



Identificación de hongos oportunistas de interés clínico

Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Facultad de Ciencias Químicas
Laboratorio de Micología



Michelle Alejandra Ascencio Castillo
Aaron Jared Canela Costilla
Erika Enríquez Domínguez

Identificación de hongos oportunistas de interés clínico

Este material fue elaborado como parte del proyecto profesionalizante de 9no semestre de la carrera de Químico Farmacobiólogo, durante el semestre agosto – diciembre de 2021, en el Laboratorio de Micología de la Facultad de Ciencias Químicas, UASLP.



UASLP

Universidad Autónoma
de San Luis Potosí

Autores

Michelle Alejandra Ascencio Castillo

Estudiante de la carrera de Químico Farmacobiólogo
Facultad de Ciencias Químicas, UASLP.

Aaron Jared Canela Costilla

Estudiante de la carrera de Químico Farmacobiólogo
Facultad de Ciencias Químicas, UASLP.

Erika Enríquez Domínguez

Químico Farmacobiólogo / Maestra en Educación
Responsable del Laboratorio de Micología
Facultad de Ciencias Químicas, UASLP.



FACULTAD DE
**CIENCIAS
QUÍMICAS**



Ilustraciones

Karen Enríquez Domínguez

Licenciada en Diseño Gráfico, Facultad del Hábitat, UASLP.
Maestría en Animación 3D y Postproducción Digital,
University of Advanced Technologies.

Agradecimientos

Dalila Contreras Briones

Químico Farmacobiólogo
Facultad de ciencias Químicas, UASLP.

Abraham Isaac Alfaro García

Estudiante de la carrera de Químico Farmacobiólogo
Facultad de ciencias Químicas, UASLP.



Identificación de hongos oportunistas de interés clínico by Erika Enríquez Domínguez is licensed under a [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

Índice

Presentación	4
Glosario	5
Reglamento	7
Procedimientos para la obtención, transporte y conservación de muestras	9
Candidosis	11
Introducción.....	12
Epidemiología.....	12
Clínica.....	12
Diagnóstico de laboratorio.....	13
Histopatología.....	19
Otras pruebas de identificación.....	20
Mucormicosis	23
Introducción.....	24
Epidemiología.....	24
Clínica.....	24
Diagnóstico de laboratorio.....	25
Histopatología.....	28
Otras pruebas de identificación.....	29
Criptococosis	31
Introducción.....	32
Epidemiología.....	32
Clínica.....	32
Diagnóstico de laboratorio.....	33
Histopatología.....	35
Otras pruebas de identificación.....	36
Aspergilosis	39
Introducción.....	40
Epidemiología.....	40
Clínica.....	40
Diagnóstico de laboratorio.....	41
Histopatología.....	44
Otras pruebas de identificación.....	45
Anexos para la preparación de medios de cultivo y reactivos	47
Bibliografía	59

Presentación

El presente material surge con la intención de poder proporcionar a los estudiantes de la carrera de Químico Farmacobiólogo de nuestra Facultad, un material de consulta accesible que les sea de utilidad para fortalecer sus conocimientos en el área de la micología médica, y de manera más específica en el diagnóstico de las micosis oportunistas. Debido a la situación de pandemia que se vivió en el año 2020, y por la que seguimos pasando hasta el momento de la elaboración de este trabajo, así como al poco tiempo que se le ha destinado a esta área tan importante, es que se consideró realizar este proyecto en apoyo a los estudiantes.

Es importante mencionar que, en nuestro país, en los últimos años las infecciones por hongos han ido en aumento, en gran medida debido al incremento gradual en los factores de oportunismo tales como diabetes, obesidad, drogadicción, enfermedades hematológicas, cáncer, infección por VIH, uso de inmunosupresores por trasplantes o para el tratamiento de la infección por SARS-CoV-2 (COVID-19).

Un aspecto a considerar con respecto a las micosis oportunistas es que la mayoría de ellas son de evolución rápida y con frecuencia pueden llegar a ser mortales. Aquí radica la importancia de contar con herramientas que puedan ser de apoyo para una identificación precisa y oportuna de dichos agentes etiológicos, así como contar con profesionales de la salud formados y fortalecidos esta área.

Dentro de las micosis oportunistas sobresalen la candidosis, criptococosis, mucormicosis, aspergilosis y neumocistosis; siendo las primeras cuatro las más frecuentes debido a su distribución mundial, además de graves e incluso mortales. Por lo anterior, este material trata precisamente estas cuatro micosis principales, abordándolas desde su definición, clínica, epidemiología, diagnóstico de laboratorio, así como otras pruebas disponibles para su identificación.

Por lo tanto, el propósito de llevar a cabo este proyecto ha sido el de dar a conocer la relevancia de la Micología, así como contribuir a la generación de material y a la incorporación de este tipo de contenidos a nuestra carrera como parte de la educación coninúa de nuestros futuros profesionistas. Además, este material fue pensado como un recurso gráfico de apoyo para la identificación de los hongos oportunistas más frecuentes, elaborado por estudiantes para sus compañeros de la carrera de Químico Farmacobiólogo, así como para aquellos profesionales de laboratorio clínico y de la salud interesados en el tema.



Erika Enríquez Domínguez

Glosario de términos en Micología



- * **Apófisis:** Ligero hinchamiento en la parte apical del esporangióforo, por debajo del esporangio.
- * **Cápsula:** Envoltura hialina y gelatinosa que rodea a una célula, formada generalmente de polisacáridos.
- * **Cenocítico:** Sin paredes que separen a los núcleos en células.
- * **Clamidoconidio:** Conidio tálico, redondo de pared gruesa y gran tamaño, producido por modificación de una célula hifal preexistente de reproducción.
- * **Columela:** Se encuentra en los esporangios de los zigomicetos, corresponde a la porción de esporangióforo que aparece dentro del esporangio.
- * **Conidio:** Propágulo originado por un proceso de reproducción asexual.
- * **Conidióforo:** Hifa especializada sobre la cual se originan directa o indirectamente los conidios.
- * **Dimorfismo:** Determinadas especies de hongos pueden presentarse bajo dos aspectos morfológicos diferentes: como fase micelial y fase levadura.
- * **Esclerote:** Masa densa de hifas que forma una unidad reproductora.
- * **Esporangio:** Estructura generalmente vesiculosa que contiene a las esporangiosporas.
- * **Esporangióforo:** Hifa especializada portadora de un esporangio.
- * **Esporangiosporas:** Espora que se encuentra dentro de un esporangio en el extremo de una hifa aérea llamada esporangióforo.
- * **Esterigma o fiálide:** Estructura conidiógena generalmente en forma de botella en la cual se producen los conidios.
- * **Estolón:** Hifa horizontal al sustrato, presente en los Mucorales, que comunica a dos esporangióforos y de la cual se pueden originar los rizoides.
- * **Fíbula:** Divertículo hifal en forma de puente, típico del micelio secundario de los basidiomicetos.
- * **Filamentoso:** Hongo de aspecto algodonoso que en general se desarrollan como saprofitos.
- * **Hifas:** Elemento estructural de los hongos, puede ser unicelular como las levaduras o pluricelular con la forma de filamento septado o no septado.
- * **Hifas envolventes:** Aseptadas, ramificadas, con pared gruesa y extremos acuminados.
- * **Hifas esqueléticas:** Aseptadas, no ramificadas, con pared gruesa, hialinas o coloreadas.
- * **Hifas generativas:** Generan estructuras fértiles, con paredes delgadas, ramificadas, septadas con fíbulas presentes o ausentes.

- * **Hongo:** Organismo eucarionte perteneciente al reino Fungi que puede vivir en el aire, suelo, plantas, agua e incluso en el organismo de los seres vivos.
- * **Hongo contaminante:** Hongo que saprofita con facilidad diversas muestras empleadas para diagnóstico (pus, sangre, expectoración), lo que genera confusiones en el análisis rutinario.
- * **Hongo oportunista:** Hongo normalmente no patógeno y que solo produce una infección cuando las defensas del huésped están disminuidas.
- * **Hongo saprofita:** Hongo que emplea la materia orgánica producida por otros seres vivos como fuente de materia y energía.
- * **Levadura:** Hongo unicelular redondeado de reproducción sexual o asexual.
- * **Micelio:** Conjunto de hifas que forman la parte vegetativa de un hongo.
- * **Microconidios:** Son unicelulares, hialinos, con forma ovoide o piriforme, de paredes lisas y finas, de 2.5 a 3.5 por 4 a 7 μm de tamaño.
- * **Reproducción asexual:** Multiplicación celular por mitosis y que en los hongos da por resultado la producción de conidios.
- * **Rizoide:** Rama corta y delgada de un talo semejante a una raíz vegetal.
- * **Vesícula:** Dilatación del esporangióforo en algunos zigomicetos por debajo del esporangio.

Reglamento del Laboratorio de Micología

El manejo y procesamiento de las muestras clínicas implica el aislamiento de un gran número de agentes infecciosos, muchos de los cuales, sobre todo los hongos, tienen gran facilidad para formar una suspensión aérea a partir del medio de cultivo.

Sin embargo, el riesgo de adquisición de infección en el laboratorio se puede reducir con el empleo de un conjunto de normas de seguridad, basadas tanto en el método de procesamiento de la muestra como en el uso de un equipamiento de protección personal, puesto que, la vía respiratoria y el contacto directo con piel y mucosas son las vías más comunes para la infección fúngica en el laboratorio.



Medidas generales

- El acceso al laboratorio está limitado al personal autorizado.
- Las puertas de acceso al laboratorio y al área de micología deben estar debidamente marcadas con la señalización internacional de riesgo biológico y su nivel de contención biológica, que en el caso del área de micología se corresponde con el nivel 2. También se señalarán los congeladores y refrigeradores utilizados para guardar microorganismos de riesgo de tipo 2.
- Las puertas y ventanas deben permanecer cerradas para mantener la adecuada contención biológica.
- Todas las superficies de trabajo se limpiarán y desinfectarán diariamente, y cuando se produzca un derrame con hipoclorito de sodio al 0.5%.
- Los residuos y muestras peligrosas que van a ser incinerados fuera del laboratorio deben ser transportados en contenedores cerrados, resistentes e impermeables, siguiendo las normas específicas para cada tipo de residuo.
- El área del laboratorio debe permanecer limpia y ordenada.
- Todo el personal debe usar guantes cuando se manipulen muestras o cultivos que contengan posibles patógenos fúngicos.
- Se usarán gafas protectoras y mascarillas faciales si existe riesgo de salpicaduras o aerosoles.
- El uso de bata de laboratorio blanca de manga larga brinda protección personal al trabajador.
- Los derrames y accidentes serán informados inmediatamente al jefe del laboratorio.

- El personal debe lavarse las manos frecuentemente durante las actividades rutinarias, tras acabar la jornada laboral y antes de abandonar el laboratorio.
- El personal con el cabello largo deberá llevarlo recogido.
- Está formalmente prohibido comer, beber y fumar en el área de trabajo, así como el almacenamiento de comidas o bebidas en el laboratorio.
- Todos los cultivos de hongos y muestras clínicas serán manejados en una cabina de bioseguridad de clase II, para evitar la contaminación del laboratorio y del personal.
- Las placas con medios de cultivo para hongos deben ser selladas, para evitar su apertura accidental con cinta adhesiva permeable al oxígeno.
- En caso de utilización de medios de cultivo en tubo, estos deberán disponer de tapón de rosca de seguridad.
- En el caso de trabajar con aislamientos fúngicos dimórficos conocidos, se debe disponer de condiciones de **nivel de contención 3**. En su defecto, sellar las placas con cinta adhesiva y reservar su apertura sólo en cabina de bioseguridad de clase II.
- A pesar de que la mayoría de los hongos oportunistas y saprofitos, no parecen constituir un riesgo de infección para el personal de laboratorio inmunocompetente, la dispersión de los conidios en el laboratorio puede producir reacciones de tipo alérgico, así como contaminación de los medios de cultivo. Por lo que, para proteger al trabajador como al resto del trabajo del laboratorio, deben evitarse grandes exposiciones al ambiente, abriendo tan sólo los medios de cultivo positivos en cabinas de bioseguridad clase II.
- El vertido de todo material infeccioso debe realizarse en recipientes identificados como contenedores de material infeccioso, para que puedan ser descontaminados apropiadamente.



La seguridad biológica se fundamenta en tres elementos:

1. Las técnicas de laboratorio.
2. El equipo de seguridad o barreras primarias.
3. El diseño de la instalación o barreras secundarias.

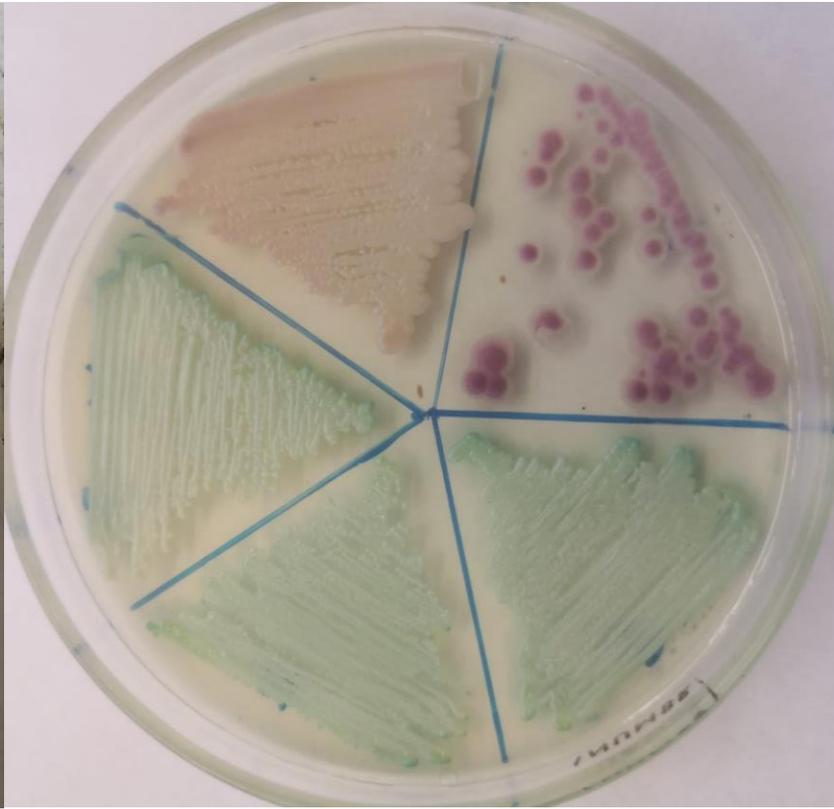
En el área de micología las medidas descritas para nivel de contención 2 son las adecuadas, a excepción de aquellos casos en que se conozca la identidad de la cepa fúngica y corresponda a un hongo dimórfico, se requeriría del nivel de contención 3.

Procedimientos para la obtención, transporte y conservación de muestras



Especímenes biológicos de estudio	
Muestra	Procedimientos
Espuito	<ul style="list-style-type: none"> Indicar al paciente que se realice la higiene bucal con cepillo y pasta dental, complementariamente hacer enjuagues con agua y bicarbonato de sodio. Emitir la muestra en un frasco estéril y de boca ancha, evitando la generación de aerosoles Las muestras deben de transportarse al laboratorio en un plazo no mayor a 2 horas desde su obtención. Una vez recibido el espécimen en el laboratorio se deberá procesar de inmediato o en su defecto conservar en refrigeración a 4 °C hasta por 4 a 6 horas máximo. Para tener un mejor diagnóstico se recomienda procesar tres muestras diferentes de espuito, siendo lo ideal cinco especímenes emitidos en días sucesivos.
Lavado bronqueoalveolar	<ul style="list-style-type: none"> Se obtiene por fibrobroncoscopía, reduciendo la presencia de contaminantes de boca y vías respiratorias superiores. Una vez recibido el espécimen en el laboratorio se deberá procesar de inmediato o en su defecto conservar en refrigeración a 4 °C hasta por 4 a 6 horas máximo.
Orina	<ul style="list-style-type: none"> Se recomienda coleccionar en un recipiente de boca ancha, con tapa rosca y estéril un volumen no menor a 10 mL hasta 20 a 25 mL para un adecuado estudio micológico. El paciente debe retener la orina por lo menos tres horas. La primera parte de la micción se elimina, por contener flora de arrastre de la porción distal de la uretra, de la misma forma desechar la parte final, por su escaso contenido microbiano. Se recoge la parte media de la micción matinal, la más representativa del estado de las vías urinarias y la más idónea para el cultivo. Este procedimiento lo realiza el paciente, quien previamente debe de realizar la limpieza de sus genitales con agua y jabón. En el caso de los varones deben de retraer el prepucio y las mujeres separar los labios para evitar contaminación exógena. En el caso de que la obtención de muestra se realice a través de la instalación de un catéter o sonda vesical, realizarlo previa higiene del meato uretral y genitales externos. En pacientes con sonda permanente, la muestra se obtiene por punción aséptica de la sonda, nunca de la bolsa recogida. Para obtener la muestra de lactantes se debe usar una bolsa colectora estéril la cual se coloca en los genitales manteniéndola hasta la micción. No olvidar realizar la higiene de la zona incluyendo la región anal. Las muestras genitourinarias deben de procesarse inmediatamente después de obtenidas debido a que el rápido desarrollo de las levaduras a temperatura ambiente puede dar una falsa concentración en la muestra. Si no se puede proceder con el análisis, refrigerar la muestra por un máximo de 12 horas.

