietilbarbiturato de sodio.
 - Enrasar con agua destilada y disolver en baño María, si es necesario.

- Mantener refrigerado.
- Preparación de 100 mL de gel de agarosa 1,5%
- Agregar en orden 25 mL de buffer barbital, 0,25 mL fenol 90%, 1,5 g agarosa y llevar al volumen señalado con agua destilada.
- Mezclar calentando en agitador con calefacción hasta que este transparente.
- Mantener en refrigeración.

b. Preparación de la lámina de Inmunodifusión para usar en la prueba

- Tomar 3mL del gel de agarosa 1,5% disuelto previamente en baño María y dispensar en una lámina portaobjetos.
- Dejar en reposo durante 5 min (o hasta que se torne ligeramente opaca).
- Tras ese lapso, colocar la lámina con gel de agarosa 1,5% en una placa Petri y llevar a refrigeración durante 10 min.

c. Preparación de pocillos en la lámina de inmunodifusión

- Retirar de la refrigeradora la lámina de inmunodifusión.
- Colocar la lámina de inmunodifusión encima de la plantilla de distribución de pocillos (ver Anexo III) y según la distribución de los pocillos utilizar un sacabocado para retirar los cilindros de agarosa de la lámina.

d. Llenado de pocillos

- Con una micropipeta de P-20, cargar 4 μ L de cada reactivo y muestra de suero del paciente y dispensar en cada uno de los pocillos, según el mapa de distribución (ver Anexo IV).
- Esperar 10 min (o hasta que la solución difunda en el agar a través del pocillo) y repetir el procedimiento.
- En total, dispensar en cada pocillo 8 μ L. Llenar primero el pocillo que corresponde al antígeno de *Histoplasma capsulatum*, luego el control positivo y finalmente las muestras de suero de los pacientes.

e. Incubación

- En una placa Petri de vidrio con un algodón embebido en agua destilada (cámara húmeda) colocar la lámina cargada a temperatura ambiente, durante 48 h.

8.7 Resultados

- Transcurrido el tiempo de incubación, colocar la lámina en un fondo oscuro y con la ayuda de un rayo de luz de alta densidad, proceder a la lectura de resultados.
- Los resultados se informaran como:
- **POSITIVO:** cuando se observe banda de precipitación; **NEGATIVO:** cuando no se observe banda de precipitación (ver Anexo V).
- Tener en cuenta que el resultado puede ser negativo, cuando los sueros provienen de pacientes que tengan principios de infecciones primarias (primeras 3 – 6 semanas) y cuando los sueros provienen de pacientes inmunocomprometidos o inmunosuprimidos que producen cantidades no detectables de anticuerpos.

8.8 Interpretación de resultados

- Para la interpretación de los resultados se tendrá como referencia la presencia o ausencia de la banda de precipitación que se forma como una línea de precipitado y que aparece cuando existe complejo antígeno-anticuerpo (ver Anexo V).

Banda De Precipitación	Presente	Ausente
Resultado	Positivo	Negativo
Interpretación	El suero evaluado tiene anticuerpos contra antígeno de <i>Histoplasma capsulatum</i> .	El suero evaluado carece de anticuerpos específicos contra antígeno de <i>Histoplasma capsulatum</i> .

8.9 Control de calidad interno

a. Material de referencia

- Se emplearán como control de calidad interno el antígeno y el control positivo antisuero de *Histoplasma capsulatum*.
- En el resultado se debe observar la presencia de banda visible de precipitación en el punto de equivalencia de los pocillos del antígeno y control positivo antisuero de *Histoplasma capsulatum*.

b. Mantenimiento

- El control positivo y el antígeno de *Histoplasma capsulatum* se conservan entre 2 – 8 °C.
- El control positivo y el antígeno de *Histoplasma capsulatum* deben permanecer a temperatura ambiente, durante 5 min, antes de realizar el procedimiento.

c. Frecuencia de uso

- Utilizar cada vez que se realiza el método de ensayo.

d. Criterio de control

- Aceptación
 - Debe cumplir: control de calidad de la presencia de banda visible de precipitación en el punto de equivalencia de los pocillos del antígeno y control positivo de *Histoplasma capsulatum*.
- Rechazo
 - Si no cumple con el criterio de aceptación referido en párrafo: “Aceptación” será rechazado.

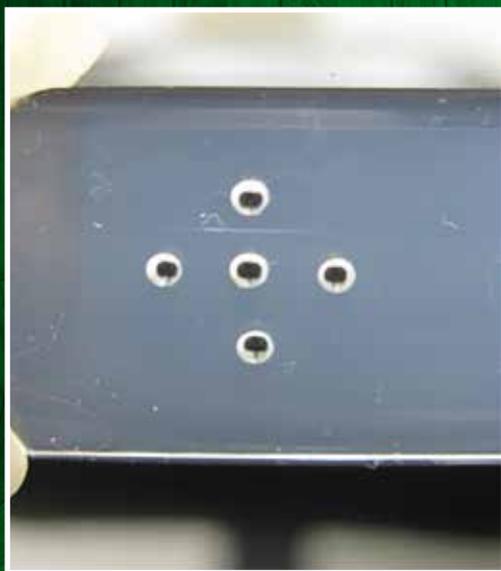
e. En caso no se cumpla con los criterios del control interno:

- Repetir el método de ensayo.

f. Registro

- Registrar en Formulario Control de Calidad según corresponda: FOR-002 Control de Calidad Medios de Cultivo y FOR-013 Control Calidad Interno y Reporte de Resultado de Inmunodifusión en Gel Agar.

8.10 FOTO DE LA PRUEBA DE INMUNODIFUSIÓN



Lamina para inmunodifusión en gel de agarosa

SECCIÓN 9:

MÉTODO VOLUMÉTRICO PARA LA DETERMINACIÓN DE ESPORAS FÚNGICAS EN UFC/M³ EN UN AMBIENTE INTERNO



9.1 Fundamento del método

El método volumétrico para la determinación de esporas fúngicas en UFC/M³ en un ambiente interno, consiste en el muestreo del aire problema que se hace incidir sobre un medio de cultivo determinado, según se pretendan valorar bacterias u hongos. Posteriormente, se procede a la incubación a una temperatura adecuada y, finalmente, se efectúa el contaje de colonias expresando el resultado en UFC/M³ (unidades formadoras de colonias por metro cúbico).

9.2 Tipo de muestra

Esporas fúngicas.

9.3 Equipos requeridos

- Equipo colector Zefon A-6 de partículas microbianas.

9.4 Insumos requeridos

Materiales

- a. Placas desechables de 90 x 100
- b. Guantes desechables.
- c. Botas desechables.

- d. Gorros desechables.
- e. Mascarillas N – 95.
- f. Mandil.
- g. Papel parafilm.
- h. Bolsas de bioseguridad.
- i. Bolsas Ziploc.
- j. Croquis o mapa del ambiente a evaluar.

Reactivos

- a. Agar Sabouraud glucosado.
- b. Cloranfenicol.
- c. Alcohol isopropílico.

9.5 Condiciones previas

- a. Temperatura ambiente
- b. Ver Anexo I: Soluciones, medios de cultivo y coloraciones, Anexo IX: Cuadro “Corrección estadística de Feller”, Anexo X: Ficha de bioseguridad de hongos ambientales y Anexo XI: Instructivo de Trabajo “Manejo Del Equipo Colector Zefon A-6 De Partículas Microbianas”
- c. Formulario de control de calidad: FOR-002 Control de Calidad Medios de Cultivo y FOR-014 Registro de toma de muestras para la determinación de esporas fúngicas en UFC/M3 en un ambiente Interno”

9.6 Procedimiento

a. Cálculo del área y número de tomas por ambiente a evaluar

- Se obtiene multiplicando el largo por el ancho del ambiente a evaluar y el resultado es **A**: área del ambiente a evaluar por metros cuadrados.
- El número de tomas por ambiente a evaluar se obtiene realizando la raíz cuadrada de **A** y el resultado es **N**: número de muestras a tomar del ambiente a evaluar.

b. Toma de muestra

- Establecido el valor de **N**, número de tomas por ambientes, este número corresponde a los puntos donde se colocará el equipo colector Zefon A-6 de partículas microbianas, estos puntos deben ser equidistantes, es decir deben guardar la misma distancia entre sí. Y se ubicarán en el mapa o croquis del ambiente a evaluar.
- Por cada toma de muestra se utilizará 01 placa Petri de agar Sabouraud glucosado con antibiótico, la cual se coloca en el cono-colector del equipo colector Zefon A-6 de partículas microbianas.
- Cada toma de muestra se realiza en lapso de 5 min, tiempo en el cual el analista no debe permanecer en el ambiente.
- Terminado los 5 min el analista volverá a ingresar al ambiente, retira con mucho cuidado la placa Petri, la sella con parafilm y la coloca en bolsa Ziploc estériles para su transporte.
- Para una nueva toma de muestra, el equipo colector Zefon A-6 de partículas microbianas se debe limpiar, antes de colocar una nueva placa Petri con el medio de cultivo en el cono-colector del equipo.

c. Incubación de placas

- Las placas serán incubadas a temperatura de medio ambiente durante 5 días.
- El conteo de unidades formadoras de colonias se realizará el día 2, día 3, día 4 y día 5 de la incubación.

9.7 Resultados

- El número de unidades formadoras de colonias que serán contadas en la placa Petri, estará relacionado al número de esporas fúngicas por metro cúbico de la muestra de aire tomada.
- El cono-colector del equipo Zefon A-6 de partículas microbianas tiene una precisión de 400 agujeros, de 65 μm de diámetro cada uno, por lo cual se necesita un “Cuadro de corrección estadística de Feller” (Anexo IX)

- Para el cálculo, el cuadro de corrección estadística de Feller, refiere $r =$ Número de unidades formadoras de colonias contadas en 01 placa Petri y $Pr =$ Total del número estadístico probable de unidades formadoras de colonia por metro cubico, UFC/m³.