<p>Sangre</p>	<ul style="list-style-type: none"> • En el caso de adultos recoger de 2 a 3 muestras de 8 a 9 mL de sangre venosa de diferentes punciones y separadas por 30 minutos entre sí. En el caso de niños, obtener un sólo espécimen de 1 a 5 mL, en lactantes 1 a 2 mL y neonatos de 0.5 a 1 mL. • Obtenida la muestra de sangre, ésta debe de ser inoculada de inmediato en el sistema de hemocultivo que el laboratorio trabaja.
<p>Líquido cefalorraquídeo</p>	<ul style="list-style-type: none"> • El médico debe desinfectar la zona por punzar con yodopovidona al 2%, después realizar la punción en los espacios intervertebrales L3 – L4, L4 – L5 ó L5 – S1. • Al llegar al espacio subaracnoideo, retirar el estilete y dejar fluir libremente la muestra. • Recoger un volumen mínimo del espécimen de 5 mL en un tubo estéril con tapa rosca. • Transportar al laboratorio, de no procesar de inmediato conservar a temperatura ambiente por un máximo de 24 horas.
<p>Biopsia</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Se realiza en el quirófano o consultorio bajo las más rigurosas reglas de asepsia. • Obtenida la muestra, ésta se divide en dos porciones de 1 mm, una es colocada en un recipiente estéril con tapa de rosca conteniendo solución salina isotónica estéril para el examen micológico y la otra en formol al 10% en buffer de solución salina para histopatología. • La muestra para el estudio micológico debe de ser remitida de inmediato al laboratorio, de no ser procesada al momento, conservar a 4 °C hasta por 2 a 4 horas máximo.



Candidosis

Introducción

La candidosis o candidiasis es la micosis oportunista más frecuente. Es una infección aguda o crónica de las mucosas, piel, uñas o tejidos profundos, causada por levaduras comensales del género *Candida* que habitan en la piel, mucosas, vías respiratorias altas, tracto genitourinario y tracto digestivo del hombre.

En general, afecta a todos los grupos de edad, sexo, raza y ocupación, lo que determina la adquisición de la micosis es la presencia de factores de oportunismo que predisponen al individuo, como la diabetes, los carcinomas, la leucemia, el tratamiento con fármacos inmunosupresores, inmunodeficiencias con el SIDA, entre otros.

Existen aproximadamente unas 200 especies de *Candida*, sin embargo, las especies relacionadas con patologías son: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. tropicalis* y de forma más reciente *Candida auris*.

Candida auris es una levadura emergente que destaca por generar una fuerte propagación en unidades de cuidados intensivos causando infecciones graves. Se aisló por primera vez como patógeno humano en 2009, y dos años después del primer caso, se dieron los primeros brotes epidémicos en Corea del Sur. Actualmente se han reportado casos en todos los continentes, por lo que se considera que este patógeno es la primera levadura de alta virulencia que representa una amenaza para la salud mundial debido a su multidrogorresistencia (Shaukat *et al.*, 2020)

En su morfología microscópica, los hongos del género *Candida* son levaduras redondas u ovaladas de 3 a 7 μm de diámetro, que se reproducen por blastoconidios, además de que algunas especies como *C. albicans* y *C. dubliniensis* forman pseudomicelio y clamidoconidios. (Martínez, 2012).

Epidemiología

La candidosis es una infección fúngica grave, su incidencia ha aumentado en los últimos años y con ello la mortalidad. Las tasas anuales de candidosis oscilan entre 1.2 a 14 casos por cada 100,000 habitantes, siendo la carga estimada para México de 5,617 casos por año, casi todos ocurren en el contexto hospitalario donde la incidencia es 10 veces mayor que fuera del hospital.

Por lo tanto, la tasa de incidencia de la candidosis es probablemente superior a 8.6 casos por cada 100 000 habitantes y al menos 3.5 por cada 100,000 habitantes mueren cada año por esta condición, muchos sin un diagnóstico o tratamiento adecuado. (Corzo-León, 2016).

Clínica

Las formas clínicas dependen de la localización de la infección, siendo las principales (Bonifaz, 2020):

- ▶ **Candidosis vulvovaginal:** Predomina un enantema doloroso con exudado blanco o beige, por debajo del cual puede haber petequias o erosiones hemorrágicas que suelen ulcerarse.
- ▶ **Candidosis sistémica:** Los signos y síntomas son inespecíficos y suele confundirse fácilmente con infecciones bacterianas. Por lo regular se presenta fiebre irregular, astenia, adinamia y mal estado general, esta sintomatología se acompaña de la ocasionada por el órgano afectado.
- ▶ **Candidosis gastroesofágica:** Se presenta hemorragia gástrica, disfagia, vómito y dolor retroesternal intenso, siendo un cuadro indistinguible de otras patologías frecuentes a este nivel.
- ▶ **Candidosis intestinal:** Los datos clínicos más sobresalientes son diarreas con evacuaciones mucosas de color blanco, dolor abdominal moderado y meteorismo.
- ▶ **Candidosis pulmonar:** Frecuentemente se presenta el síndrome neumónico caracterizado por tos, dolor torácico, disnea y esputo blanco.
- ▶ **Candidosis urinaria:** Puede ser únicamente de riñón, en cuyo caso se presenta polaquiuria, dolor vesical y manifestaciones de uretritis.

Diagnóstico de laboratorio

▶ EXAMEN DIRECTO

Se debe proceder según sea el tipo de muestra. Para el caso de la orina y el líquido cefalorraquídeo se centrifugan y se toman unas gotas del sedimento. Al frasco con esputo se le agregan 5 mL de hidróxido de sodio (NaOH) al 15% para hidrolizar. Las muestras son examinadas agregando hidróxido de potasio (KOH) al 15% y deberán observarse al microscopio con el objetivo de 40X células redondas u ovaladas con blastoconidios y en algunas ocasiones con pseudofilamentos, que son característicos de *Candida* (figura 1).

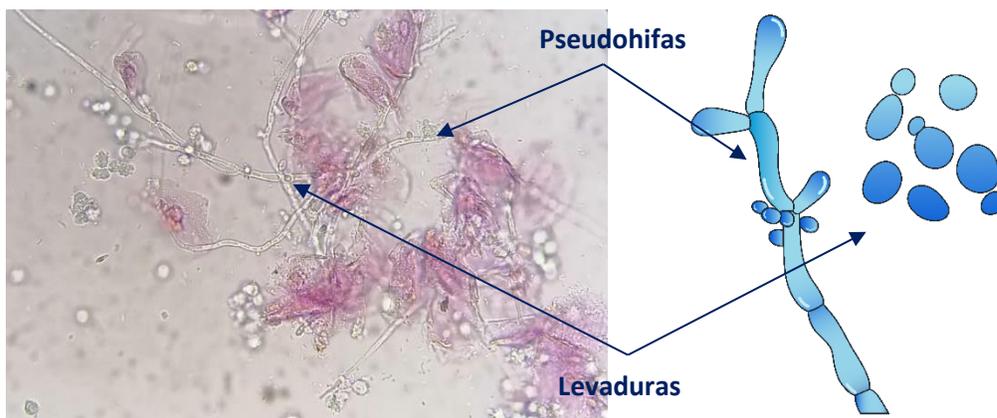
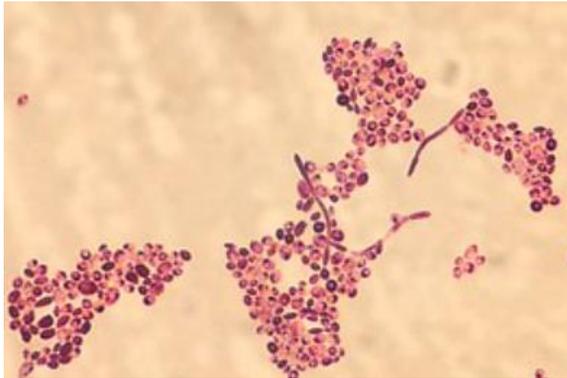


Figura 1. Levaduras en gemación ovaladas con presencia de abundantes pseudohifas a 40X en muestra de orina.

► TINCIONES



Las muestras se tiñen con la técnica de Gram, observándose al microscopio con el objetivo de 40X claramente las levaduras redondas u ovaladas, con o sin filamentos, las levaduras suelen comportarse como Gram positivas (figura 2).

Figura 2. Levaduras de *Candida albicans* con tinción de Gram a 40X. (Clancy, 2018).

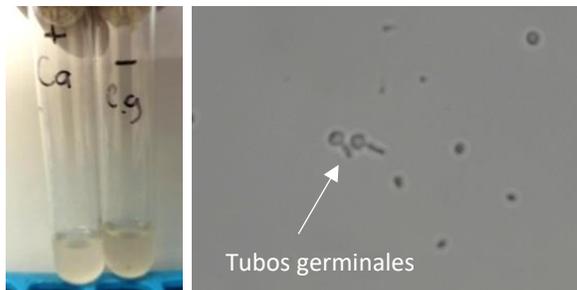
► PRUEBAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES

Tubo germinal: Permite diferenciar entre las especies de *Candida albicans* y *Candida glabrata*.

Procedimiento: Suspender un inóculo de la cepa pura de *Candida* con 24 horas de desarrollo en 2 mL de medio de Lee. Incubar de 35 a 37 °C por 3 horas. Colocar 2 ó 3 gotas de la suspensión en un portaobjetos y cubrir con un cubreobjetos para observar al microscopio con el objetivo de 40X.

Interpretación: La prueba es positiva al visualizar una estructura elongada que se origina a partir de la levadura. *Candida albicans* y *C. dubliniensis* dan positiva esta prueba a las 3 hrs., después de este tiempo todas las especies de *Candida* son capaces de producir tubo germinal excepto *C. glabrata*.

- Control positivo: *Candida albicans*. Figura 3 b y d.
- Control negativo: *Candida glabrata*. Figura 3 c.



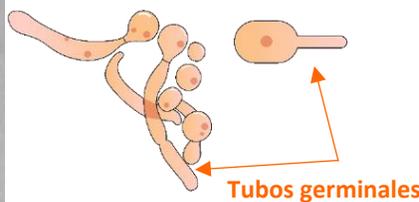
a. Cepas de *Candida* en medio de Lee

b. Prueba positiva para *Candida albicans*

El tubo germinal es una elongación que surge desde la levadura sin constricción, esa es la diferencia con el pseudomicelio.



c. Prueba negativa para *Candida glabrata* (40x)



d. Representación de tubos germinales

Figura 3. Tubo germinal o filamentación en suero

Desarrollo a 42 °C: Permite diferenciar entre *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* que tienen comportamiento fisiológico y morfológico similar.

Procedimiento: Sembrar la cepa aislada en tubo o placa Petri que contenga agar papa dextrosa e incubar a 42 °C por 48 horas. Al mismo tiempo, sembrar un segundo tubo o caja con la misma cepa a manera de control positivo e incubar a 28°C, esto para comprobar la viabilidad de la cepa.

Interpretación:

- Control positivo: *Candida albicans* con desarrollo óptimo a 42°C. Figura 4.
- Control negativo: *Candida dubliniensis* sin desarrollo.



Figura 4. *Candida albicans* (izquierda) y *Candida dubliniensis* (derecha), en este caso, ambas con desarrollo óptimo a los 42°C. Cepas termotolerantes.

Algo importante a considerar es que en algunas bibliografías describen que *Candida dubliniensis* puede diferenciarse de *C. albicans* por ausencia de crecimiento a los 42°C, sin embargo, hallazgos más recientes demuestran que algunos aislados de *C. dubliniensis* tienen la capacidad de crecer a 42° y 45°C (Guilarte, 2019), tal como se muestra en la figura 4.

Formación de película: Algunas especies de *Candida* son capaces de producir una película y gas sobre la superficie del medio de cultivo líquido.

Procedimiento: Inocular una asada de la colonia de levadura en un tubo de vidrio que contenga 5 mL de caldo Sabouraud. Incubar a 25 °C por 3 días. Para esa prueba es importante no prolongar el tiempo de incubación más de lo indicado.

Interpretación:

- Control positivo: *Candida tropicalis* con producción de película. Figura 5 a.
- Control negativo: *Candida albicans* sin producción de película. Figura 5 b.

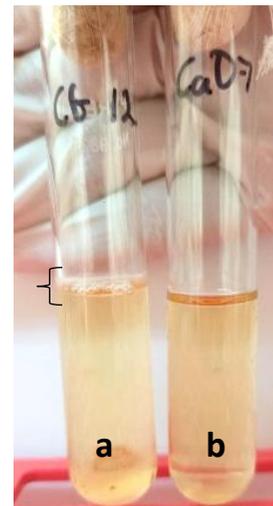


Figura 5. *Candida tropicalis* con formación de película y producción de gas (a)

Candida albicans sin formación de película (b)

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

Procedimiento: Se realiza subcultivando la cepa sobre agar Micosel. Incubar a 25 °C por 3 días.

Interpretación (figura 6):

- Cepa sensible: *Candida tropicalis* y *Candida glabrata* no crecen en micosel.
- Cepa resistente: *Candida albicans* y *Candida guilliermondii* sí crecen en el medio.

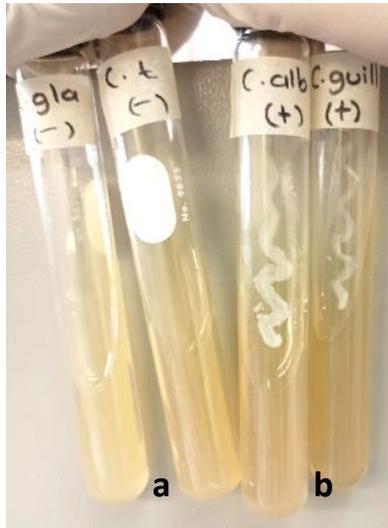


Figura 6a. *Candida glabrata* y *Candida tropicalis* sin desarrollo en el medio de Micosel. Cepas sensibles a la cicloheximida.

Figura 6b. *Candida albicans* y *Candida guilliermondii* con desarrollo en el medio de Micosel. Cepas resistentes a la cicloheximida.

CHROMagar Candida: Permite identificar las especies clínicamente importantes del género *Candida*, al diferenciar entre *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. dubliniensis* y *C. glabrata* en función de los colores que desarrollan en este medio.

Procedimiento: La siembra se realiza según las técnicas tradicionales y las placas se incuban de 30 a 37 °C durante 24 a 48 horas para que las levaduras desarrollen completamente el color.

Interpretación: Los colores de las colonias para cada una de las especies son (figura 7):

- *Candida albicans*: Color verde esmeralda
- *Candida dubliniensis*: Color verde oscuro
- *Candida tropicalis*: Color azul oscuro o grisáceo
- *Candida krusei*: Colonias rugosas color rosado en el centro y el borde color blanco
- *Candida parapsilosis*: Color rosa con tonos lila
- *Candida glabrata*: Color violeta a morado
- *Candida guilliermondii*: Color violeta a morado

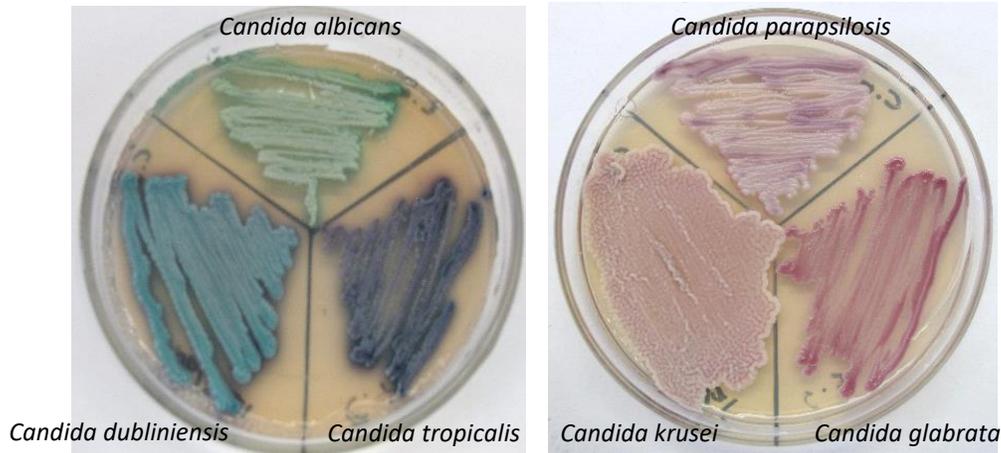
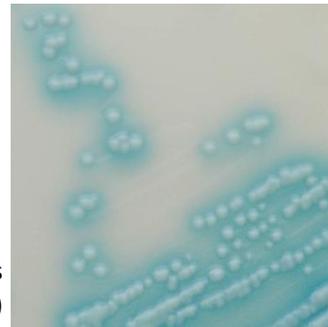


Figura 7. Diferentes especies de *Candida* en Chrom agar

Las demás especies desarrollan colores y tonalidades diversas que no permiten su identificación por este medio cromogénico comercial. Actualmente existe una presentación de CHROMagar, CHROMagar™ *Candida* Plus, que permite la identificación de *Candida auris* mediante el desarrollo de colonias azul claro con un halo azul en este medio (figura 8).

Figura 8. *Candida auris* en CHROMagar™ *Candida* Plus (Chromagar, 2020)



BiGGY agar: Su nombre BiGGY proviene de las siglas en inglés Bismuth Glucose Glycine Yeast. Es considerado un medio parcialmente selectivo para el aislamiento e identificación de levaduras debido a los citratos en el medio de cultivo que inhiben el desarrollo de algunas bacterias. Es utilizado especialmente para el aislamiento e identificación del género *Candida*, ya que todas las especies de este género tienen la capacidad de reducir la sal de bismuto a bismuto y el sulfito a sulfuro generando un precipitado marrón que se refleja en el color de las colonias. También es un medio diferencial porque dependiendo de la especie involucrada se observarán características distintas en cuanto a aspecto, color y tamaño.

Procedimiento: La siembra se realiza por estría y las placas se incuban de 25 a 28 °C durante 48 a 72 horas.

Interpretación: Las colonias de estas especies son:

- ***Candida albicans*:** Las colonias son lisas, redondas, color café o negras, con un ligero borde micelial. Con la salvedad de que el color oscuro no se difunde al medio.
- ***Candida tropicalis*:** Las colonias son pequeñas de color gris oscuro y ligero borde micelial. El color oscuro se difunde hacia el medio, característica que es propia de esta especie, después de haber sido incubada durante 72 horas (figura 9).
- ***Candida krusei*:** Las colonias son de aspecto rugoso, planas, de gran tamaño, con bordes rojizos o marrones.



El medio de BiGGY Posee buena sensibilidad y especificidad, sin embargo, al compararlo con otros medios con función similar, este queda en segundo lugar, siendo superado por el CHROMagar. Por esta razón muchos laboratorios prefieren este último, aunque es mucho más costoso.

Figura 9. *Candida tropicalis* en medio de BiGGY. Colonias pequeñas color gris oscuro a café.

Agar Pagano Levin: Permite aislar y diferenciar especies del género *Candida*. La diferenciación se basa en la capacidad de las especies del género *Candida* para reducir el 2,3,5-trifenil tetrazolio cloruro (solución TTC), un indicador redox que es incoloro en forma oxidada y cuando se reduce forma un compuesto trifenilo rojo insoluble que aparece como colonias de color rojo. *Candida albicans* es la única especie que no reduce las sales de tetrazolio, por lo que se observan colonias color crema a rosado (figura 10).

Procedimiento: La siembra se realiza según las técnicas tradicionales y las placas se incuban de 30 a 37 °C durante 18 a 48 horas.

Interpretación: Las colonias de estas especies son:

- ***Candida albicans*:** Color crema a rosado
- ***Candida parapsilosis*:** Color rojo a granate.
- ***Candida krusei*:** Colonia rugosa color crema a rojizo.
- ***Candida tropicalis*:** Color rojo a granate.

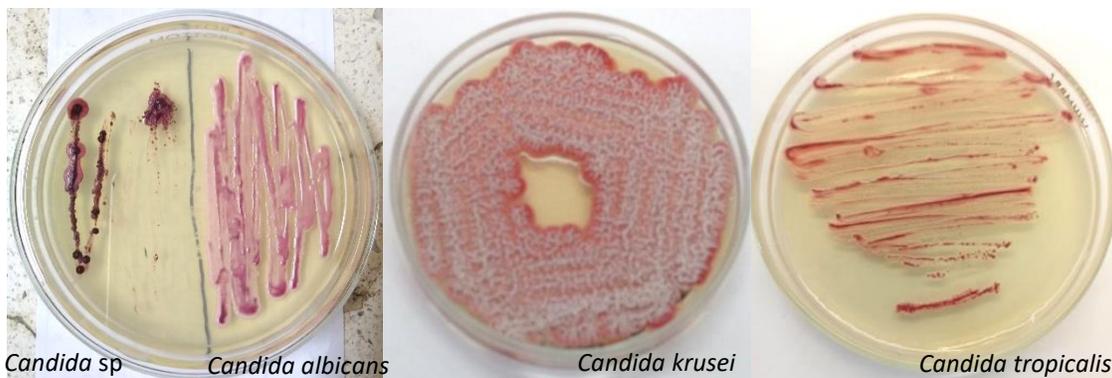


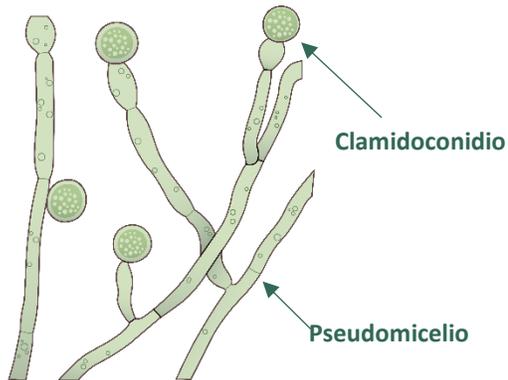
Figura 10. Diferentes especies de *Candida* en medio de Pagano-Levin

Agar Tabaco: Es un medio de cultivo que permite evaluar la producción de clamidoconidios por parte de *Candida albicans* y *C. dubliniensis* (figura 11).

Procedimiento: Se inocula la cepa en cuestión por estría en el medio de cultivo, y este se incuba de 28 a 30°C hasta por 10 días.

Interpretación (figura 12):

- Clamidoconidios únicos: *Candida albicans*
- Clamidoconidios múltiples: *Candida dubliniensis*



Los clamidoconidios son estructuras de resistencia, de pared gruesa, que produce la levadura al encontrarse en condiciones adversas. Estos pueden encontrarse de forma terminal o intercalar.

Figura 11. Esquema de clamidoconidios únicos de *Candida albicans*

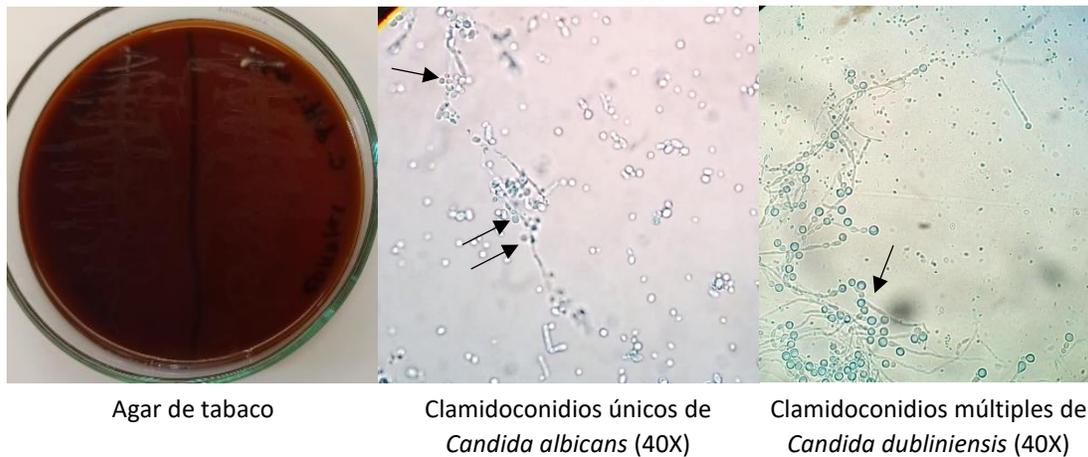


Figura 12. Clamidoconidios de *Candida* en agar Tabaco.

► HISTOPATOLOGÍA

Se encuentran diferentes imágenes dependiendo del tipo clínico de candidosis y del tiempo de evolución, donde los elementos fúngicos (levaduras y pseudomicelio) se observan fácilmente al microscopio con el objetivo de 100X en los cortes histológicos teñidos con la tinción de ácido peryódico de Schiff (PAS) (figura 13) o la tinción de Gomori-Grocott.

PNA-FISH (Peptide nucleic acid-fluorescent in situ hybridization): Es un novedoso método molecular que ayuda a la rápida identificación de las especies más relevantes clínicamente de *Candida*. Después de realizada una tinción de Gram para comprobar la presencia de *Candida*, se pueden estudiar las preparaciones con PNA-FISH, se observará una fluorescencia que es específica para determinadas especies de *Candida* (figura 16). A pesar de que es una prueba útil, la necesidad de emplear microscopía fluorescente y el coste de los reactivos limita el uso de este ensayo en los laboratorios clínicos.

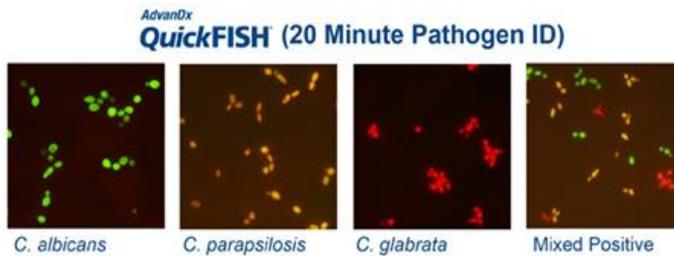


Figura 16. Identificación de las especies de *Candida* con el método QuickFISH®. (Clancy, 2018).

PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa): Puede ser utilizada para identificar especies de *Candida* en muestras de sangre, con una reducción del tiempo de identificación de las especies a 7 horas, además, la PCR puede detectar más de una especie de *Candida* en un mismo paciente, mientras que los hemocultivos suelen demostrar solamente una especie (figura 17). La capacidad de detectar e identificar más de una especie de *Candida* influye sobre el tratamiento y los resultados, particularmente cuando una de las especies es resistente a los compuestos azólicos.

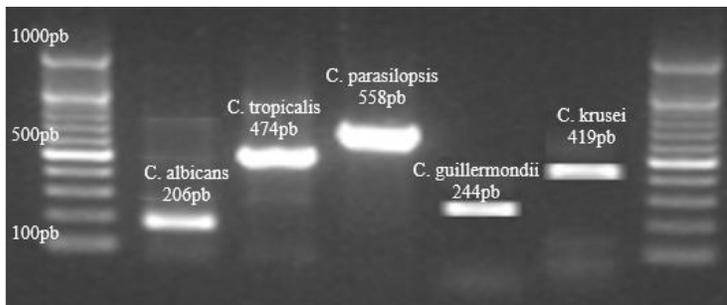


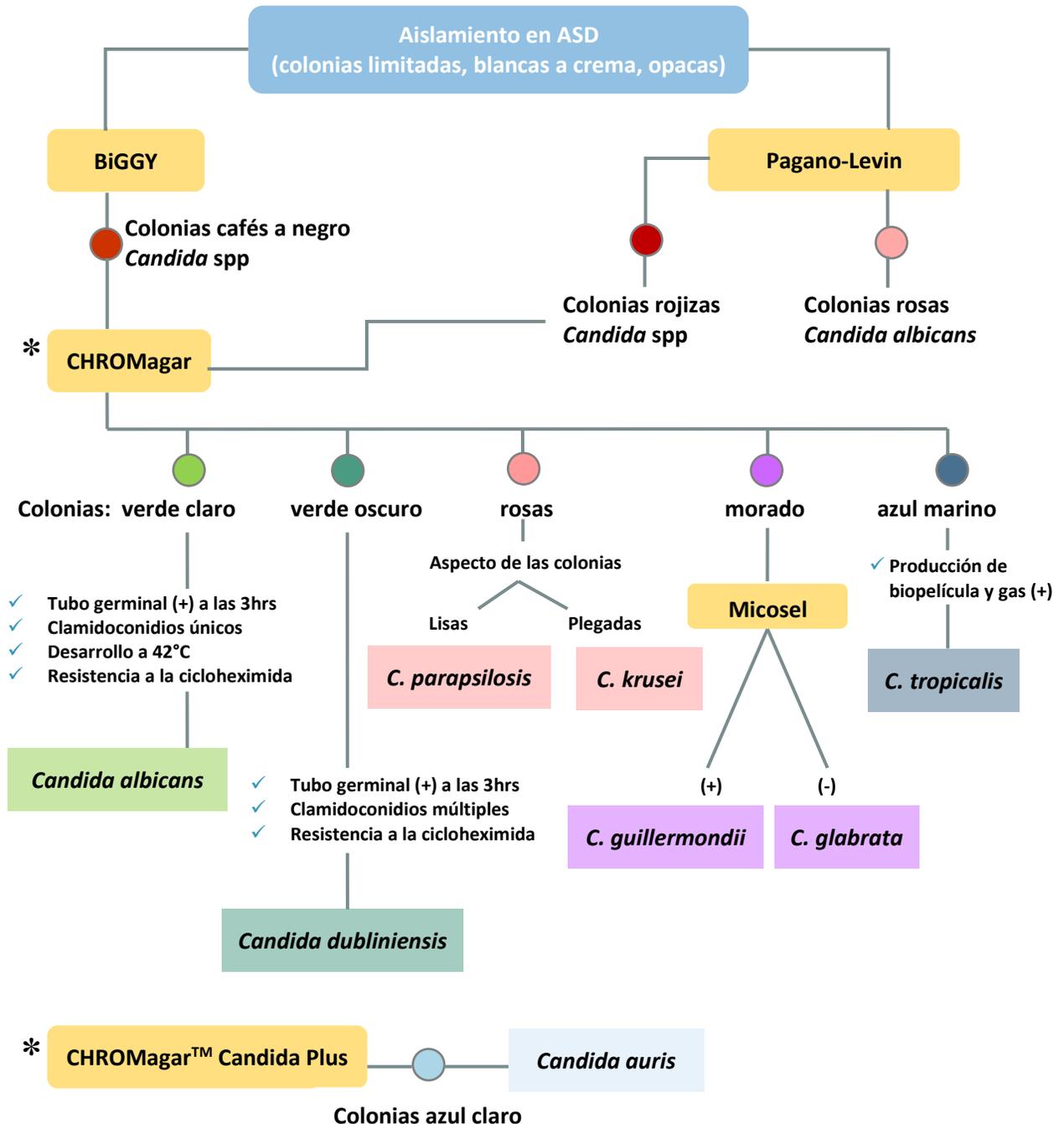
Figura 17. PCR múltiplex para la identificación de especies de *Candida* (Guevara M, 2007).