9.8 Interpretación de resultados

- Se sumara el total de UFC/m³ según corrección estadística de Feller, de todas las placas Petri utilizadas para evaluar un ambiente interno.
- Para la interpretación de los resultados de esta suma, se estimarán cuatro niveles de riesgo de permisibilidad de UFC/m³ del ambiente interno evaluado:

UFC/m ³	Riesgo de Permisibilidad
0	Indetectable
1-499	Bajo
500-999	Medio
Mayor o igual a 1,000	Alto

9.9 Control de calidad interno

a. Material de referencia

- Se emplearán como control de calidad el rotámetro del equipo colector Zefon A-6 de partículas microbianas que calibra a la bomba de vacío en 1 ACFM (28,3 L por minuto). (Datos provistos por el fabricante y especificados por la ISO 14644-1: 1999)

b. Mantenimiento

- Mantener según indicaciones del Manejo del equipo Colector Zefon A-6 de Partículas Microbianas (Anexo XI).

c. Frecuencia de uso

- Utilizar cada vez que se realiza el método de ensayo.

d. Criterio de aceptación o rechazo

- Aceptación
 - Debe cumplir: control de calidad de la bomba de vacío en 1 ACFM (28,3 L por minuto).
 - Debe cumplir: control de calidad de la toma de muestra en lapsos de 5 min cada uno, para permitir la estabilidad del medio de cultivo.
 - Debe cumplir: control de calidad no permanecer en el ambiente durante la toma de muestra.
 - Debe cumplir: control de calidad interpretar los resultados en UFC/m³, utilizando el cuadro de corrección estadística de Feller.
- Rechazo
 - Si no cumple con los cuatro criterios de aceptación referido en párrafo: “Aceptación” será rechazado.

e. En caso no se cumpla con los criterios del control interno:

- Repetir el método de ensayo.

BIBLIOGRAFIA

1. Peman, Javier; Martín-Mazuelos Estrella; Rubio Calvo, M. Carmen. Guía práctica. Identificación y diagnóstico en Micología clínica. Revista Iberoamericana de Micología. Edición Ergon. Madrid, España. 2001.
2. Koneman, Elmer; Roberts, Glenn. Micología: Práctica de Laboratorio. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 1992.
3. Arango, Myrtha; Castañeda, Elizabeth. Micosis Humanas.

- Procedimientos diagnósticos. Exámenes directos. Editorial Presencia. Santafé de Bogotá. 1995.
4. Negroni, Ricardo. Manual de procedimientos para laboratorios de Micología Médica. Buenos Aires, Argentina. 2000.
 5. Campbell, Mary; Stewart, Joyce. The Medical Mycology Handbook. Editorial United States of America. 1980.
 6. Calderone, Richard. Candida and Candidiasis. ASM Press. Washington DC, USA. 2002.
 7. Crespo, Vicente; Delgado, Vicente; Martínez, Silvestre. Micología dermatológica. Ediciones mra S. L. Málaga. España. 2006.
 8. Rippon JW. Micología Médica; Hongos y Actinomicetos Patógenos. 3. ed. México: Interamericana, McGraw Hill, S.A. de C.V., 1990.
 9. Zurita, Susana; Casquero, José. Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para el diagnóstico de micosis oportunistas y profundas. Serie de Normas N.º 23. Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú. 1997.
 10. Guevara, Miriam; Urcia, Flor; Casquero, José. Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas. Serie de Normas N.º 44. Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú. 2007.
 11. López-Martínez R, Méndez-Tovar LJ, Hernández-Hernández F, Castañón-Olivares R. Micología Médica: Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio. Edit. Trillas. México D.F. 1995.
 12. Araujo TD, Marques AC, Kerdel F. Sporotrichosis. Int J Dermatol 2001; 40: 737-42.
 13. Arenas R. Esporotricosis. Micología Médica Ilustrada. McGraw-Hill. Interamericana, México D.F. 2003. Pág. 185-206.
 14. Borba CM, Mendes da Silva AM, Oliveira PC. Long-time survival and morphological stability of preserved *Sporothrix schenckii* strains. Mycoses. 1992 ; 35: 185-188.
 15. Conias S, Wilson P. Epidemic cutaneous sporotrichosis: report of 16 cases in Queensland due to mouldy hay. Aust J Dermatol 1998; 39: 34-37.
 16. Holechek, Susan; Casquero, José; Zurita, Susana; Guevara,

- Jorge; Montoya, Isabel. Variabilidad genética en cepas de *Sporothrix schenckii* aisladas de Abancay, Perú. Rev. Perú MED exp. salud pública. 2004. 21: 87 – 91.
17. Kauffman C. Sporotrichosis. Clin. Infect Dis. 1999. 29: 231-237.
18. Mendoza, Mirella; Díaz de Torres, Elvia; Alvarado, primavera. Comportamiento fisiológico y de sensibilidad *in vitro* de aislamientos de *Sporothrix schenckii* mantenidos 18 años por dos métodos de preservación. Rev. Iberoam Micol 2005; 22: 151-156.
19. Sampaio P, Rivitti E. Dermatología, 2.ª ed. S. Paulo: Artes Médicas. 2000. Pág. 548-552.
20. Gené Josepa; Stchigel Albert, Manual de práctica de taxonomía de hongos ambientales. Universitat Rovira i Virgili de España. Curso Internacional de Micología 2010. Lima-Perú.
21. Clinical and Laboratory Standards Institute National Committee for Clinical Laboratory Standards Reference Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Guideline. Second Edition. CLSI document M44-A2. Wayne, PA: Volume 29 Number 17. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.

ANEXOS

ANEXO I: PREPARACIÓN DE SOLUCIONES, MEDIOS Y COLORACIONES

Soluciones

A. Hidróxido de potasio al 10%

- | | |
|-------------------|---------|
| a. KOH | 10 g |
| b. Agua destilada | 1000 mL |

- Agregar los cristales de KOH al agua destilada.
- Mezclar hasta disolver completamente.
- Filtrar, cuando se observe precipitado.

NOTA. Cuando se requiere preparar la solución de hidróxido de potasio al 20%, agregar 20 g de hidróxido de potasio a 100 mL de agua destilada.

B. Tinta china

La tinta china es un método de contraste, que permite destacar la capsula de las levaduras al no poder penetrarla. Se emplea especialmente en el diagnóstico de la criptococosis.

- a. Colocar una gota de tinta china sobre una lámina portaobjetos.
- b. Agregar una gota de muestra a examinar y homogenizar.
- c. Cubrir con una laminilla, evitar la formación de burbujas.
- d. Observar con objetivos 10X y 40X al microscopio.

C. Azul de algodón – lactofenol

Se utiliza para realizar el examen directo de cultivo es una técnica rápida que permite visualizar las estructuras fúngicas.

La técnica consiste en agregar una gota de colorante sobre el portaobjeto y, sobre esta, adicionar un fragmento pequeño de cultivo para analizar dilacerándolo para hacer una buena observación; finalmente, cubrir con el cubreobjetos y proceder a su observación.

Esta técnica, también se aplica al microcultivo, en el cual es necesario aplicar una gota del colorante entre el porta y el cubreobjetos de la muestra micótica.

Asimismo, también se pueden teñir preparaciones para la conservación a largo plazo, solo es necesario sellar los bordes de la preparación con un barniz de uñas transparente.

a.	Ácido láctico	20,0 g
b.	Glicerina	40 g
c.	Fenol en cristales	20,0 g
d.	Azul de algodón al 1%	2,0 mL
e.	Agua destilada	20,0 mL

Medios De Cultivo

1. Agar arroz

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

a.	Arroz	200 g
b.	Agar	18
c.	Agua destilada	1000 mL

- Hervir el arroz en agua destilada por 30 min.
- Filtrar en papel Whatman N.º 2, adicionar el agar y hervir hasta disolver completamente el agar.
- Aforar a un litro.
- Esterilizar a 121 °C por 15 min.
- Repartir en placa estéril.
- Conservar en refrigeración a 4 °C.

Control de calidad

Aspecto: incoloro o amarillo suave, medio sólido, transparente o traslúcido.
pH final a 25 °C: $5,6 \pm 0,2$.

2. Agar Sabouraud glucosado (ASD)

Es un medio estándar para el aislamiento, esporulación y conservación de muchos hongos. El cambio en el pH y la concentración de glucosa favorece la esporulación.

a.	Peptona	10 g
b.	Glucosa	20 g
c.	Agar	15 g
d.	Agua destilada	1000mL

- Mezclar los ingredientes y hacerlos hervir hasta disolver completamente.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 min
- Dispersar en tubos o placas.
- Solidificar en posición inclinada.

Nota. Cuando se emplea tubo de cristal, dispensar el medio antes de esterilizar.

Control de calidad

Aspecto: medio sólido, ámbar, transparente
pH final a 25 °C: $7,0 \pm 0,2$

3. Agar papa zanahoria (PCA)

Idóneo para estimular la esporulación de hongos miceliares e indicado para la identificación de hongos hifomicetes dematiáceos en general.

a.	Papa natural rallada	20 g
b.	Zanahoria rallada	20 g
c.	Agar	18 g
d.	Agua destilada	1000mL

- Lavar, pelar y rallar o trocear los vegetales y hervirlos lentamente en 1 L de agua por espacio de una hora.

- Filtrar y añadir el agar.
- Esterilizar a 121 °C por 15 min.
- Dispensar en placa Petri o tubo.

Control de calidad

Aspecto: medio sólido, transparente o translucido

4. Agar Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol (MYC)

Es un medio selectivo utilizado para el aislamiento de hongos patógenos a partir de muestras muy contaminadas con hongos saprofitos y bacterias.

Se utiliza fundamentalmente en el aislamiento de dermatofitos y hongos dimorfos. Inhibe algunas especies de hongos de interés médico (*Candida no albicans*, *Aspergillus*, *Zygomycetes*, *Cryptococcus neoformans*, etc).

Se utiliza fundamentalmente Mycosel y Mycobiotic, ambos comercializados

Se prepara de acuerdo con las instrucciones del fabricante, evitar manipular la cicloheximida.

Control de calidad

Aspecto: agar firme, amarillento, transparente

5. Agar extracto de malta (MEA)

Medio para el aislamiento y recuento de levaduras y hongos miceliares. Adecuado para la identificación de Zigomicetes, y especies de *Acromonium spp*, *Aspergillus spp*, *Cladosporium spp*, *Penicillium spp*, *Paecilomyces spp*, *Scopulariopsis spp*, etc.

- | | | |
|----|-------------------|---------|
| a. | Extracto de malta | 20 g |
| b. | Peptona | 1 g |
| c. | Glucosa | 20 g |
| d. | Agar | 15 g |
| e. | Agua destilada | 1000 mL |

- Calentar hasta disolver todos los componentes.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 min.
- Enfriar a 45 °C.
- Dispensar en placas Petri.

Nota. Evitar recalentar el medio.

Control de calidad

Aspecto: ámbar, transparente, pH final: $5,6 \pm 0,1$. Si se desea ajustar el pH a 3,5, enfriar a 55 °C añadir 2 a 3 mL de ácido láctico al 10% a 100 mL de agar extracto de malta Una vez acidificado no se debe volver a calentar.

6. Agar harina de avena (OA)

Favorece la esporulación. Recomendable para la identificación de especies de *Acremonium spp*, *Cladosporium spp*, *Fusarium spp*, *Paecilomyces spp*, *Phialophora spp*, *Scopulariopsis spp*, etc. y para la obtención de las formas teleomórficas asociadas.

a.	Harina de avena	30 g
b.	SO ₄ MG.7H ₂ O	1 g
c.	PO ₄ H ₂ K	1,5 g
d.	Agar	15 g
e.	Agua destilada	1000 mL

- Hervir lentamente 30 g de harina de avena en un litro de agua destilada por espacio de una hora.
- Filtrar y aforar a 1L.
- Añadir las sales y calentar hasta disolver completamente.
- Esterilizar a 121 °C **por 15 min.**
- Dispensar en placas Petri.

Control de calidad

Aspecto: medio sólido, blanquecino, opaco

7. Agar papa glucosado (APD)

Es el medio para la estimulación de la formación de conidias, en la preparación

de inóculos de hongos miceliales *Fusarium spp* y en la estimulación de producción de pigmentos: rojo en *Trichophyton rubrum*, rosa salmón en *Microsporium audouinii* y amarillo en *Microsporium canis*.

- | | | |
|----|----------------|---------|
| a. | Papa | 200 g |
| b. | Glucosa | 10 g |
| c. | Agar | 18 g |
| d. | Agua destilada | 1000 mL |

- Pelar las papas, cortar en cubos y hervir en agua por una 1 h.
- Filtrar con papel Whatman N.º 2, adicionar glucosa, agar y hervir hasta disolver completamente.
- Aforar a un litro.
- Esterilizar a 121 °C por 15 min.
- Dispensar en placa Petri o tubo.

Control de calidad

Aspecto: medio sólido, ámbar, transparente.
pH final a 25 °C: $5,6 \pm 0,2$.

8. Mueller Hinton (MHM)

Preparar 1 L de Mueller Hinton según las instrucciones del fabricante, DIFCO, OXOID, agregar 20 g de glucosa y 100 uL de la solución *stock* de azul de metileno.

- | | | |
|----|-------------------------------|---------|
| a. | Mueller Hinton | 38 g |
| b. | Glucosa | 20 g |
| c. | <i>Stock</i> azul de metileno | 100 uL. |
| d. | Agua destilada | 1000 mL |

- Autoclavar 15 min a 121 °C y 15 libras.
- Dejar que llegue a 50 °C y dispensar 25 mL por placa de Petri de modo de alcanzar 4 mm \pm 1 mm.

Solución stock de azul de metileno (SS-AM)

- Para preparar la solución *stock*, agregar 0,1 g de azul de metileno a 20 mL de agua destilada (5 mg/mL) concentración final en el medio de cultivo SS-AM (5 µg/mL).

9. Agar harina de maíz (Corn - Meal)

Se emplea para la identificación *Acremonium spp*, *Fusarium spp* y dermatofitos.

- | | | |
|----|----------------|---------|
| a. | Harina de maíz | 60 g |
| b. | Agar | 15 g |
| c. | Agua destilada | 1000 mL |

- Mezclar la harina de maíz en agua y Hervir a fuego lento por una hora.
- Filtrar con gasa.
- Aforar a 1000 mL
- Esterilizar a 121 °C por 10 min y filtrar.
- Agregar el agar hasta disolver.
- Esterilizar a 121 °C por 15 min.
- Dispensar en placa Petri.

Control de calidad

Aspecto: medio sólido, transparente

10. Agar harina de maíz con Tween 80 (“Corn-Meal, CMA”)

Se utiliza en el cultivo y diferenciación de especies de *Cándida spp* basándose en las características miceliales. El *Tween* 80 se incorpora para demostrar la formación de clamidosporas.

- | | | |
|----|-----------------|---------|
| a. | Harina de maíz | 40 g |
| b. | Agar | 20 g |
| c. | <i>Tween</i> 80 | 3 mL |
| d. | Agua destilada | 1000 mL |

- Mezclar la harina de maíz en agua y hervir a fuego lento por una hora.
- Filtrar con gasa y aforar a 1000 mL.
- Esterilizar a 121 °C por 10 min y filtrar.
- Adicionar el agar, Tween 80 y calentar hasta disolver.
- Esterilizar a 121 °C por 15 min.
- Dispensar en placa Petri.

Control de calidad

Aspecto: medio sólido, transparente

11. Agar infusión de cerebro corazón (BHIA)

En general, está indicado para el aislamiento de una gran variedad de patógenos, incluyendo levaduras, mohos y bacterias como la *Nocardia*.

Adicionado de sangre de carnero al 10%, se utiliza para el aislamiento de todos los hongos incluido los dimórficos. Puede utilizarse como medio enriquecido para aumentar los aislamientos de *Cryptococcus neoformans* a partir de muestras estériles como el LCR. Mantenimiento de la fase levaduriforme de algunas micosis sistémicas, ya sea con sangre o sin ella. Pueden añadirse antibacterianos (cloranfenicol y/o gentamicina) para convertirlo en selectivo. En algunas ocasiones también puede adicionarse cicloheximida (facilita el aislamiento de *Histoplasma capsulatum* y *Blastomyces dermatitidis*).

- Preparar de acuerdo a lo indicado por el fabricante.
- Hervir los componentes hasta su completa disolución.
- Dispensar en matraz o tubo.
- Esterilizar a 121 °C por 15 min.
- Cuando se emplea tubo, enfriar en posición inclinada.

Control de calidad

Aspecto: medio sólido, ámbar claro a semitransparente, sin precipitado (cuando no está adicionado de sangre).

pH final: $7,4 \pm 0,2$

12. Agar con leche, glucosa y purpura de bromocresol

Puede utilizarse para la diferenciación de *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*. *Trichophyton rubrum* secreta un pigmento que puede parecer alcalinización su pigmento típico puede verse a través de la colonia, pero no a través del medio. *Trichophyton mentagrophytes* puede necesitar de 10 días para originar un positivo claro.

- Solución A
Leche desnatada en polvo 80 g

Purpura de bromocresol 1,6%	2 mL (diluido en etanol)
Agua destilada	200 mL

- Solución B

Glucosa	40 g
Agua destilada	1000 mL
- Solución C

Agar	30 g
Agua destilada	800 mL
- Preparar las soluciones **A y B** y esterilizar por separado a 115 °C durante 8 min.
- Hervir la solución **C** hasta disolver el agar completamente y esterilizar a 121 °C por 15 min.
- Adicionar a la solución **C** las soluciones **A y B**, mezclar, enfriar a 50 °C y ajustar el pH a 6,6 con ácido clorhídrico 1 N.
- Dispensar asepticamente en tubo y dejar enfriar en posición inclinada.

Control de calidad

Aspecto: medio sólido, azul cielo, opaco, pH final a 25 °C: 6,6 ± 0,1

13. Agar inhibidor para mohos (MIA)

Se utiliza en el aislamiento de hongos sensibles a la cicloheximida (*Cryptococcus*, *zigomicetos*, etc.) de muestras contaminadas. Permite el desarrollo de la mayoría de mohos y levaduras.

Triptona	3 g
Extracto de carne	2 g
Dextrosa	5 g
Extracto de levadura	5 g
Almidón soluble	1 g
Cloranfenicol	0,125 g
Gentamicina	5 g
Sal A	10 mL
Sal C	20 mL

Agua destilada	250 mL
Almidón soluble	2 g
Agar	17g
Agua destilada	970 mL

Sal A

$\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$	25 g
PO_4HNa_2	25 g

Sal C

$\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 g
$\text{SO}_4\text{Fe}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
Cloruro de sodio	0,5 g
$\text{SO}_4\text{Mn}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2 g
Agua destilada	250 mL

- Calentar hasta disolver todos los componentes. Enfriar y ajustar el pH a 6,7.
- Esterilizar a 121 °C por 15 min.
- Dispensar en placa de Petri.

Control de calidad

Aspecto: medio sólido, transparente

14. Agar aceite de oliva

Es un medio utilizado para el aislamiento de levaduras lipofílicas, como *Malassezia furfur*.

a. Agar dextrosa Sabouraud	6,5 g
b. Tween 80	2 mL
c. Aceite de oliva extra virgen	2 mL
d. Vitamina A	10 gotas
e. Cloranfenicol	0,5 g
f. Agua destilada	1000 mL

- Disolver el ADS en agua y colocar en calor.
- Agregar los otros componentes.
- Esterilizar a 121 °C por 15 min.

Control de calidad

Aspecto: blanco amarillento, no muy sólido

15. Agar Czapec – Dox

Es el medio empleado para el aislamiento y conservación de algunos *Actinomycetes*, se utiliza también para la identificación de *Aspergillus spp* y *Penicillium spp*.

a.	Sacarosa	30,0 g
b.	Nitrato de sodio	2,0 g
c.	Fosfato dipotásico	1,0 g
d.	Sulfato de magnesio	0,5 g
e.	Cloruro potásico	0,5 g
f.	Sulfato ferroso	10,0 mg
g.	Agar	15,0 g
h.	Agua destilada	1000 mL

- Disolver al calor todos los ingredientes.
- Hervir por 10 min.
- Esterilizar a 121 °C por 20 min y dispensar.