Susceptibilidad antifúngica con tiras E-test: Es una prueba de sensibilidad antimicrobiana que ha sido adaptada para ser utilizada con agentes antifúngicos. En este sencillo método el hongo es inoculado en la superficie de una placa de agar sobre la que se coloca una tira plástica que contiene un gradiente de concentraciones del antimicótico. Después de la incubación de un hongo sensible se puede observar una zona de inhibición y el valor de concentración mínima inhibitoria (MIC) se lee en el punto en el que la zona intersecciona con la tira (figura 18).

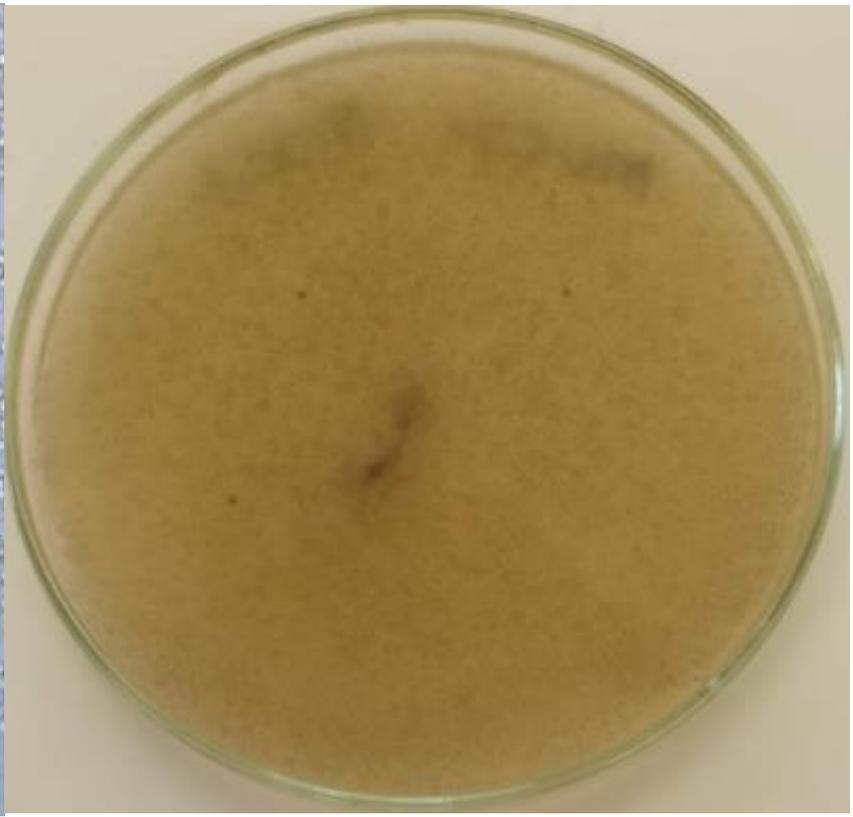
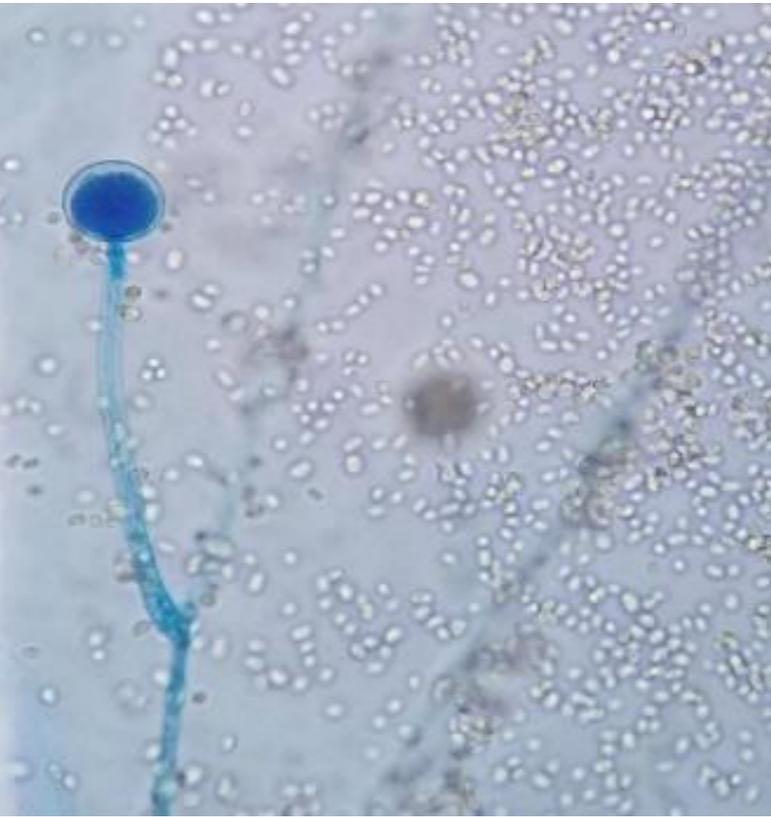


Figura 18. E-test resultados de un aislado de *Candida albicans* (Guevara M, 2007).

Resumen de la identificación de *Candida* en el laboratorio.



Otras pruebas: PCR, MALDI-TOF, PNA-FISH, ELISA



Mucormycosis

Introducción

La mucormicosis es una micosis producida por hongos oportunistas del orden *Mucorales* del phylum *Zygomycota*, ampliamente distribuida, poco frecuente y que ha venido en aumento en los últimos años debido al incremento de pacientes con algún tipo de inmunosupresión (SIDA, trasplantes, terapias inmunosupresoras, diabetes mellitus, entre otras).

La vía de entrada más frecuente es la respiratoria; también existe implantación en mucosa bucal, nasal y conjuntival, y la inoculación cutánea por traumatismo, cirugías y aplicación de material contaminado.

Es una infección con una evolución aguda y mortal, que requiere un diagnóstico y un tratamiento tempranos para evitar posibles complicaciones y la muerte (Astorga, 2014).

Epidemiología

La mucormicosis es causada por hongos aerobios saprofitos oportunistas del orden de los mucorales: *Rhizopus* es el más frecuente, seguido de *Absidia* y *Mucor*. Estos microorganismos son termotolerantes, comúnmente asociados con materia orgánica en descomposición.

Es una micosis con una amplia distribución geográfica, ya que los agentes causales están ampliamente difundidos, encontrándose, en cualquier sustrato que contenga carbohidratos; incluso se han identificado en el medio ambiente de hospitales, pueden ser dispersados en el medio hospitalario por corrientes de aire o por objetos en contacto directo con los pacientes. (Martínez, 2012).

Clínica

Las variedades clínicas más frecuentes son (Quiroz, 2017):

- ▶ **Rinocerebral:** Es la forma clínica más común, se origina en los senos paranasales después de la inhalación de esporas en un huésped vulnerable, con extensión al sistema nervioso central. La diabetes mellitus de tipo 2 descompensada es la condición más asociada a esta forma clínica. Los síntomas iniciales son similares a los de una sinusitis aguda, e incluyen dolor facial, congestión nasal, fiebre, edema de tejidos blandos y cefalea. Puede asociarse a ulceración nasal. La progresión de la enfermedad es rápida si no se trata a tiempo, con necrosis a los tejidos contiguos.
- ▶ **Pulmonar:** La fiebre y la tos son los síntomas más comunes, asociados a dolor pleurítico y disnea, la hemoptisis se presenta cuando hay invasión de los vasos sanguíneos. Se han establecido algunas características radiológicas especiales para la mucormicosis: sinusitis concomitante, la presencia de más de 10 nódulos, así como la formación de micronódulos, derrame pleural en la tomografía computadorizada y uso previo de voriconazol como profilaxis.

- ▶ **Cutánea:** Aparece como una mácula o placa eritematosa, dolorosa e indurada que evoluciona a una lesión similar a una ectima, de tipo placa violácea necrótica, circunscrita a la zona afectada.
- ▶ **Gastrointestinal:** Los síntomas más comunes son dolor abdominal, diarrea, melenas y hematemesis. Las lesiones gastrointestinales son úlceras necróticas que pueden producir perforación y peritonitis. Los infartos intestinales y el choque hemorrágico también se han reportado asociados a la mucormicosis; sin embargo, el pronóstico de estos pacientes es pobre.

Diagnóstico de laboratorio

▶ EXAMEN DIRECTO

Se realiza en lugol, hidróxido de potasio (KOH) o negro de clorazol. Al frasco con esputo se le agregan 5 mL de hidróxido de sodio (NaOH) al 15% para hidrolizar. Las muestras son examinadas agregando KOH al 15% y deberán observarse hifas muy irregulares, con bordes externos no paralelos y diámetro variable de entre 5 a 25 μm , no suelen presentar septos y las ramificaciones son generalmente en ángulo recto arriba de los rizoides (figura 19).

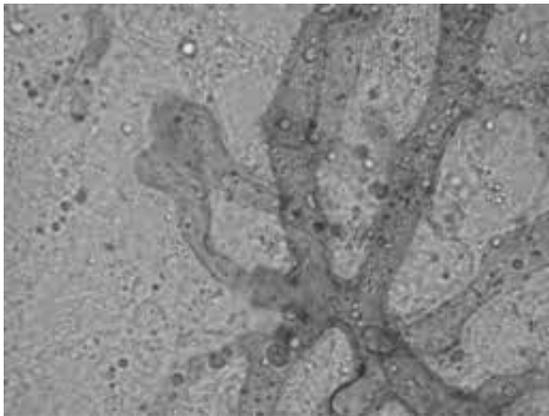


Figura 19. Hifas no septadas de *Rhizopus* a 100x (Quiroz, 2017).

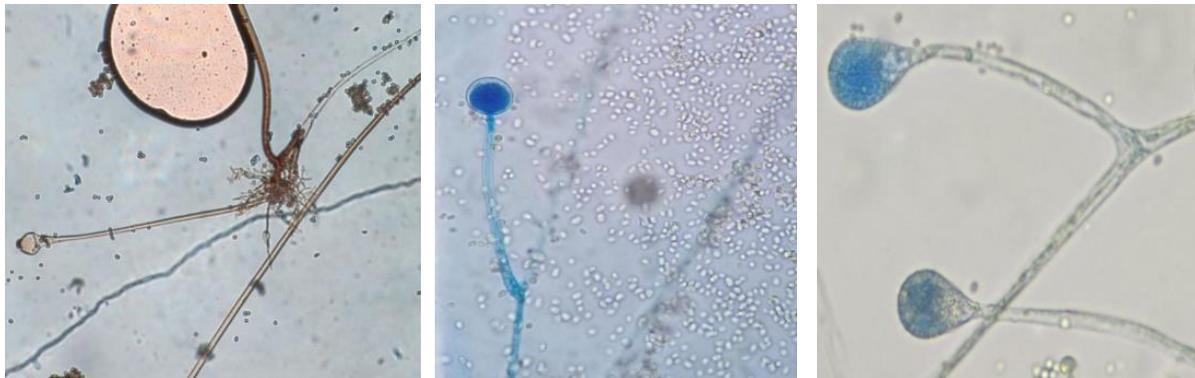
▶ TINCIONES

Las preparaciones directas u obtenidas mediante microcultivos pueden teñirse con azul algodón lactofenol, y las características microscópicas de los agentes más frecuentes causantes de mucormicosis, son las siguientes:

Rhizopus: La presencia de estolones y rizoides es característica. Hay formación de esporangióforos con columela y multiesporados únicos o en grupo a partir de los nodos directamente (figuras 20 y 21).

Absidia: Los esporangióforos son hialinos o ligeramente pigmentados, simples o ramificados que surgen de los estalones solitarios, en grupos de tres o en verticilos de hasta siete; muy escasamente producen rizoides (figuras 20 y 23).

Mucor: Ausencia de estolones y rizoides. Presencia de esporangióforos erectos, simples o ramificados formando un gran esporangio multiesporado con una bien desarrollada columela con un “collarete” notorio en la base (figuras 20 y 22).



Rhizopus a 10X.

Mucor a 40X.

Absidia a 40X.

Figura 20. Exámenes directos con azul algodón lactofenol de los principales agentes causantes de mucormicosis.

Esporangióforo de *Rhizopus*

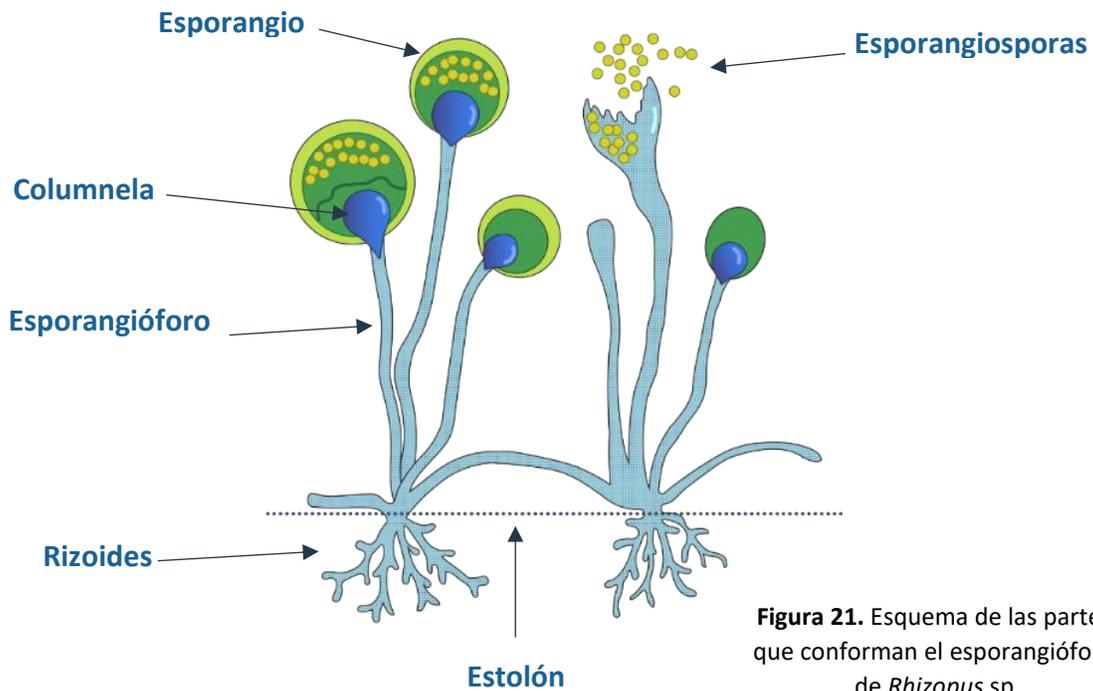


Figura 21. Esquema de las partes que conforman el esporangióforo de *Rhizopus* sp