Control de calidad

Aspecto: ámbar pálido, sólido transparente, pH final a 25 °C: 7,3 ± 0,2

16. Agar agua

Estimula la formación de conidias. Recomendable para hifomicetes de pigmentación oscura (**dematiáceos**) e incluso para dermatofitos poco o nada esporulados. Favorece la esporulación de hongos saprofitos.

- | | |
|-------------------|---------|
| a. Agar | 20 g |
| b. Agua destilada | 1000 mL |

- Calentar hasta disolver todos los componentes.
- Esterilizar a 121 °C por 15 min.
- Dispensar en placa Petri.
- Colocar fragmentos de papel estéril en la superficie del medio solidificado, en caso opcional.

Control de calidad

Aspecto: solido, transparente

17. Agar de Staib (*Guizotia abyssinica*), agar semilla de alpiste

Utilizado para aislar *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus* spp. *C. neoformans* es el único que al metabolizar la *Guizotia abyssinica* (alpiste), produce melanina originando un color marrón oscuro. El cloranfenicol lo convierte en medio selectivo. También puede ser útil en la diferenciación de *Cándida dubliniensis*.

- | | |
|---|---------|
| a. Glucosa | 10,0 g |
| b. Creatinina | 0,78 g |
| c. Cloranfenicol | 0,05 g |
| d. Difenilo (disuelto en
10 mL de etanol al 95%) | 100 mg |
| e. <i>Guizotia abyssinica</i> | 70 g |
| f. Agar | 20 g |
| g. Agua destilada | 1000 mL |

- Moler las semillas y adicionar 350 mL de agua.
- Esterilizar en autoclave y filtrar.
- Aforar con agua a 1000 mL.
- Agregar los componentes restantes, excepto el difenilo.
- Esterilizar a 121 °C por 15 min y de enfriar a 45 °C.
- Añadir el difenilo antes e dispensar el medio en la placa.

Control de calidad

Aspecto: transparente

18. Agar úrea de Christensen

Se utiliza en la identificación de algunos dermatofitos, especialmente *Trichophyton rubrum* de *Trichophyton mentagrophytes* y de algunas levaduras (*Cryptococcus neoformans*)

a.	Peptona	1,0 g
b.	Glucosa	1,0 g
c.	Cloruro de sodio	5,0 g
d.	Fosfato de potasio	2,0 g
e.	Rojo de fenol	12,0 mg
f.	Agar	20,0 g
g.	Agua destilada	900 mL

- Esterilizar el agar en 900 mL de agua a 121 °C por 15 min.
- Adicionar 100 mL de solución de urea (20% en agua, esterilizar por filtración) a 900 mL del medio enfriado a 50 °C.
- Dispensar en tubo y solidificar en posición inclinada.

NOTA. Preparar con úrea agar base (Christensen), esterilizar por filtración y adicionar el agar estéril.

Control de calidad

Aspecto: naranja transparente, pH final: $6,8 \pm 0,2$.

19. Chromagar Candida

El chromagar contiene diversos sustratos enzimáticos que están unidos a compuestos cromo génicos. Cuando enzimas específicas descomponen el sustrato, se produce color. Se utiliza para identificar levaduras aisladas en otros medios no cromogénicos, para comprobar la pureza de las cepas en las pruebas de sensibilidad, para la identificación rápida de especies resistentes. Es necesario seguir con rigor las condiciones establecidas por el fabricante. Incubar a 35 °C, en cámara húmeda, oscuridad por 48 a 72 h (no menor a 48 h).

a.	Peptona	10 g
b.	Glucosa	20 g
c.	Agar	15 g
d.	Cloranfenicol	500 mg
e.	Mezcla cromogénica	2 g
f.	Agua destilada	1000 mL

- Generalmente se suministra preparado.
- Si se prepara a partir del polvo deshidratado, disolver en agua caliente, sin hervir. No esterilizar mediante calor (los cromógenos se desnaturalizan). Seguir las indicaciones del fabricante.

Control de calidad

Aspecto: ámbar claro

20. Agar extracto de suelo

Es un medio recomendado para el mantenimiento de la forma micelial de *B. dermatitidis* y *H. capsulatum*, además favorece la formación de cleitotecios de *Ajellomyces dermatitidis*.

a.	Tierra de jardín	500 g
b.	Agua de la llave	1200 mL
c.	Glucosa	2 g
d.	Extracto de levadura	1 g
e.	Fosfato dipotásico	0,5 g
f.	Agar	15 g

- Mezclar la tierra con el agua y esterilizar a 121 °C por 3 h.
- Filtrar con papel filtro mientras se encuentre caliente.
- Aforar a 1000 mL y adicionar los demás componentes.
- Ajustar el pH a 7,0.

Control de calidad

Aspecto: ámbar claro.

21. Agar Borelli

Se utiliza para favorecer la conidiación y producción de pigmento de los dermatofitos, particularmente de *Microsporum canis*.

- | | | |
|----|-----------------|---------|
| a. | Harina de trigo | 14 g |
| b. | Leche en polvo | 14 g |
| c. | Miel de abeja | 7 g |
| d. | Agar | 14 g |
| e. | Agua destilada | 1000 mL |

- Disolver todos los componentes en el agua.
- Esterilizar a 110 °C por 10 min.

Control de calidad

Aspecto: ámbar

22. Agar caseína

Se utiliza para diferenciar a *Nocardia braziliensis* de otras especies de *Nocardia*, con base a la capacidad de hidrolizar la caseína.

- | | | |
|----|------------------------------|---------|
| a. | Leche en polvo
descremada | 10 g |
| b. | Agar | 20 g |
| c. | Agua destilada | 1000 mL |

- Disolver la leche en 100 mL. de agua. agregar el agua poco a poco para evitar la formación de grumos.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 min.
- Disolver el Agar en 100 mL de agua.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 min.
- Enfriar ambas soluciones a 48 °C, mezclar y homogeneizar.
- Envasar

Control de calidad

Aspecto: ámbar

23. Agar tirosina

Es útil para diferenciar especies de *Actinomycetes*

- | | |
|-------------------|---------|
| a. Agar nutritivo | 23 g |
| b. Tirosina | 5 g |
| c. Agua destilada | 1000 mL |

- Disolver el agar en 900 mL de agua, por calentamiento.
- Dejar enfriar a 55 °C.
- Disolver la tirosina en 100 mL de agua, a temperatura ambiente.
- Mezclar la suspensión de agar con la solución de tirosina, tener especial cuidado con los cristales de tirosina que se encuentre distribuidos de manera homogénea.
- Esterilizar la mezcla a 121 °C por 15 min.
- El pH final es de 6,9 a 7,1.
- Envasar

Control de calidad

Aspecto: opaco

24. Agar xantina

Se utiliza en la diferenciación de *Actinomycetes*

- | | |
|-------------------|---------|
| a. Agar nutritivo | 23 g |
| b. Xantina | 4 g |
| c. Agua destilada | 1000 mL |

- Disolver el agar en 900 mL de agua por calentamiento.
- Dejar enfriar a 55 °C.
- Disolver la Xantina en 100 mL de agua a temperatura ambiente.
- Mezclar la suspensión de Agar con la solución de Xantina, asegurar que los cristales de Xantina se encuentren distribuidos de manera homogénea.

- Esterilizar la mezcla a 121 °C por 15 min.
- Ajustar el pH entre 6,9 a 7,1.
- Envasar.

Control de calidad

Aspecto: opaco

25. Agar extracto de levadura

Se utiliza para inducir la conidiación y reducir el crecimiento vegetativo.

- | | | |
|----|----------------------|---------|
| a. | Extracto de levadura | 15 g |
| b. | Agar | 20 g |
| c. | Agua destilada | 1100 mL |

- Preparar la solución madre de extracto de levadura, disolver la levadura en 100 mL de agua.
- Esterilizar por filtración.
- Disolver el agar en 1000 mL de agua
- Esterilizar a 121 °C durante 15 min.
- Enfriar a 45 °C.
- Dispensar 6 mL de la solución madre de extracto de levadura.
- Envasar.

Control de calidad

Aspecto: amarillo pálido.

26. Medio arroz

Se utiliza para la diferenciación de cepas atípicas de *Microsporium audouinii* y *Microsporium canis*.

- | | | |
|----|----------------------|------|
| a. | Arroz banco superior | 1 g |
| b. | Agua destilada | 2 mL |

- Mezclar los componentes en un tubo de 13 x 100.
- Esterilizar a 121 °C por 15 min.

27. Medio de Lowenstein - Jensen

a.	Fosfato monopotásico	2,4 g
b.	Sulfato de magnesio	0,24 g
c.	Citrato de magnesio	0,6 g
d.	Asparagina	3,6 g
e.	Glicerol (grado reactivo)	12 mL
f.	Agua destilada	600 mL
g.	Harina de maíz	30,0 g
h.	Huevos revueltos enteros	1000 mL
i.	Verde de malaquita al 2%	20 mL

- Disuelva las sales y la harina de papa en agua.
- Esterilizar a 121 °C por 30 min.
- Lavar con solución jabonosa al 5% con la ayuda de un cepillo los huevos frescos y dejar por 30 min.
- Enjuagar los huevos con abundante agua corriente, posteriormente colocar en alcohol al 70% por 15 min.
- Cascar los huevos y depositar en frasco estéril.
- Homogenizar los huevos con perlas de vidrio estériles y filtrar con dos gasas estériles el producto.
- Agregar un litro de la suspensión de huevo a la suspensión de sales-papa.
- Adicionar el verde de malaquita y envasar en tubo.
- Colocar a 85 °C por 50 min.

Control de calidad

Aspecto: verde claro.

28. Medio Garrod

Se utiliza para aislar y conservar los *Actinomycetes*.

- | | | |
|----|-------------------|---------|
| a. | Extracto de carne | 3 g |
| b. | Cloruro de sodio | 5 g |
| c. | Peptona | 10 g |
| d. | Almidón soluble | 1 g |
| e. | Agar | 20 g |
| f. | Agua destilada | 1000 mL |

- Disolver todos los componentes en el agua destilada.
- Esterilizar a 121 °C por 15 min
- Envasar.

Control de calidad

Aspecto: ámbar claro

29. Medio de penetración del pelo

Se utiliza en la diferenciación de algunos dermatofitos que tiene la capacidad de producir órganos perforantes.

- | | | |
|----|-------------------------------------|-------|
| a. | Sol. de extracto de levadura al 10% | 3 mL |
| b. | Agua destilada | 20 mL |

- Cabello de prepúber cortado en fragmentos de 1 cm y esterilizar.
- Mezclar la solución de extracto de levadura con agua.
- Verter 2 mL de solución en cada tubo.
- Adicionar de 5 a 10 cabellos por tubo.
- Inocular los cabellos con el hongo por estudiar.
- Incubar durante cuatro semanas a temperatura ambiente.
- Observar los pelos aclarados con hidróxido de potasio o azul de algodón.

30. Medio de asimilación de gelatina

Se utiliza para diferenciar *N. braziliensis* de otras especies de *Nocardia*.

- | | | |
|----|----------------|---------|
| a. | Gelatina | 4 g |
| b. | Agua destilada | 1000 mL |
- Disolver la gelatina por ebullición por 5 s.
 - Ajustar el pH a 7,0.
 - Esterilizar a 15 libras de presión por 10 min.

Control de calidad

Aspecto: transparente

31. Medio de gelatina para hidrólisis

Se utiliza para demostrar la actividad proteolítica de algunas especies de hongos y de *Actinomyces* causantes de micetoma y cromomicosis.

- | | | |
|----|----------------------------|--------|
| a. | Gelatina | 10 gr |
| b. | Caldo de infusión –corazón | 2,5 g |
| c. | Agua destilada | 100 mL |
- Disolver los componentes en el agua por calentamiento.
 - Hervir por 2 min. Dejar la ebullición durante dos minutos.
 - Ajustar el pH a 7,2.
 - Esterilizar a 121 °C por durante 10 min.

Control de calidad

Aspecto: ámbar

32. Medio de leche tornasolada

Se utiliza para diferenciar géneros y especies de *Actinomyces* anaerobios.

- | | | |
|----|----------------|---------|
| a. | Leche en polvo | 100,0 g |
| b. | Tornasol | 5,0 g |
| c. | Agua destilada | 1000 mL |

- Disolver los ingredientes en el agua.
- Esterilizar la mezcla a 10 libras de presión durante 10 min.
- Envasar e inocular.
- El color rosa del tornasol indica una reacción acida causada por la fermentación de la lactosa.
- Un color purpura o azul (alcalinidad) indica no fermentación.
- Un color blanco indica reducción y se presenta cuando el tornasol sirve como receptor de electrones y es reducido.
- La coagulación (formación de grumos) es causada por la precipitación de la caseína originada por el ácido que, a su vez, es producido a partir de la lactosa. La coagulación también puede ser causada por la conversión de la caseína en paracaseína por la enzima renina.
- La peptonización (disolución de los grumos) indica digestión del cuajo o proteínas de la leche, enzimas proteolíticas.

Control de calidad

Aspecto: opaca

Coloraciones

A. Coloración giemsa

Tiene la misma utilidad que la coloración de Wright para el diagnóstico de histoplasmosis y se emplea en adiaspiromicosis, y en neumocistosis.

Solución concentrada del colorante

- | | | |
|----|------------------|---------|
| a. | Giemsa en polvo | 0,6 g |
| b. | Metanol | 50,0 mL |
| c. | Glicerina neutra | 50,0 mL |

- Antes de pesar, pulverizar los cristales del colorante.

- Macerar los cristales del colorante en polvo en un mortero con 30 mL de glicerina.
- Transferir la mezcla a un frasco limpio y aforar a 50 mL de glicerina.
- Colocar en baño María a 55 °C por 2 h.
- Utilizar 20 mL de alcohol para mover el colorante adherido al mortero.
- Retirar el frasco del baño María, dejar enfriar y adicionar el alcohol empleado en lavar el mortero, asimismo los 30 mL del alcohol restante.
- Concentrar el colorante por dos semanas y filtrar.
- Almacenar en frasco ámbar.

Solución tampón pH 7,2

- | | | |
|----|----------------------------------|--------|
| a. | Na ₂ HPO ₄ | 6,77 g |
| b. | KH ₂ PO ₄ | 2,59 g |
| c. | Agua destilada | 1,0 L |

Solución de trabajo

- | | | |
|----|------------------------------------|-------|
| a. | Solución concentrada del colorante | 2 mL |
| b. | Solución tampón | 6 mL. |
- Homogenizar la solución antes de usar.

B. Coloración de GRAM

Se emplea para visualizar las blastoconidias y seudomicelios de las especies del género *Cándida spp*, *Malassezia spp* y *Cryptococcus spp*, las cuales generalmente Gram positivas, con variaciones en la intensidad de su coloración. Algunos mohos se tiñen débilmente, asimismo se utiliza en la tinción de actinomicetos.

Solución de cristal violeta

Solución A

- | | | |
|----|-----------------|---------|
| a. | Cristal violeta | 4,0 g |
| b. | Etanol | 20,0 mL |

- Disolver el colorante en etanol.
- Diluir la solución con agua destilada 1:10.

Solución B

- | | | |
|----|-------------------|---------|
| a. | Oxalato de amonio | 0,8 g |
| b. | Agua destilada | 80,0 mL |

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

Solución de yodo (lugol)

- | | | |
|----|-------------------|-------|
| a. | Yodo | 1,0 g |
| b. | Yoduro de potasio | 2,0 g |

- Disolver el yodo y yoduro en 5 mL de agua destilada y aforar a 240 mL de agua destilada.

Contra colorante (colorante de fondo)

- | | | |
|----|--|--------|
| a. | Safranina O al 2,5%
en alcohol al 95% | 10 mL |
| b. | Agua destilada | 100 mL |

- Fijar el frotis con calor o con metanol, adicionar el cristal violeta por un minuto.
- Lavar con agua, aplicar lugol por un minuto.
- Lavar con agua y decolorar con etanol al 95% por 30 s.
- Adicionar safranina por diez segundos.
- Lavar con agua y dejar secar.
- Observar al microscopio con los objetivos de 40X y 100X.

C. Coloración Kinyoun (ZIELHL-NEELSEN Modificado)

Esta tinción es útil para visualizar especies de *Nocardia spp* y para diferenciarlas de otros *actinomicetos spp* aerobios, las especies de *Nocardia spp* son parcialmente ácido-alcohol resistentes

Solución de fucsina - fenicada

Solución A

a.	Fucsina básica	4,0 g
b.	Fenol cristalizado	8,0 mL
c.	Alcohol 95%	20,0 mL
d.	Agua destilada	100,0 mL

- Disolver el colorante en etanol y adicionar el fenol y agua destilada.

Solución acuosa de ácido sulfúrico 1% (decolorante)

Solución B

a.	Ácido sulfúrico concentrado	1 mL
b.	Agua destilada	99 mL
c.		

- Adicionar el ácido sulfúrico al agua destilada, **no alterar el orden**.

Contracolorante

Solución C

a.	Azul de metileno	2,5 g
b.	Etanol 95%	100,0 mL

- Preparar el extendido y fijar al calor.
- Tapar el portaobjeto con papel filtro.
- Cubrir portaobjeto con fucsina fenicada por 5 min.
- Eliminar el exceso de colorante y lavar con agua inmediatamente.
- Decolorar con la solución B y lavar con agua.
- Adicionar la solución C por 1 min, lavar con agua y dejar secar.
- Observar al microscopio con el objetivo de inmersión 1000X

ANEXO II. FICHA DE BIOSEGURIDAD *Candida spp.*

1. ALCANCE

Personal responsable del método estandarizado “Determinación de la sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos” para *Candida spp.*, que lo procesa en el Laboratorio de Micología con nivel de bioseguridad 2 (NBS2).

2. PROCEDIMIENTO

Ficha de seguridad biológica para el manejo seguro de hongos ambientales

3. HOSPEDERO

Humanos de la boca al ano como levadura comensal.

4. FORMA DE TRANSMISIÓN

Candida albicans se encuentra habitualmente en el tracto gastrointestinal, urinario y genital humano; cuando se dan las condiciones necesarias como el caso de personas inmunocomprometidas, se convierte en un patógeno oportunista que produce una infección endógena denominada “candidiasis”. Es infección exógena cuando las causas son los procedimientos quirúrgicos invasivos, el uso generalizado de terapias inmunosupresoras, así como el de antibióticos de amplio espectro, inyecciones narcóticas no estériles, catéteres en huéspedes inmunocomprometidas.

5. DOSIS INFECCIOSA

Desconocida.

6. PERIODO DE INCUBACIÓN

Variable

7. SUSCEPTIBILIDAD A DESINFECTANTES

Sensible al 1% de hipoclorito de sodio, 2% de glutaraldehído, formaldehído, moderadamente sensible al alcohol al 70% (fenol puede ser sustituido)

8. INACTIVACIÓN FÍSICA

Inactivado por calor húmedo (121 °C por al menos 15 min)

9. SOBREVIVENCIA FUERA DEL HOSPEDERO

Sobrevive fuera del hospedero, especialmente en áreas húmedas y oscuras.

10. INMUNIZACIÓN - PROFILAXIS

Inmunización en el humano: ninguna.

Profilaxis en el humano: ninguna.

11. REQUERIMIENTOS DE CONTENCIÓN

Prácticas de bioseguridad nivel 2, que contiene equipamiento y facilidades para la manipulación de este organismo.