Esporangióforo de *Mucor*

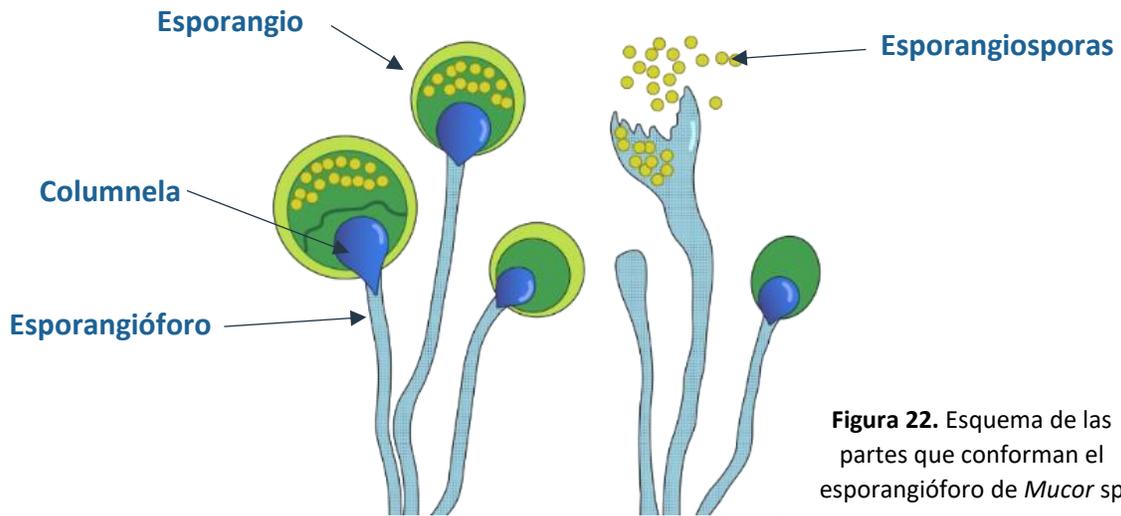


Figura 22. Esquema de las partes que conforman el esporangióforo de *Mucor* sp

Esporangióforo de *Absidia*

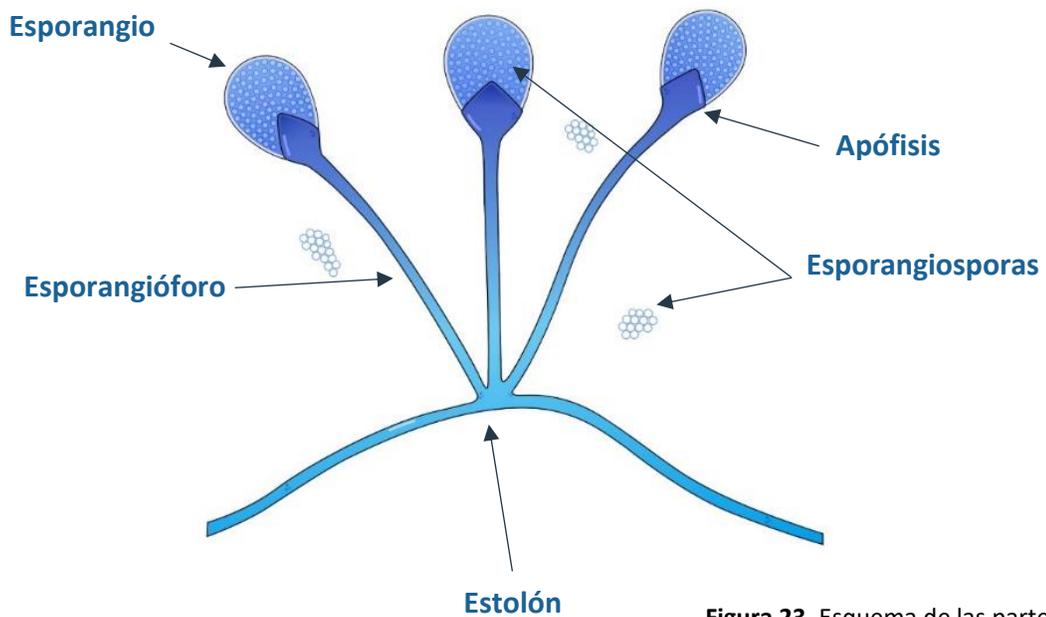


Figura 23. Esquema de las partes que conforman el esporangióforo de *Absidia* sp

Absidia puede llegar a presentar hifas en rizoides, al igual que *Rhizopus*

► CULTIVOS

Los mucorales crecen prácticamente en todos los medios sin cicloheximida. Se incuban a 25 o a 37°C y en 12 a 18 horas ya es visible la colonia. Después de 3 a 5 días se pueden observar colonias maduras invasivas.

Para estimular la conidiación de estos hongos se recomienda utilizar agar extracto de malta.

Rhizopus: Las colonias son densas, invasivas y algodonosas, crecen muy rápido y primero son blancas, pero con la esporulación se transforman en grises o marrones.

Mucor: Las colonias crecen muy rápido y son algodonosas o flocosas, de blancas a amarillas, que se convierten en gris oscuro con el desarrollo de los esporangios.

Absidia: Las colonias son de crecimiento rápido, flocosas, blanco al principio, convirtiéndose en gris pálido con el tiempo.



Cultivo de *Rhizopus* sp

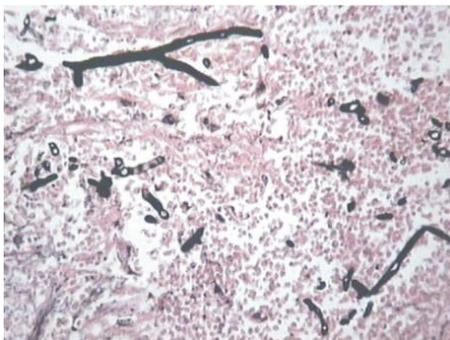
Cultivo de *Mucor* sp

Cultivo de *Absidia* sp

Figura 24. Cultivo de los principales agentes causantes de mucormicosis en agar extracto de malta.

► HISTOPATOLOGÍA

Los agentes etiológicos de lo mucormicosis se observan fácilmente en preparaciones teñidas con hematoxilina-eosina, Gomori-Grocott y ácido peryódico de Schiff (PAS). Comúnmente se observan



grados variables de edema, necrosis y acúmulos neutrófilos, células plasmáticas y a veces células gigantes. El hallazgo más relevante es la presencia de hifas son comúnmente anchas, entre 12 a 20 μm , escasamente septadas y ramificadas al azar, algunas veces están muy deformadas y las paredes varían de grosor (figura 25).

Figura 25. Tinción de Gomori-Grocott de hifas gruesas tabicadas con ramificaciones de *Mucor* a 100x (A Skiada, 2018).

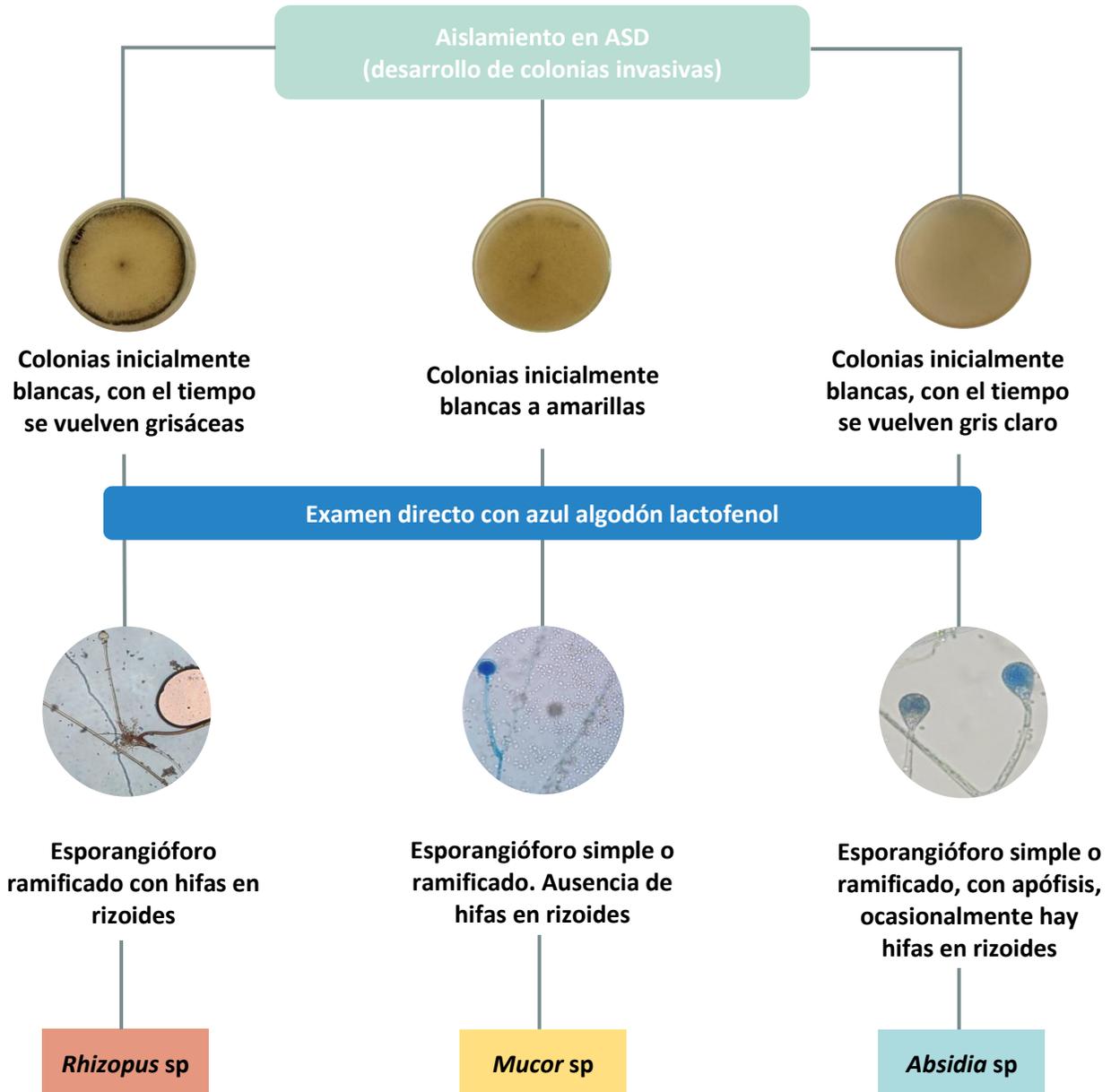
▶ OTRAS PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN

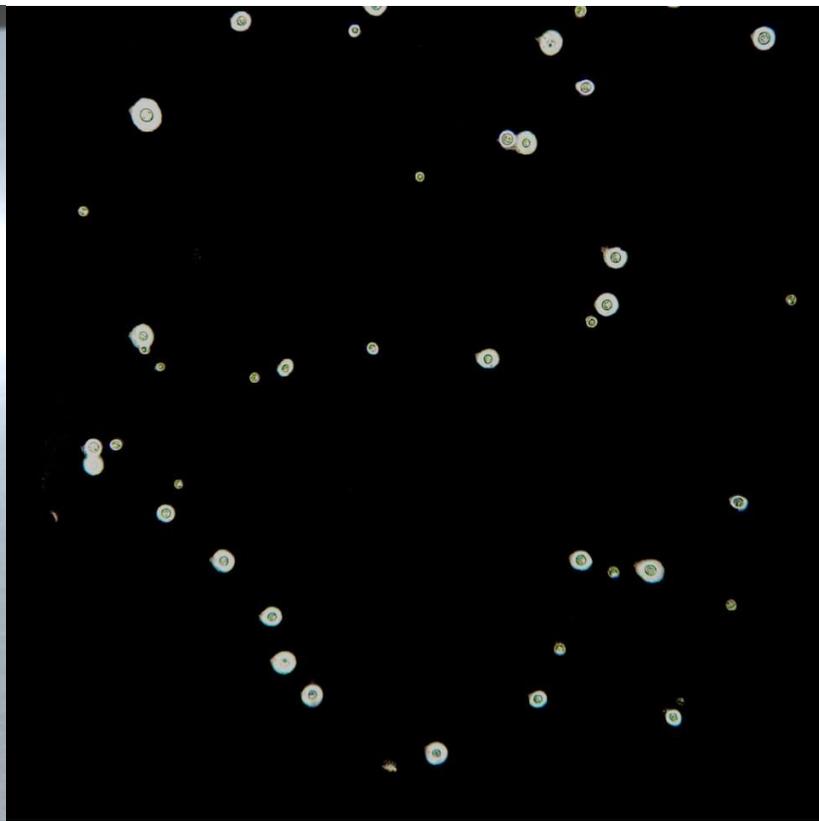
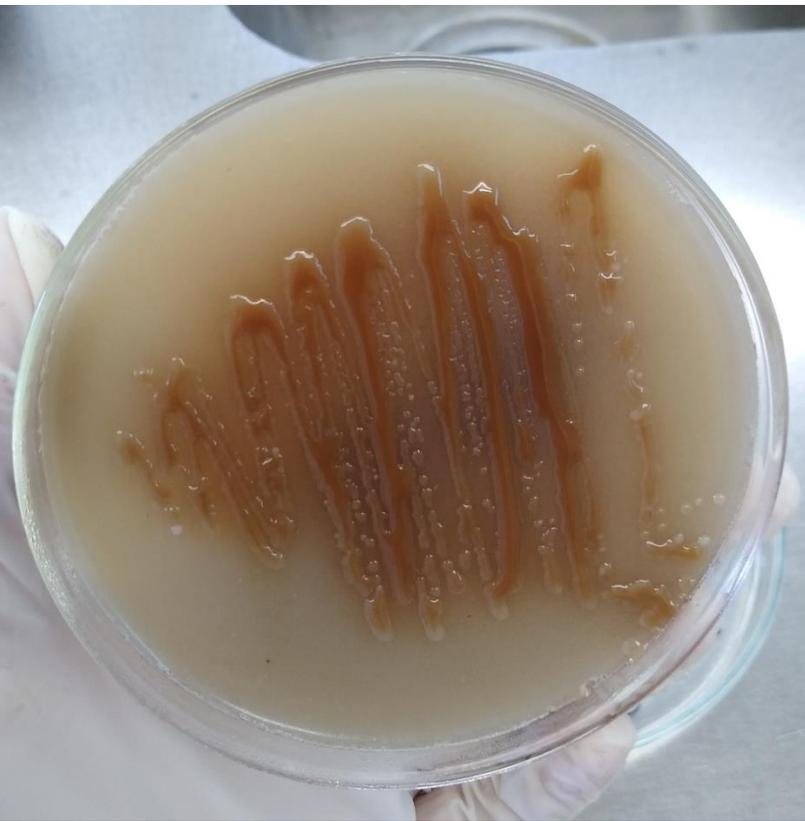
PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa): Los estudios de investigación han demostrado la viabilidad de este método molecular, donde la secuenciación del ADN ribosómico 18S de *Mucorales* permite la identificación del género, por lo que ofrece una alternativa prometedora para establecer el diagnóstico de mucormicosis cuando los cultivos son negativos (figura 26).



Figura 26. Kit múltiple *Mucor* Genius® PCR en tiempo real para la detección de las especies de *Mucorales* más prevalentes a partir de muestras de lavado bronqueoalveolar (BAL) o de biopsia. (Hammond, 2011).

Resumen de la identificación de los principales agentes causales de la mucormicosis.





Criptococosis

Introducción

La criptococosis es una micosis oportunista que se presenta en forma aguda, subaguda o crónica, producida principalmente por los hongos levaduriformes y encapsulados: *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*.

Las especies patógenas *Cryptococcus neoformans* y *C. gattii* representan diferentes determinantes antigénicos, por lo que se han subtipificado en cuatro serotipos dominantes: serotipos A (*C. neoformans* var. *grubii*), B y C (*C. neoformans* var. *gattii*) y D (*C. neoformans* var. *neoformans*) (Martínez, 2012).

Epidemiología

Cryptococcus neoformans tiene una amplia distribución mundial, mientras que *C. gattii* aparentemente tiene hábitats más restringidos; sin embargo, los casos de criptococosis son reportados en todo el mundo. No hay predilección por algún grupo etario, racial u ocupacional y en general, existe predominio en el sexo masculino. En realidad, un factor importante para la adquisición de la micosis es la presencia de inmunocompromiso en el paciente.

C. neoformans se encuentra asociado a la materia fecal de diferentes aves principalmente aquellas pertenecientes al orden columbiformes, aunque también ha sido aislado de frutas y vegetales. Por su parte, *C. gattii* ha sido aislado de la naturaleza, a partir de materiales vegetales de árboles de *Eucalyptus spp*, *Moquilea Tomentosa*, *Terminalia cattapa* en diferentes países de América y Oceanía (Martínez, 2012).

Clínica

Las levaduras inhaladas, desecadas y de menor tamaño que las observadas en líquido cefalorraquídeo (LCR), llegan a los espacios alveolares y el desarrollo de la infección-enfermedad dependerá de la eficacia fagocítica de los macrófagos, así como de la respuesta inmune celular del huésped. Las formas clínicas pueden ser (Pemán J, 2007):

- ▶ **Pulmonar:** Suele ser asintomática, inespecífica o semejando una tuberculosis aguda con estrés respiratorio.
- ▶ **Sistema Nervioso Central (SNC):** Se presenta en forma de meningitis crónica, meningoencefalitis o de granuloma criptocóccico cerebral.
- ▶ **Mucocutánea:** Corresponde a metástasis de la forma diseminada, observándose nódulos subcutáneos en cara y nuca en pacientes VIH positivos o con sida.