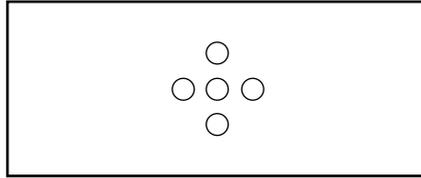
12. ROPA DE PROTECCIÓN

Mandilón, guantes, gorros, botas.

13. DISPOSICIÓN

Descontaminación antes de la disposición final (esterilización, incineración, desinfección química).

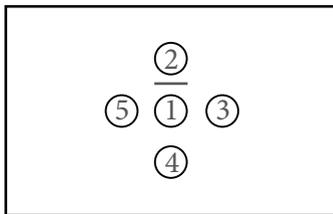
ANEXO III. INMUNODIFUSIÓN EN GEL AGAR - PLANTILLA DE DISTRIBUCIÓN DE POCILLOS



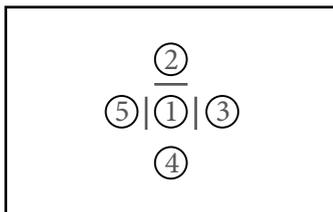
ANEXO IV. INMUNODIFUSIÓN EN GEL AGAR - MAPA DE DISTRIBUCIÓN

	POCILLO	CONTENIDO
	#	Antígeno de <i>Histoplasma capsulatum</i>
	1.	Control positivo
	2.	Muestra de suero de paciente
	3.	Muestra de suero de paciente
	4.	Muestra de suero de paciente
	5.	Muestra de suero de paciente

ANEXO V. INMUNODIFUSIÓN EN GEL AGAR - LECTURA DE RESULTADOS



POSITIVO: presencia de banda de precipitación en el punto de equivalencia de los pocillos del antígeno de *Histoplasma capsulatum* (1), control positivo de *Histoplasma capsulatum* (2) y muestras de suero de paciente (3,5) que tienen anticuerpos dirigidos contra el antígeno *Histoplasma capsulatum*.



NEGATIVO: ausencia de banda de precipitación en el punto de equivalencia de los pocillos del antígeno de *Histoplasma capsulatum* y la muestra de suero de paciente (3,4,5) que no tiene anticuerpos dirigidos contra el antígeno *Histoplasma capsulatum*.

ANEXO VI. LISTADO FORMULARIOS DE CONTROL DE CALIDAD

FORMULARIO	TÍTULO
FOR-001	Control de calidad de hidróxido de potasio Al 10%
FOR-002	Control de calidad medios de cultivo
FOR-003	Control de calidad de hongos filamentosos dermatofitos
FOR-004	Control de calidad de hongos filamentosos especie de <i>Aspergillus</i>
FOR-005	Control de calidad de hongos filamentosos especie de <i>Fusarium</i>
FOR-006	Control de calidad de hongos dimórficos <i>Sporothrix schenckii</i>
FOR-007	Control de calidad de hongos dimórficos especie de <i>Actinomicetales</i>
FOR-008	Control de calidad de hongos levaduriformes especie de <i>Candida</i>
FOR-009	Control de calidad de hongos levaduriformes otras levaduras
FOR-010	Control de calidad de hongos levaduriformes especie de <i>Malassezia</i>
FOR-011	Control de calidad de mantenimiento de cepas referenciales
FOR-012	Control calidad interno y reporte de resultado del método difusión en discos para la determinación de susceptibilidad antifúngica de hongos levaduriforme <i>Candida</i> spp
FOR-013	Control calidad interno y reporte de resultado de inmunodifusión en gel agar
FOR-014	Registro de toma de muestras para la determinación de esporas fúngicas en UFC/M3 en un ambiente Interno”

ANEXO VII. FORMULARIOS DE CONTROL DE CALIDAD

	FORMULARIO	FOR-001
	CONTROL DE CALIDAD DE HIDRÓXIDO DE POTASIO AL 10%	

Características generales

Reactivo:
Marca: Lote:.....
Presentación:..... Fecha de expiración:.....
Fecha de apertura:.....

Control de calidad

Fecha de preparación:.....
Volumen de preparación:..... Concentración de preparación:.....
Fecha de expiración:
Responsable de la preparación:.....

Muestras referenciales

Escamas positivas
Código:.....
Lectura:.....

Escamas negativas
Código:.....
Lectura:.....

RECHAZADO:
ACEPTADO:

NOTA:

Es ACEPTADO si la lectura microscópica corresponde las características fúngicas de la muestra referencial, utilizando el hidróxido de potasio al 10%.



FORMULARIO

FOR-002

CONTROL DE CALIDAD DE MEDIOS DE CULTIVO

Características generales

Medio:.....

Marca:.....

Presentación:.....

Fecha de apertura:.....

Lote:.....

Fecha de expiración:.....

Preparación

Fecha de preparación:.....

Volumen de preparación:.....

Fecha de expiración:

Responsable de la preparación:.....

N.º placa Petri:.....N.º tubos:

Control de calidad

Aspecto

Incoloro: Amarillo suave:

Transparente o translúcido: Otro:

Medio sólido:

Medio líquido:

pH final:

Estéril:

Contaminado:

RECHAZADO:

ACEPTADO:

NOTA:

Es ACEPTADO si las características de aspecto y/o pH corresponde a lo indicado en el medio de cultivo (ver anexos) y no está contaminado



FORMULARIO

FOR-011

CONTROL DE CALIDAD DE MANTENIMIENTO DE CEPAS REFERENCIALES

Características generales

Cepa referencial: N.º vial:
Tipo de conservación: Tº ambiente (25 °C): ...4-8 °C: ... -20 °C: ...
Medio utilizado: Volumen:
Fecha de apertura:

Preparación

Fecha de preparación:..... Medio utilizado:
N.º placa Petri:..... N.º tubos: N.º frascos:
N.º lote: Fecha de expiración:
Responsable de la preparación:

Control de calidad

Cepa referencial: Código:.....
Clave taxonómica:
Cepa referencial replicada: N.º Lote:
Clave taxonómica:.....

RECHAZADO:

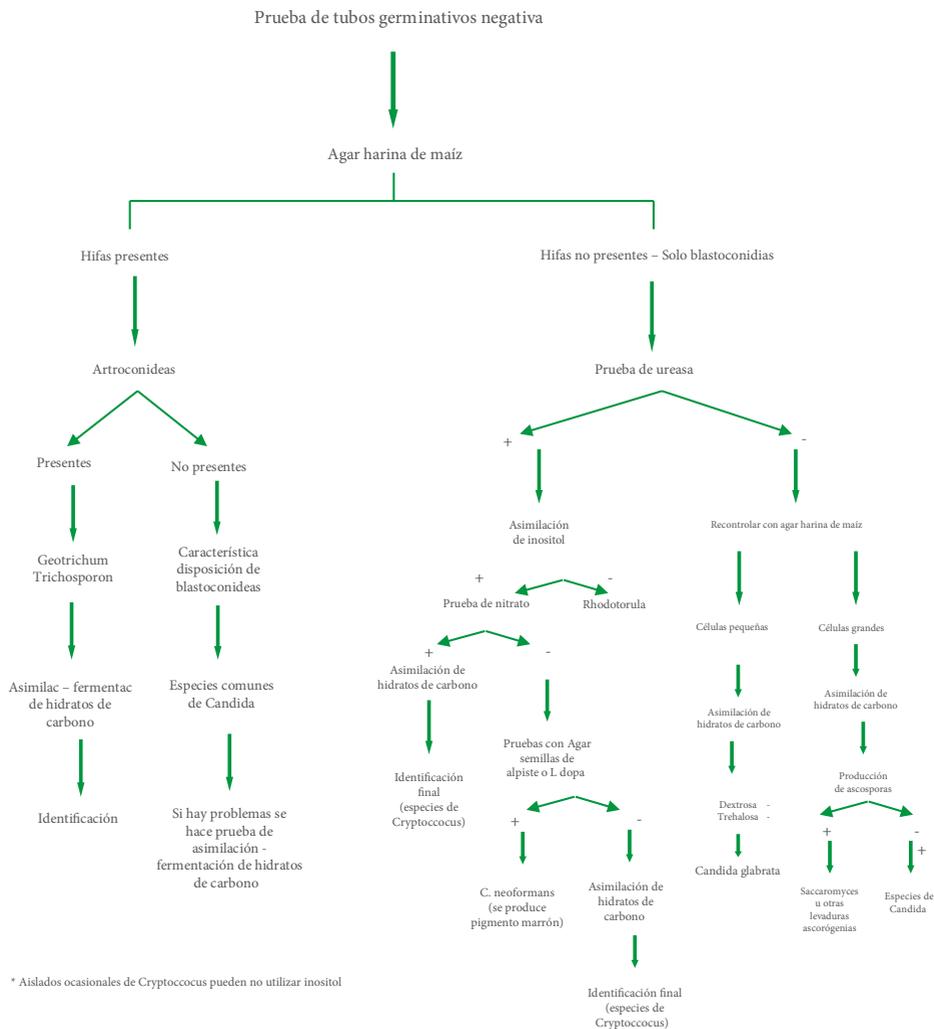
ACEPTADO:

NOTA:

Es ACEPTADO si las claves taxonómicas de la cepa referencial con la cepa referencial replicada son iguales.

ANEXO VIII. DIAGRAMAS DE FLUJO, FIGURAS Y TABLAS

DIAGRAMA DE FLUJO: IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS



FIGURAS HONGOS FILAMENTOSOS

Dermatofitos

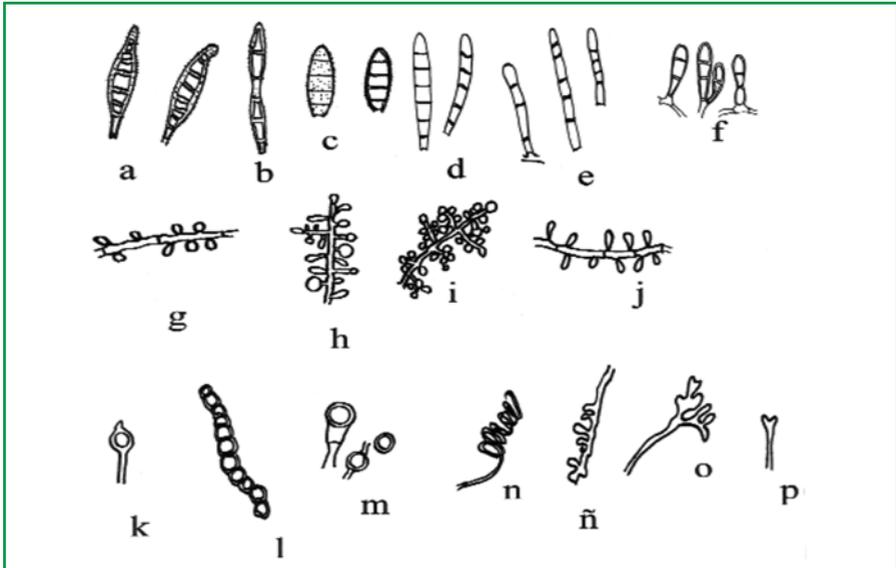
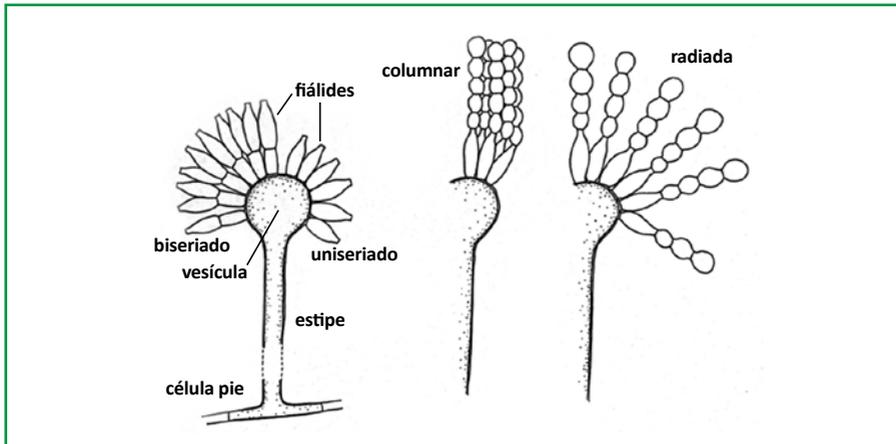


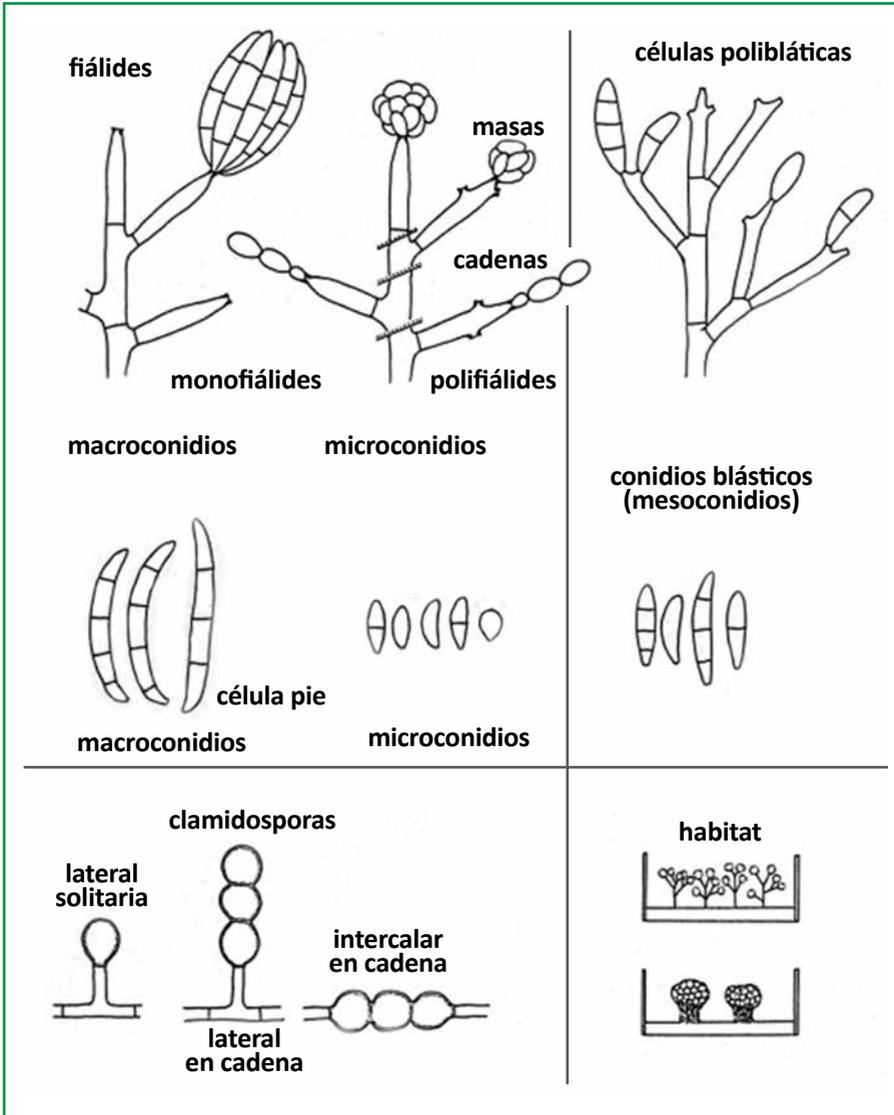
Figura 1.3. Diferentes tipos de macroconidios (a-f), microconidios (g-j), clamidosporas (k-m) e hifas (n-p) (consultar clave).

Aspergillus



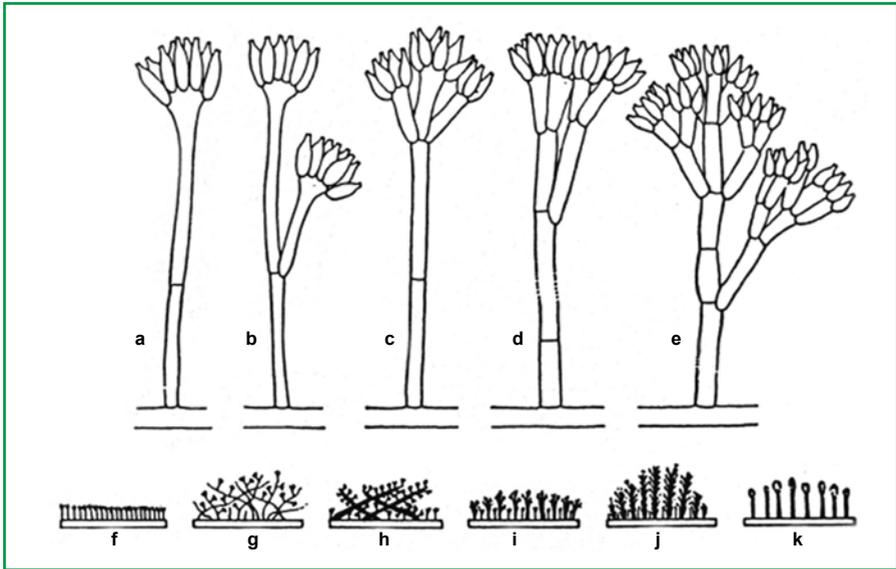
Aspergillus: terminología para la morfología del conidióforo

Fusarium



Fusarium: terminología usada para los distintos tipos de conidios, células conidiógenas, conidióforos y clamidosporas.

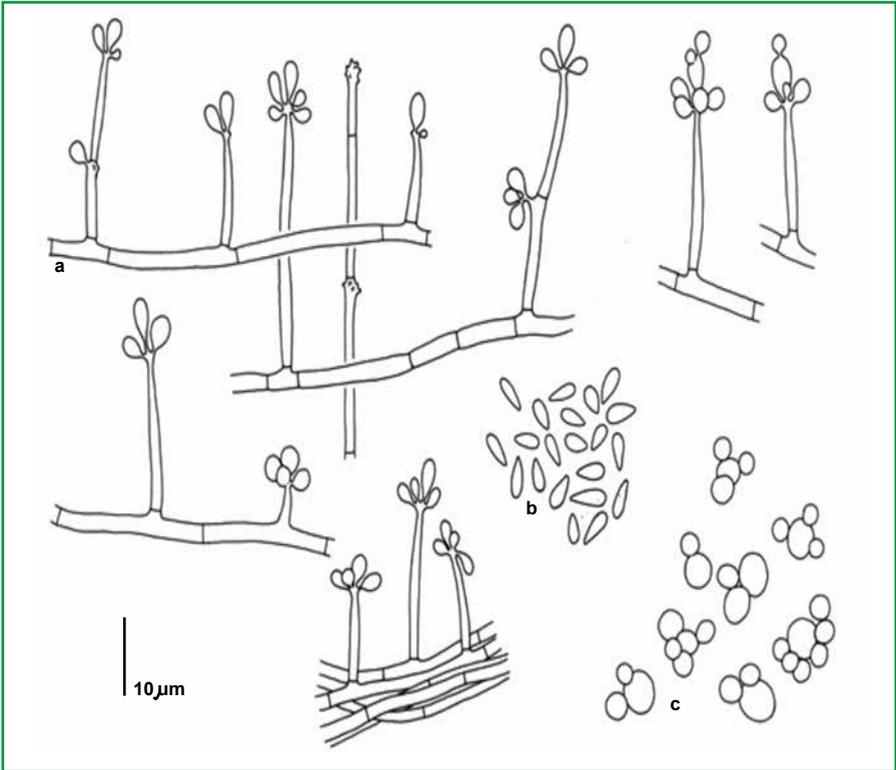
Penicillium



a-e. Tipos de conidióforos: a,b. monoverticilados (=simple); c. biverticilado (=un punto de ramificación); d. triverticilado (=dos puntos de ramificación); e. tetraverticilados (=tres puntos de ramificación); f-k. Tipos de colonias: f. aterciopelada; g. lanosa o algodonosa; h. funiculosa; i-k. fasciculada.