Diagnóstico de laboratorio

▶ EXAMEN DIRECTO

El LCR o la orina se centrifugan y del sedimento se colocan 50 μ L en el portaobjetos; en seguida se agrega una gota de tinta china para poner de manifiesto a través del microscopio la presencia de la cápsula sobre un fondo negro y dentro de la capsula el cuerpo redondo de la levadura. El esputo puede ser tratado con NaOH al 10% para hacer menos denso el espécimen, hacer un examen directo con tinta china y observar las levaduras capsuladas características (figura 27 y 28). Es importante mencionar que en pacientes severamente inmunosuprimidos la cápsula puede llegar a observarse más pequeña, o en ocasiones puede no observarse.



Figura 27. Levaduras redondas unigemantes con cápsula de *Cryptococcus neoformans*. Tinta china a 100x (izquierda) y 40x (derecha).

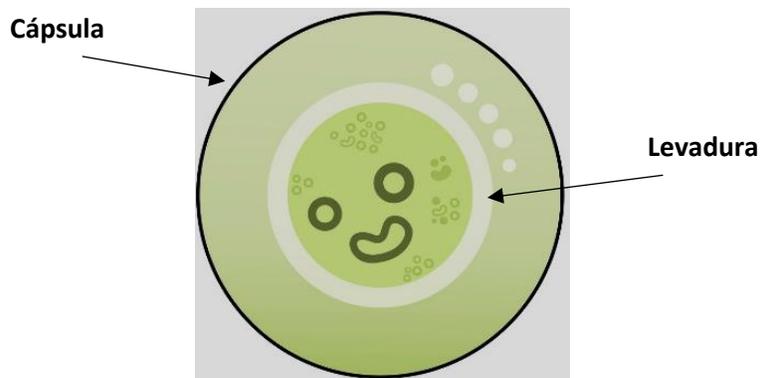


Figura 28. Esquema que representa las levaduras redondas capsuladas de *Cryptococcus* sp

► TINCIONES

Se utilizan las tinciones de ácido peryódico de Schiff (PAS) o Gram, con las cuales las levaduras se observan rosadas o rojas, rodeadas de una cápsula que capta muy poco el colorante (figura 29).

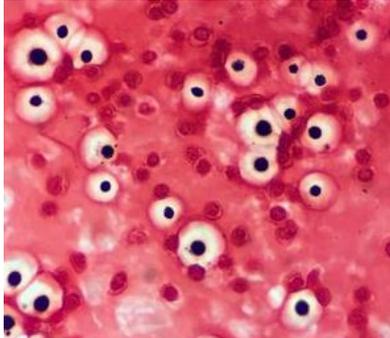


Figura 29. Tinción de Gram de muestra de esputo. *Cryptococcus neoformans*, 40x (Salazar, 2020).

► CULTIVOS

Se emplean medios de agar Sabouraud Dextrosa sin cicloheximida que se incubando a 30°C para observar el desarrollo de colonias mucoides brillantes y escurrientes de color blanco-amarillo, poco elevadas y con bordes continuos (figura 30).



Figura 30. Desarrollo de *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* en agar Sabouraud (Casillas, 2012).

En el caso de muestras contaminadas: esputo, materia fecal y exudados, se recomienda efectuar la siembra en el medio de agar Staib-niger, en el cual se pueden desarrollar las colonias de *Cryptococcus neoformans* y *C. gattii* (figura 31).

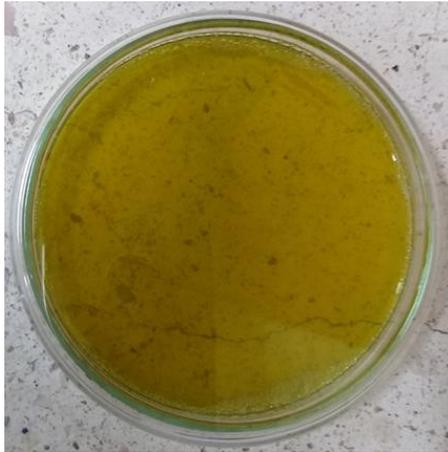
Cryptococcus neoformans presenta colonias cafés por la actividad de la enzima fenol oxidasa y producción de pigmentos melánicos.



Cryptococcus gattii carece de la enzima fenol oxidasa por lo que las colonias de mantienen blancas. Llega a tornar este medio ligeramente verde.

Figura 31. Medio de Staib-niger

La prueba en agar **canavanina-glicina-azul de bromotimol** se fundamenta en la particularidad que presenta la L-canavanina que actúa como una droga, inhibiendo el crecimiento de *Cryptococcus neoformans* (figura 32a), mientras que *Cryptococcus gattii* (figura 32b), es resistente a la L-canavanina, el cual es degradado por las cepas de esta variedad, liberando amonio como compuesto final. El amonio en el medio eleva el pH del mismo, que pasa de 5.8 a 7 o más, virando el color del medio de amarillo verdoso a un azul de cobalto, por la presencia de azul de bromotimol.



a. *Cryptococcus neoformans*
(no hay viraje del medio)



b. Prueba positiva para *Cryptococcus gattii* (viraje del medio de amarillo a azul cobalto)

Figura 32. Medio de Canavanina glicina azul de bromotimol

► HISTOPATOLOGÍA

Es muy recomendable dividir el material de biopsia en dos partes: una para el cultivo micológico y la otra para ser procesada en cortes histológicos para teñirla con ácido peryódico de Schiff (PAS) (figura 34), Gomori-Grocott o Mucicarmín de Mayer (figura 33).

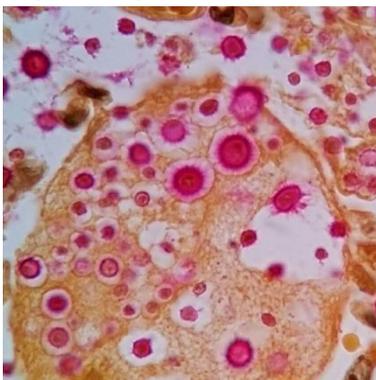


Figura 33. *Cryptococcus neoformans* en tejido, tinción de Mucicarmín de Mayer. Inoculación en ratón (Godoy, 2020)

La infección se acompaña de un respuesta inflamatoria mínima; si la infección es temprana se encuentran lesiones mucilaginosas, debido al gran conglomerado de cápsulas, pero si la infección es crónica, las lesiones cambian a granulomatosas y contiene principalmente linfocitos y células epiteliales. La necrosis caseosa, la cavitación y la calcificación se observan raramente.

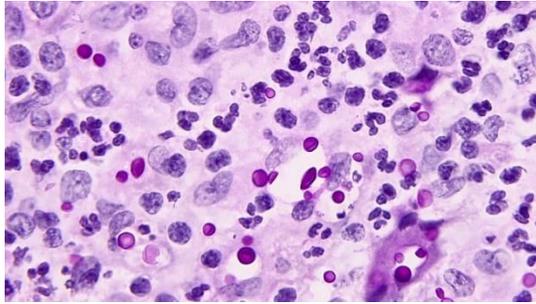


Figura 34. Tinción con ácido peryódico de Schiff (PAS) de levaduras encapsuladas de *Cryptococcus neoformans* a 100x (Salazar, 2020).

► **OTRAS PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN**

Producción de ureasa: Se utiliza el medio de agar urea de Christensen, en el cual se inocula una asada de la levadura en estudio. Los medios son incubados a 37 °C durante seis horas o a temperatura ambiente por 3 días. Si el microorganismo posee la enzima ureasa el medio de cultivo se alcaliniza y vira de color amarillo-naranja (figura 35a) a rosa intenso (figura 35b) por el indicador es el rojo fenol. Las levaduras del género *Cryptococcus* son positivas a esta prueba.

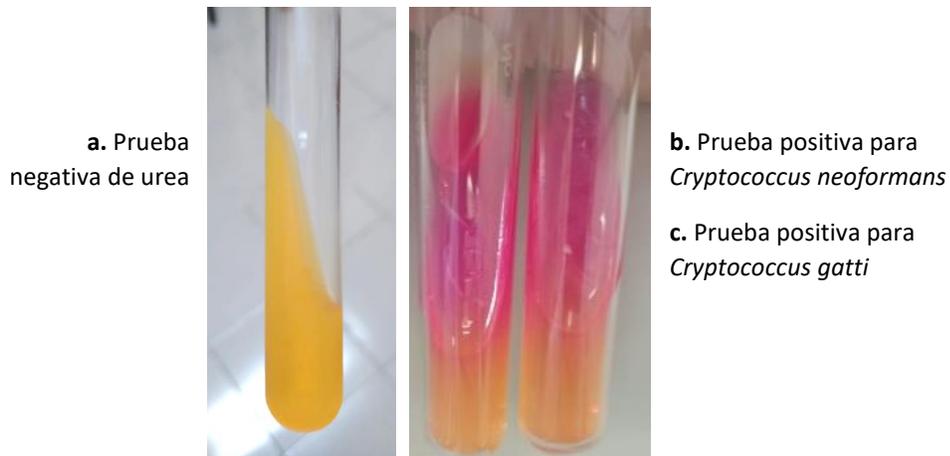


Figura 35. Levaduras del género *Cryptococcus* en Medio de Urea

Auxonograma: Se utiliza el auxonograma, asimilación de carbohidratos, pues la asimilación del inositol es una característica del género *Cryptococcus* (figura 36).

Prueba 36. Auxonograma positivo para *Cryptococcus neoformans* (Salazar, 2020).



Aglutinación: Es muy, se basa en la determinación del antígeno criptocócico en la cápsula (glucorono-xilomanano o GXM). Puede efectuarse en suero, LCR, orina y líquido prostático.

Se hace por aglutinación directa de partículas de látex revestidas por anticuerpos anticápsula de *Cryptococcus*, utilizada para la identificación de los serotipos (A, D, C y D).

Se produce la reacción de aglutinación, la cual tiene alta especificidad y la sensibilidad varía entre 90 y 95% (figura 37). Aproximadamente el 5% de las pruebas dan resultados “falsos positivos” y esto se tribuye sobre todo a la presencia del factor reumatoide. Uno de los kits comerciales más utilizado es el Pastorex®-Crypto Plus.

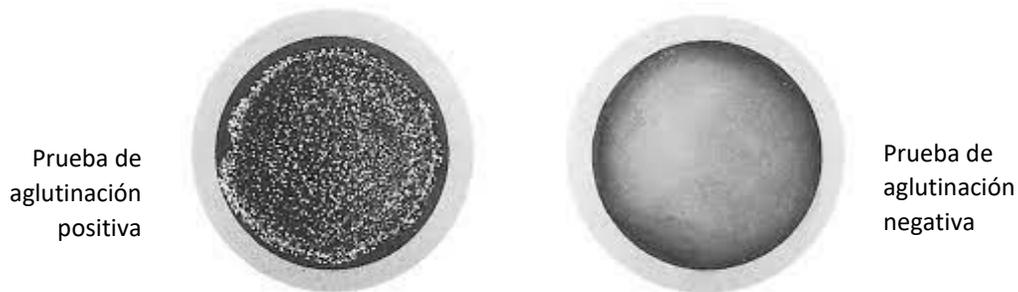
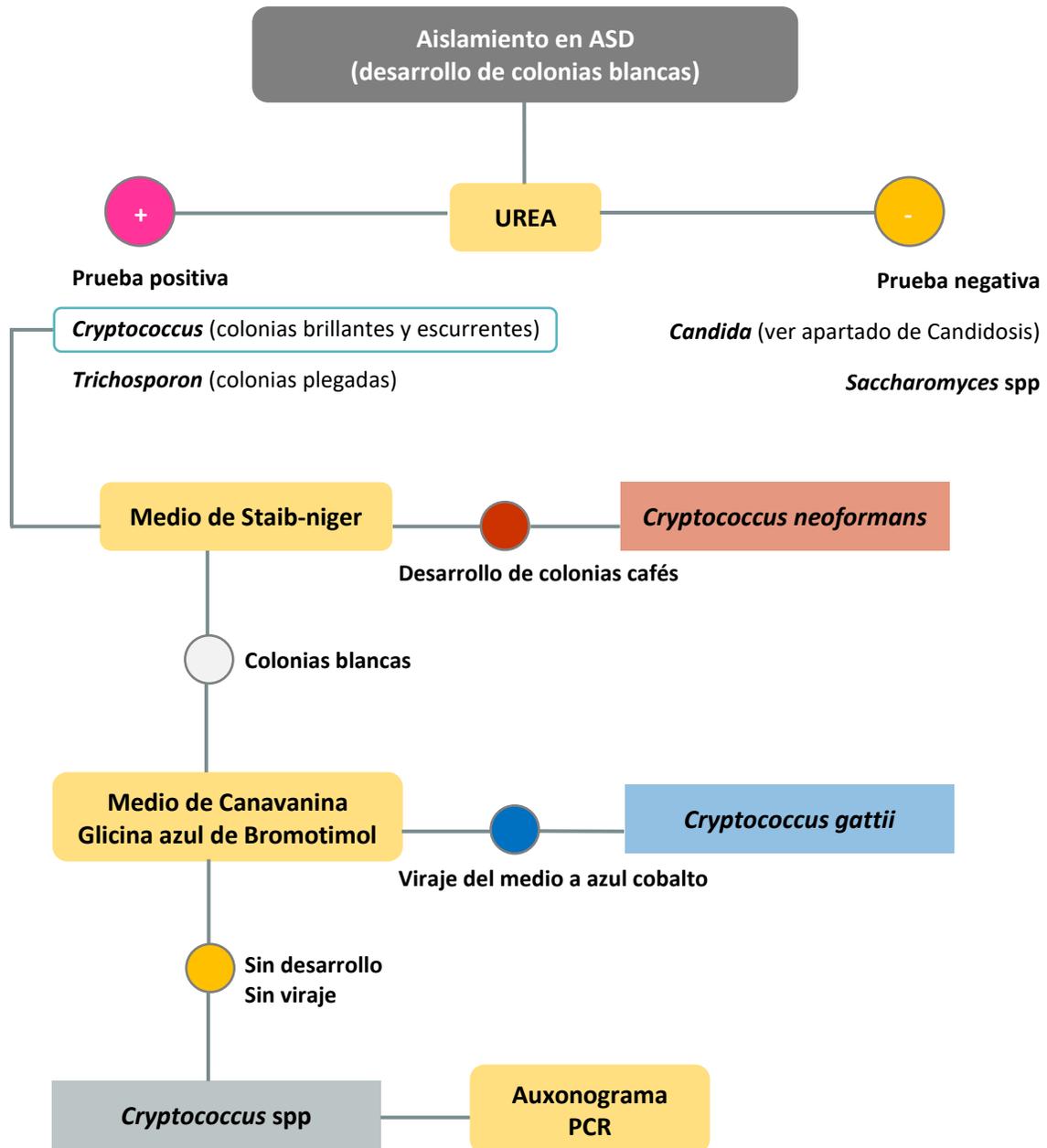
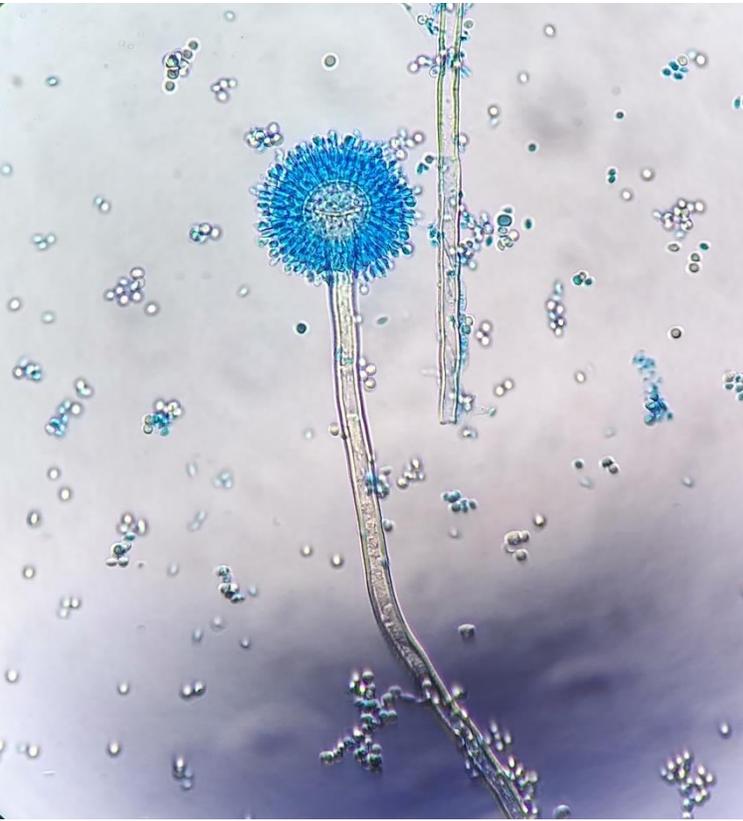


Figura 37. Aglutinación directa de partículas de látex revestidas por anticuerpos anticápsula de *Cryptococcus*.