FIGURAS HONGOS DIMÓRFICOS

Sporotrix schenckii



(a) Sistemas conidiales (hifa–conidióforo–conidios); (b) Conidios libres, solitarios o sésiles; (c) Células levaduriformes producidas *in vitro* a 37 °C (De Hoog *et al.*, 2000)

TABLA DE HONGOS FILAMENTOSOS

ESPECIES DE *Aspergillus*

ESPECIE	COLONIA	CONIDIOFORO	VESÍCULA	FIALIDES
<i>A. fumigatus</i>	Aspecto: aterciopelado o pulverulento. Color: verde – azul oscuro.	Cortos y lisos (<300 µm)	Abultada (Ø: 20 – 30 µm)	Disposición uniseriada sobre el tercio superior de vesícula.
<i>A. flavus</i>	Aspecto: aterciopelado. Color: Verde – amarillo o marrón.	Longitud variable y rugosos	Esféricas y voluminosas (Ø: 35 – 45 µm)	Uniseriadas o biseriadas que cubren toda la vesícula.
<i>A. niger</i>	Aspecto: granular. Color: Inicialmente blanco – amarillento y posteriormente negro.	Largos y lisos	Hemisférica y muy voluminosa (Ø: 50 – 75 µm)	Biseriadas y radiales que cubren toda la vesícula.

ANEXO IX. CUADRO "CORRECCIÓN ESTADÍSTICA DE FELLER"

r	Pr	r	Pr	r	Pr	r	Pr	r	Pr	r	Pr	r	Pr	r	Pr
1	1	51	54	101	116	151	189	201	279	251	394	301	557	351	836
2	2	52	56	102	118	152	191	202	281	252	397	302	561	352	844
3	3	53	57	103	119	153	193	203	283	253	400	303	565	353	853
4	4	54	58	104	120	154	194	204	285	251	402	304	569	354	861
5	5	55	59	105	122	155	196	205	287	255	405	305	573	355	870
6	6	56	60	106	123	156	197	206	289	256	408	306	578	356	879
7	7	57	61	107	124	157	199	207	291	257	411	307	582	357	888
8	8	58	63	108	126	158	201	208	293	258	413	308	586	358	897
9	9	59	64	109	127	159	202	209	295	259	416	309	591	359	907
10	10	60	65	110	128	160	204	210	297	260	419	310	595	360	917
11	11	61	66	111	130	161	206	211	299	261	422	311	599	361	927
12	12	62	67	112	131	162	207	212	301	262	425	312	604	362	937
13	13	63	68	113	133	163	209	213	304	263	428	313	608	363	947
14	14	64	70	114	134	164	211	214	306	264	431	314	613	364	958
15	15	65	71	115	135	165	212	215	308	265	433	315	618	365	969
16	16	66	72	116	137	166	214	216	310	266	436	316	622	366	981
17	17	67	73	117	138	167	216	217	312	267	439	317	627	367	992
18	18	68	74	118	140	168	218	218	314	268	442	318	632	368	1005
19	19	69	76	119	141	169	219	219	317	269	445	319	637	369	1017
20	20	70	77	120	142	170	221	220	319	270	449	320	642	370	1030
21	22	71	78	121	144	171	223	221	321	271	452	321	647	371	1043
22	23	72	79	122	145	172	224	222	323	272	455	322	652	372	1057
23	24	73	80	123	147	173	226	223	325	273	458	323	657	373	1071
24	25	74	82	124	148	174	228	224	328	274	461	324	662	374	1086
25	26	75	83	125	150	175	230	225	330	275	464	325	667	375	1102
26	27	76	84	126	151	176	232	226	332	276	467	326	673	376	1118
27	28	77	85	127	153	177	233	227	335	277	471	327	678	377	1134
28	29	78	87	128	154	178	235	228	337	278	474	328	684	378	1152
29	30	79	88	129	156	179	237	229	339	279	477	329	689	379	1170
30	31	80	89	130	157	180	239	230	342	280	480	330	695	380	1189
31	32	81	90	131	158	181	241	231	344	281	484	331	701	381	1209
32	33	82	92	132	160	182	242	232	346	282	487	332	706	382	1230
33	34	83	93	133	161	183	244	233	349	283	491	333	712	383	1252
34	35	84	94	134	163	184	246	234	351	284	494	334	718	384	1276
35	37	85	95	135	164	185	248	235	353	285	497	335	724	385	1301
36	38	86	97	136	166	186	250	236	356	286	501	336	730	386	1327
37	39	87	98	137	167	187	252	237	358	287	504	337	737	387	1356
38	40	88	99	138	169	188	254	238	361	288	508	338	743	388	1387
39	41	89	101	139	171	189	255	239	363	289	511	339	749	389	1420
40	42	90	102	140	172	190	257	240	366	290	515	340	756	390	1456
41	43	91	103	141	174	191	259	241	368	291	519	341	763	391	1496
42	44	92	104	142	175	192	261	242	371	292	522	342	769	392	1541
43	45	93	106	143	177	193	263	243	373	293	526	343	776	393	1591
44	47	94	107	144	178	194	265	244	376	294	530	344	783	394	1648
45	48	95	108	145	180	195	267	245	378	295	534	345	791	395	1715
46	49	96	110	146	181	196	269	246	381	296	537	346	798	396	1795
47	50	97	111	147	183	197	271	2447	384	297	541	347	805	397	1895
48	51	98	112	148	185	198	273	248	386	298	545	348	813	398	2028
49	52	99	114	149	186	199	275	249	389	299	549	349	820	399	2228
50	53	100	115	150	188	200	277	250	391	300	553	350	828	400	2628

Pr = Total del número estadístico probable de unidades formadoras de colonia/m³
r = Número de unidades formadoras de colonias contadas en la placa Petri estándar

ANEXO X. FICHA DE BIOSEGURIDAD DE HONGOS AMBIENTALES

1. ALCANCE

Personal responsable del método estandarizado “Determinación de esporas fúngicas en UFC/m³ en un ambiente interno”, que lo procesa con nivel de bioseguridad 2 (NBS2).

2. PROCEDIMIENTO

Ficha de seguridad biológica para el manejo seguro de hongos ambientales

3. NICHO ECOLÓGICO

Medioambiente interno y externo

4. VIA DE INGRESO

Inhalatoria o por contacto en piel o mucosas

5. DOSIS INFECCIOSA

Desconocida.

6. PERIODO DE INCUBACIÓN

Variable

7. SUSCEPTIBILIDAD A DESINFECTANTES

Sensible al 1% de hipoclorito de sodio, 2% de glutaraldehído, formaldehído, moderadamente sensible al alcohol al 70% (fenol puede ser sustituido)

8. INACTIVACIÓN FÍSICA

Inactivado por calor húmedo (121 °C por al menos 15 min)

9. INMUNIZACIÓN - PROFILAXIS

Inmunización en el humano: ninguna.

Profilaxis en el humano: ninguna.

10. REQUERIMIENTOS DE CONTENCIÓN

Prácticas de bioseguridad nivel 2, que contiene equipamiento y facilidades para la manipulación de este organismo.

11. ROPA DE PROTECCIÓN

Mandilón, guantes, gorros, botas.

12. DISPOSICIÓN

Descontaminación antes de la disposición final (esterilización, incineración, desinfección química).

ANEXO XI. INSTRUCTIVO DE TRABAJO

MANEJO DEL EQUIPO COLECTOR ZEFON A-6 DE PARTÍCULAS MICROBIANAS

1. ARMADO DEL CONO COLECTOR ZEFON

- Destapar el cono colector Zefon abriendo los tres ganchos que lo unen.
- Limpiar el cono colector Zefon con alcohol isopropílico y gasa estéril.
- Colocar la placa Petri que contiene el medio de cultivo a utilizar al cono colector Zefon y taparlo.
- Guardar la tapa de la placa Petri sin medio de cultivo en una bolsa Ziploc estéril.
- Sujetar el cono colector Zefon con los tres ganchos

2. ARMADO DEL EQUIPO

- Colocar el trípode a la máxima altura, enroscar el cono colector Zefon de manera que quede paralelo al piso, y el pico del cono colector Zefon quede perpendicular del piso de la base.
- Verificar que rotámetro de la bomba al vacío se encuentre en 1 ACFM (28,3 L/min).
- Conectar el tubo flexible a la bomba de vacío y al cono colector Zefon.
- Verificar y asegurar el cono colector Zefon con los tres ganchos.
- Encender la bomba de vacío durante 5 min.
- Al finalizar el muestreo, retirar los ganchos, la placa Petri que contiene el medio cubrirlo inmediatamente con la tapa de la placa Petri guardado en la bolsa Ziploc. Sellar la placa Petri con parafilm.
- Desarmar el equipo, limpiar y guardar.

3. ANEXO

- Fotografías del equipo colector Zefon A-6 de partículas microbianas.

FOTOGRAFÍAS DEL EQUIPO COLECTOR ZEFON A-6 DE PARTÍCULAS MICROBIANAS



Cono colector
Zefon



Limpieza
del Cono
colector
Zefon

FOTOGRAFÍAS DEL EQUIPO COLECTOR ZEFON A-6 DE PARTÍCULAS MICROBIANAS

**Cono colector
Zefon con placa
Petri**



**Cono
colector
Zefon
tapado**

FOTOGRAFÍAS DEL EQUIPO COLECTOR ZEFON A-6 DE PARTÍCULAS MICROBIANAS



Trípode a la
máxima altura



Rotámetro
28,3 L por
minuto

Se terminó de imprimir en los talleres gráficos de

Solvima Graf S.A.C.

Jr. Emilio Althaus N° 406, Of. 301 - Lince

contacto@solvimagraf.com / diseño@solvimagraf.com

Télef. 471 - 9149 / 471 - 1972

www.solvimagraf.com

ISBN: 978-612-310-094-0



Instituto Nacional de Salud
Jr. Cápac Yupanqui 1400, Lima 11, Perú
Teléfono: (0511) 748-0000 - (0511) 748-1111
Correo electrónico: postmaster@ins.gob.pe
www.ins.gob.pe