Resumen de la identificación de *Cryptococcus* en el laboratorio.





Aspergilosis

Introducción

La aspergilosis es una micosis oportunista causada por hongos filamentosos del género *Aspergillus*. La enfermedad no presenta predominio por ningún sexo, raza o grupo de edad.

Existen aproximadamente 600 especies de *Aspergillus* en la naturaleza, no obstante, para el hombre solo unas cuantas son patógenas, debido a que la mayoría de estos hongos son termosensibles, siendo: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus terreus*, las especies responsables del 80 al 90% de los casos de aspergilosis.

La identificación de *Aspergillus* hasta el nivel de especie es crucial en el laboratorio, ya que las susceptibilidades variables a los antimicóticos influyen en la selección del fármaco que se utilizará para el manejo de un caso clínico.

Los hongos del género *Aspergillus* son filamentosos hialinos y su identificación se basa en sus características morfológicas como: color de la colonia, tamaño y forma de las cabezas conidiales (forma de la vesícula, presencia o ausencia de métulas, forma de las fiálides, color y aspecto de los conidios) y morfología de los conidióforos. (Martínez, 2012).

Epidemiología

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica ha surgido como un factor de riesgo significativo para la aspergilosis. El riesgo está asociado con el deterioro de la actividad ciliar, la inmunosupresión debida al uso de esteroides y un amplio espectro de antibióticos principalmente durante la hospitalización.

El número anual estimado de casos de aspergilosis en México es 4,510 y al menos 58% de estos casos no sobrevive pues no recibe el tratamiento antifúngico a tiempo. (Cruz, 2014).

Clínica

La aspergilosis puede presentarse como algunos de cuadros clínicos, siendo los más graves (Bonifaz, 2020):

- ▶ **Aspergilomas:** Producidos por la colonización de cavidades previas (tuberculosis, sarcoidosis, histoplasmosis o bronquiectasias) por *Aspergillus*. Pueden ser asintomáticos o cursar con hemoptisis o invasión tisular. El diagnóstico radiológico siempre ha de acompañarse de niveles altos de IgG frente a *Aspergillus* y de la presencia generalmente intermitente de tinciones y cultivos positivos de las secreciones respiratorias. En ocasiones los aspergilomas pueden localizarse en los senos maxilares y dar lugar a cefalea y rinorrea.

- ▶ **Aspergilosis pulmonar invasiva:** Los factores de riesgo más importantes son la neutropenia prolongada, el tratamiento con esteroides, la enfermedad por citomegalovirus y el sida. Las manifestaciones clínicas comienzan con la aparición de fiebre, seguida de síntomas respiratorios, como dolor torácico, tos, taquipnea o hemoptisis.
- ▶ **Aspergilosis pulmonar necrosante crónica:** Suele afectar a individuos con enfermedades pulmonares previas, tiene un curso lento de meses o años, con aparición de infiltrados en los lóbulos superiores, fibrosis y cavitaciones. La persona desarrolla anticuerpos frente a *Aspergillus* detectables en el laboratorio. Pueden producirse neumotórax, aspergilomas o incluso aspergilosis pulmonar invasiva.

Diagnóstico de laboratorio

▶ EXAMEN DIRECTO

Las muestras clínicas son examinadas agregando KOH al 15% y deberán observarse hifas largas, ramificadas, hialinas y septadas de aproximadamente 3 µm de diámetro. La demostración de hifas en el espécimen clínico y el aislamiento repetido de la misma especie de *Aspergillus* es crítico para apoyar el diagnóstico de aspergilosis (figura 38).

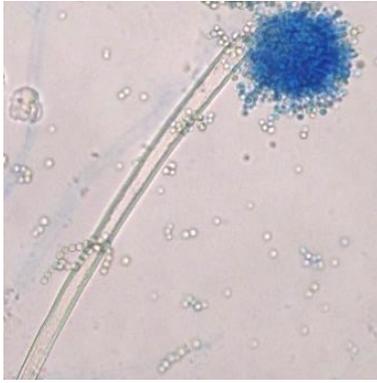


Figura 38. Hifas septadas ramificadas en muestra de esputo. KOH 15%, 40x (Zafar, 2017).

▶ TINCIONES

Los exámenes directos de cultivos se tiñen con azul de lactofenol, para examinar las características microscópicas de las distintas especies de *Aspergillus* observándose en el microscopio con el objetivo de 40X. El fenol del colorante inactiva al hongo, el ácido láctico es un agente aclarante que preserva las estructuras, la glicerina previene la desecación de la preparación y el azul de algodón colorea la quitina y celulosa del agente.

A continuación, se muestran las micromorfologías de las principales especies de *Aspergillus* causantes de micosis (figura 39 y 40):



Aspergillus flavus, 40X



Aspergillus terreus, 40X



Aspergillus niger, 40X



Aspergillus fumigatus, 40X

Figura 39. Micromorfologías de las principales especies de *Aspergillus* causantes de micosis.

Conidióforo tipo *Aspergillus*.

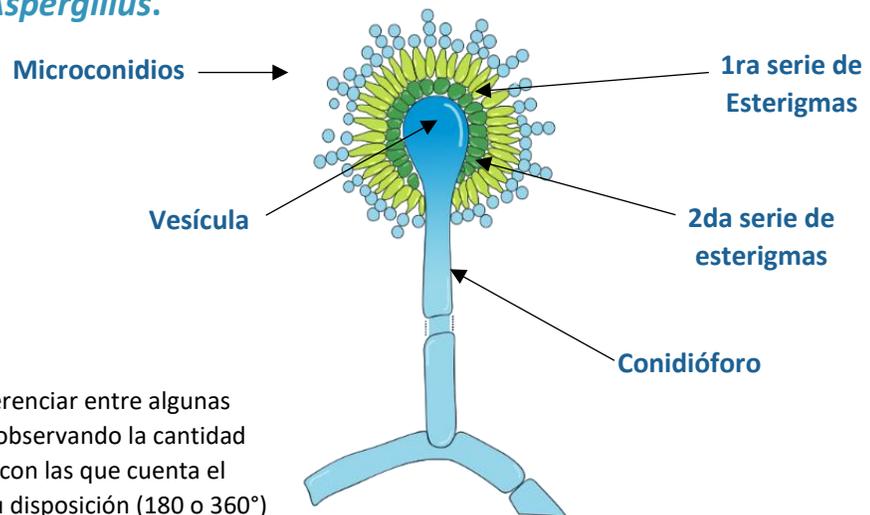


Figura 40. Podemos diferenciar entre algunas especies de *Aspergillus* observando la cantidad de series de esterigmas con las que cuenta el conidióforo, así como su disposición (180 o 360°)

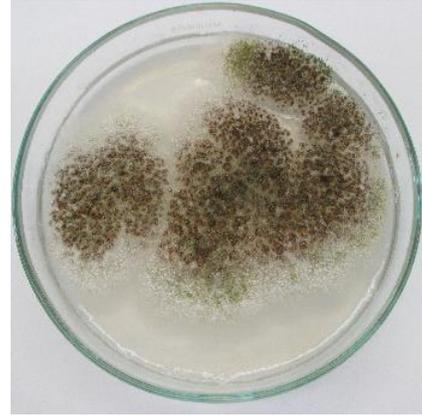
► CULTIVOS

Las muestras clínicas se siembran en agar dextrosa Sabouraud sin cicloheximida o en agar Czapek-Dox, siendo este último el más utilizado, pues las colonias se desarrollan a 25 y 37°C en cinco a siete días. Como los hongos del género *Aspergillus* se aíslan con facilidad del ambiente, se debe ser cuidadoso al emitir un diagnóstico de aspergilosis, por lo que se recomienda realizar el aislamiento en tres ocasiones diferentes y con cultivos puros. En la siguiente tabla se muestran las características macro y microscópicas de las principales especies de *Aspergillus* (Russo, 2020):

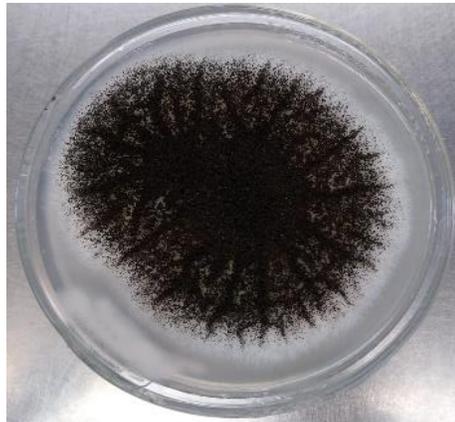
Características morfológicas de las principales especies de <i>Aspergillus</i>			
Macroscópicas		Microscópicas	
Color	Textura	Conidióforos	Conidios
<i>Aspergillus fumigatus</i>			
El color inicialmente es blanco virando en aproximadamente siete días a un verde azulado por la producción de conidias. El reverso de la colonia es incoloro.	La textura de las colonias es aterciopelada, afelpada, vellosa, con margen blanquecino o beige.	Presentan conidióforo corto, liso de hasta 300 µm de longitud y de 5 a 8 µm de diámetro, vesícula de 20 a 30 µm de diámetro con fiálides (6 a 8 µm de largo), uniseriada, ocupando 2/3 de la vesícula.	Los conidios en cadenas forman una compacta columna sobre la vesícula, son de color verde, finamente rugosos, globosos y de 2 a 3 µm de diámetro.
<i>Aspergillus flavus</i>			
Las colonias son de color verde-amarillo, ocasionalmente algodonosas en el centro o margen de la colonia. El reverso de la colonia es incoloro.	La textura de las colonias es pulverulenta con surcos radiales, rugosas o granulosas.	Los conidióforos son de pared gruesa, hialinos, rugosos, de ≥ 1 mm de longitud y de 10 a 20 µm de diámetro. Las vesículas son globosas de 10 a 65 µm de diámetro produciendo fiálides uniobiserialadas alrededor de la vesícula.	Los conidios son de color verde amarillentos, lisos o finamente rugosos, esféricos con un diámetro de 3.5 a 4.5 µm de diámetro.
<i>Aspergillus niger</i>			
El color de las colonias al principio es blanco, luego es negro. El reverso de la colonia es amarillo o crema.	La textura de las colonias es granular.	Los conidióforos son de pared lisa, hialina y miden de 1,5 a 3 mm de largo y de 15 a 20 µm de diámetro. La vesícula es globosa con 50 a 100 µm de diámetro y produce fiálides alrededor.	Los conidios son globosos y rugosos con 4 a 5 µm de diámetro, de color marrón a negro.
<i>Aspergillus terreus</i>			
Las colonias son de color café canela. El reverso de la colonia es color blanco a marrón.	La textura de las colonias es aterciopelada o pulverulenta.	Los conidióforos miden hasta 250 µm de longitud, las fiálides son biserialadas y ocupan 2/3 partes de la vesícula.	Los conidios se encuentran en cadenas, formando una compacta columna sobre la vesícula, son hialinos, lisos de 2 a 3 µm.



Aspergillus fumigatus. Desarrollo de colonias polvosas verde militar.



Aspergillus terreus. Desarrollo de colonias granulares verde limón.



Aspergillus niger. Desarrollo de colonias granularres negras con halo blanco correspondiente al micelio vegetativo.

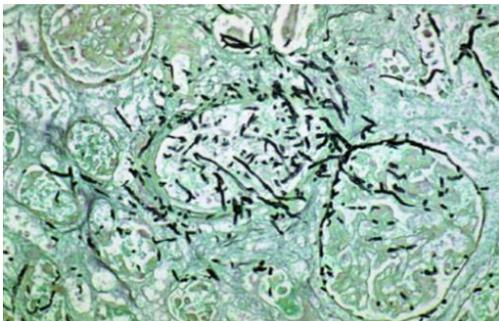


Aspergillus terreus. Colonias polvosas beige a café claro.

Figura 41. Desarrollo de colonias de distintas especies de *Aspergillus* en medio Czapek Dox.

► HISTOPATOLOGÍA

La pieza de biopsia obtenida se debe dividir en dos fragmentos: una parte se emplea para realizar un cultivo en los medios mencionados y la otra se fija para cortes histopatológicos teñidos con la tinción de ácido peryódico de Schiff (PAS) o la tinción de Gomori-Grocott (figura 42), donde se observan fácilmente al microscopio con el objetivo de 100X los hongos como hifas septadas de 2.5 a 4.5 μm de diámetro, ramificadas dicotómicamente en ángulos igual o menor a 45°.



Figuro 42. Tinción de Gomori-Grocott de hifas de *Aspergillus* en el interior de glomérulos e invadiendo el tejido cortical adyacente a 100x (Pemán J, 2007).

► OTRAS PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN

ELISA: La prueba comercial Platelia *Aspergillus*[®] identifica el antígeno galactomanano en suero, siendo un método diagnóstico de gran utilidad en los pacientes (figura 43).



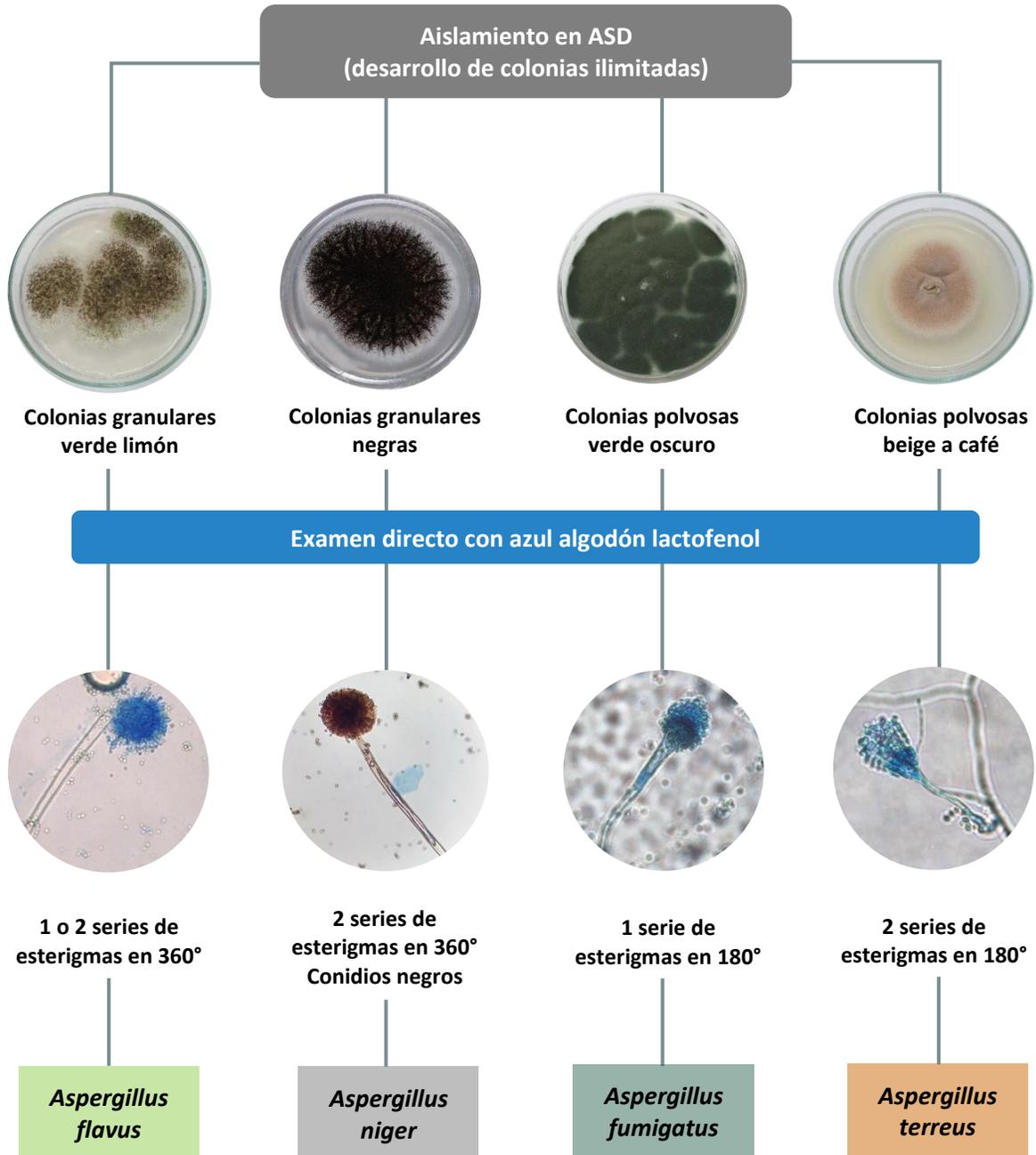
Figura 43. Kit comercial de Platelia *Aspergillus*[®].

PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa): La detección de ADN fúngico mediante PCR es un método novedoso no basado en cultivos que puede permitir un mejor diagnóstico de la aspergilosis (figura 44).



Figura 44. Kit múltiple Asper Genius[®] es un ensayo de PCR en tiempo real que permite un diagnóstico rápido de las infecciones por *Aspergillus* e identifica simultáneamente la resistencia a azoles a partir de muestras del tracto respiratorio inferior (Russo, 2020).

Resumen de la identificación de *Aspergillus* en el laboratorio.





ANEXOS

Medios de cultivo y reactivos para Micología

Preparación de reactivos

► KOH al 15%

- Hidróxido de potasio..... 15 g
- Agua destilada..... 100 mL

Preparación:

Mezclar para disolver totalmente el KOH.

Guardar a temperatura ambiente en frasco de color ámbar.

► AZUL DE LACTOFENOL

Solución A:

- Fenol (cristales)..... 20 g
- Ácido láctico..... 20 g
- Glicerina..... 40 mL

Solución B:

- Azul de algodón..... 0.05 g
- Agua destilada..... 20 mL

Preparación:

Mezclar las soluciones A y B.

Conservar a temperatura ambiente hasta por 6 meses.

► TINCIÓN DE GRAM

Solución A. Solución de cristal violeta:

- Cristal violeta..... 4 g
- Etanol..... 20 mL

Preparación:

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

Solución B

- Oxalato de amonio..... 0.8 g
- Agua destilada..... 80 mL

Preparación:

Disolver el oxalato de amonio en el agua destilada.

Mezclar una parte de la solución A con cuatro partes de la solución B.

Solución de yodo (Iugol):

- Yodo.....1 g
- Yoduro de potasio..... 2 g

Preparación:

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

Contracolorante (colorante de fondo):

- Safranina O al 2.5% en alcohol al 95%10 mL
- Agua destilada..... 100 mL

Preparación:

Realizar un frotis y fijarlo con calor o metanol.

Agregar el cristal violeta. Dejar un minuto. Lavar con agua.

Aplicar el lugol. Dejar un minuto. Lavar con agua.

Decolorar con etanol al 95% por 30 segundos.

Agregar safranina O. Dejar por 10 segundos. Lavar con agua y dejar secar.

► TINCIÓN DE ÁCIDO PERYÓDICO DE SCHIFF (PAS)**Solución de hidrosulfito de sodio:**

- Ácido tartárico..... 0.5 g
- Hidrosulfito de sodio..... 1 g
- Agua destilada..... 100 mL

Preparación:

Mezclar y almacenar a temperatura ambiente en un recipiente cerrado.

Reactivo de Schiff:

- Fucsina básica..... 0.1 g
- Etanol al 95%..... 5 mL
- Agua destilada..... 95 mL

Preparación:

Mezclar y almacenar a temperatura ambiente en un recipiente cerrado.

Verde brillante:

- Verde brillante..... 1 g
- Ácido acético glacial..... 0.25 mL
- Agua destilada..... 100 mL

Preparación:

Mezclar y almacenar a temperatura ambiente en un recipiente cerrado.

Coloración del frotis:

Realizar un frotis y fijarlo con calor.

Sumergir la preparación en etanol al 95% por 1 minuto.

Sumergir la preparación en ácido peryódico y retirarla rápidamente.

Sumergir la preparación en fucsina básica por 2 minutos y enjuagar.
Contrateñir con verde brillante por 5 segundos.
Cubrir la preparación con etanol al 95% por 1 minuto.
Aclarar con dos pasos rápidos por xileno. Dejar secar y observar.

► TINCIÓN DE GOMORI-GROCOTT (METENAMINA DE PLATA)

Ácido crómico al 10%:

- Ácido crómico..... 10 g
- Agua destilada..... 100 mL

Preparación:

Mezclar y almacenar a temperatura ambiente en un recipiente cerrado.

Metenamina al 3%:

- Hexametilantretamina..... 3 g
- Agua destilada..... 100 mL

Preparación:

Mezclar y almacenar a temperatura ambiente en un recipiente cerrado.

Nitrato de plata al 5%:

- Nitrato de plata..... 5 g
- Agua destilada..... 100 mL

Preparación:

Mezclar y almacenar a temperatura ambiente en un recipiente cerrado.

Borato de sodio al 5%:

- Borato de sodio..... 5 g
- Agua destilada..... 100 mL

Preparación:

Mezclar y almacenar a temperatura ambiente en un recipiente cerrado.

Solución de metenamina de plata:

- Metenamina de plata al 3%..... 20 mL
- Nitrato de plata al 5%..... 1 mL
- Borato de sodio al 5%..... 1.5 mL
- Agua destilada..... 17 mL

Preparación:

Mezclar y almacenar a temperatura ambiente en un recipiente cerrado.

Bisulfito de sodio al 1%:

- Bisulfito de sodio..... 1 g

- Agua destilada..... 100 mL

Preparación:

Mezclar y almacenar a temperatura ambiente en un recipiente cerrado.

Cloruro de oro al 0.2%:

- Cloruro de oro..... 1 g

- Agua destilada..... 500 mL

Preparación:

Mezclar y almacenar a temperatura ambiente en un recipiente cerrado.

Tiosulfito de sodio al 2%:

- Tiosulfito de sodio..... 2 g

- Agua destilada..... 100 mL

Preparación:

Mezclar y almacenar a temperatura ambiente en un recipiente cerrado.

Verde brillante al 2%:

- Verde brillante..... 2 g

- Ácido acético glacial..... 0.2 mL

- Agua destilada..... 100 mL

Preparación:

Mezclar y almacenar a temperatura ambiente en un recipiente cerrado.

Preparación:

Realizar un frotis y fijarlo con metanol. Secar al aire.

Cubrir con el ácido crómico al 10% por 10 minutos. Lavar con agua destilada.

Cubrir con el bisulfito de sodio al 1% por 1 minuto. Lavar con agua destilada.

Color el frotis en una caja de Coplin con la solución de metenamina de plata y calentar con el microondas por 45 segundos. Lavar con agua destilada.

Cubrir con cloruro de oro por 10 segundos. Lavar con agua destilada.

Cubrir con tiosulfito de sodio por 1 minuto. Lavar con agua destilada.

Cubrir con verde brillante al 2% por 3 minutos. Dejar secar y observar.

Preparación de medios de cultivo

► CALDO SABOURAUD DEXTROSA

Pesar:

- Digerido enzimático de caseína..... 10 g
- Dextrosa..... 20 g
- Agua destilada..... 1000 mL

Preparación:

Suspender 30 g de medio deshidratado en un litro de agua destilada.

Calentar agitando frecuentemente y dejar hervir durante 1 minuto para disolver completamente los ingredientes. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Distribuir y enfriar a temperatura ambiente antes de su utilización.

Dispensar alícuotas de 5 mL en tubos de vidrio estéril con tapa de rosca.

► AGAR MICOSEL

Pesar:

- Digerido papaico de harina de soja..... 10 g
- Agar..... 15 g
- Cloranfenicol..... 0.05 g
- Dextrosa..... 10 g
- Cicloheximida..... 0.4 g
- Agua destilada..... 1000 mL

Preparación:

Disolver los ingredientes en el agua destilada.

Esterilizar a 121 °C por 15 minutos.

Verter en tubos o placas. Dejar solidificar.

► AGAR PAPA DEXTROSA

Pesar:

- Papa..... 200 g
- Dextrosa..... 10 g
- Agar..... 20 g
- Agua destilada..... 1000 mL

Preparación:

Pelar y cortar la papa en trozos pequeños.

Disolver la dextrosa en agua y agregar los demás ingredientes.

Hervir 30 minutos y filtrar con gasa.
Completar el volumen.
Esterilizar a 121 °C por 15 minutos.
Repartir en tubos o placas. Dejar solidificar.

Prueba de esterilidad: dejar a temperatura ambiente por 24 hrs. Verificar que no haya desarrollo de contaminantes.

Validación del medio: inocular una cepa conocida de *Aspergillus niger*, incubar a 28°C por 3 días para verificar la promoción de crecimiento.

► AGAR SABOURAUD DEXTROSA

Pesar:

- Peptona..... 10 g
- Glucosa..... 20 g
- Agar..... 20 g
- Agua destilada..... 1000 mL

Preparación:

Disolver los ingredientes en el agua destilada.
Esterilizar a 121 °C por 15 minutos.
Verter en tubos o placas. Dejar solidificar.

Prueba de esterilidad: dejar a temperatura ambiente por 24 hrs. Verificar que no haya desarrollo de contaminantes.

Validación del medio: inocular una cepa conocida de *Aspergillus niger*, incubar a 28°C por 3 días para verificar la promoción de crecimiento.

► CHROMAGAR CANDIDA

Pesar:

- Base de polvo* 47.7g
- Agua destilada..... 1000 mL
- pH final 5.9

* proveedor BD. Ref. 212961

Preparación:

Disolver el polvo en el agua destilada.
Homogenizar por completo.
Calentar hasta la ebullición por 1 minuto agitando o removiendo regularmente.

Este medio de cultivo no se esteriliza en autoclave.

Verter el medio en placas de Petri estériles. Dejar solidificar.

Validación del medio: inocular una cepa conocida o ATCC de *Candida albicans*, incubar a 28°C por 2 días para verificar el desarrollo de colonias verde claro.

► **BIGGY AGAR**

Pesar:

- Base de polvo* 45 g *MCD-LAB No. cat. 700
- Agua destilada..... 1000 mL

Preparación:

Disolver los ingredientes en el agua destilada.
Remover hasta que el agar haya espesado bien.
Calentar hasta la ebullición (100 °C) agitando o removiendo regularmente.

Este medio de cultivo no se esteriliza en autoclave.

Verter el medio en placas de Petri estériles. Dejar solidificar.

Validación del medio: inocular una cepa conocida o ATCC de *Candida albicans*, incubar a 28°C por 2 días para verificar el desarrollo de colonias café metálico.

► **Agar Pagano Levin**

Pesar:

- Peptona.....10.0 g
- Extracto de levadura.....1 g
- Dextrosa.....40 g
- Agar.....15 g
- Cloruro de tetrazolio*0.1 g
- Cloranfenicol*0.5 g
- Agua destilada.....1000 mL

pH final de 6.0

* se agregan hasta después de la esterilización en autoclave

Preparación:

Disolver los ingredientes en el agua destilada, excepto el cloruro de tetrazolio y el cloranfenicol.
Homogenizar por completo. Esterilizar a 121 °C por 15 minutos. Enfriar hasta los 45°C.
Añadir asepticamente el cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio y el cloranfenicol. Mezclar bien.
Verter el medio en placas de Petri estériles. Dejar solidificar.

► AGAR TABACO

Pesar:

- Hojas de tabaco..... 50 g
- Agar..... 20 g
- Agua destilada..... 1000 mL

Preparación:

Hervir las hojas en el agua destilada durante 30 minutos, enfriar y filtrar.

El pH se ajusta a 6 y el volumen se reajusta a 1 litro.

Agregar 20 g de agar-agar antes de esterilizar la mezcla en autoclave a 121°C durante 15 min.

El medio se deja enfriar a 45-55°C.

Dispensar en placas de Petri estériles. Dejar solidificar.

Validación del medio: inocular una cepa conocida o ATCC de *Candida dubliniensis*, incubar a 28°C por 2 hasta 10 días para verificar la producción de clamidoconidios.

► AGAR CZAPEK-DOX

Pesar:

- Sacarosa..... 30 g
- Nitrato de sodio..... 2 g
- Fosfato dipotásico..... 1 g
- Sulfato de magnesio..... 0.5 g
- Cloruro de potasio..... 0.5 g
- Sulfato ferroso..... 10 mg
- Agar..... 15 g
- Agua destilada..... 1000 mL

Preparación:

Disolver por calor todos los ingredientes. Colocar en ebullición por 10 minutos.

Esterilizar a 121 °C por 15 minutos.

Verter en tubos o placas. Dejar solidificar.

Validación del medio: inocular una cepa conocida de *Aspergillus niger*, incubar a 28°C por 3 días para verificar la promoción de crecimiento.

► AGAR STAIB

Pesar:

- Glucosa..... 10 g
- Creatinina..... 0.78 g

- Cloranfenicol.....0.05 g
- Difenilo (disuelto en 10 ml de etanol 95%).... 100 mg
- *Guizotia abyssinica* (Semillas de niger)..... 70 g
- Agar..... 20 g
- Agua destilada..... 1000 mL

Preparación:

Moler las semillas y añadir 350 mL de agua.

Esterilizar en autoclave y filtrar.

Añadir el agua. Añadir el resto de los componentes excepto el difenilo.

Esterilizar a 121 °C 15 minutos. Enfriar a 45 °C.

Añadir el difenilo antes de dispensar el medio en las placas.

Validación del medio: inocular una cepa conocida o ATCC de *Cryptococcus neoformans*, incubar a 28°C por 2 días para verificar el desarrollo de colonias café chocolate.

► **AGAR CANAVANINA-GLICINA-AZUL DE BROMOTIMOL**

Pesar:

Solución A:

- Glicina..... 10 g
- Fosfato monopotásico..... 1 g
- Sulfato de magnesio..... 1 g
- Tiamina-HCl..... 1 mg
- Sulfato de L-canavanina..... 30 mg
- Agua destilada..... 100 mL

Mezclar y almacenar a temperatura ambiente en un recipiente cerrado.

Solución B:

- Azul de bromotimol..... 0.4 g
- NaOH al 0.01 N..... 64 mL
- Agua destilada..... 36 mL

Mezclar y almacenar a temperatura ambiente en un recipiente cerrado.

Preparación:

Mezclar la solución B y esterilizar a 121 °C por 15 minutos.

Enfriar a 50°C y agregar 100 ml de la solución A estéril.

Mezclar muy bien y verter en placas.

Validación del medio:

Control positivo: Inocular una cepa conocida o ATCC de *Cryptococcus gattii* (medio con desarrollo y viraje a azul eléctrico).

Control negativo: Inocular una cepa conocida o ATCC de *Cryptococcus neoformans* (medio sin desarrollo y se mantiene amarillo).

Incubación a 28°C por 2 a 3 días.

► AGAR EXTRACTO DE MALTA

Pesar:

- Extracto de malta..... 20 g
- Peptona..... 1 g
- Dextrosa..... 20 g
- Agar..... 20 g
- Agua destilada..... 100 mL

Preparación:

Mezclar los ingredientes y calentar hasta ebullición (100°C).

Añadir la dextrosa y homogenizar.

Esterilizar a 121° durante 15 minutos.

Distribuir en cajas de Petri o en tubos.

Validación del medio: inocular una cepa conocida de *Mucor* sp o *Rhizopus* sp, incubar a 28°C por 3 días para verificar la promoción de crecimiento.

► AGAR UREA DE CHRISTENSEN

Pesar:

- Tripteína..... 1 g
- Glucosa..... 1 g
- Cloruro de sodio..... 5 g
- Fosfato monopotásico..... 2 g
- Rojo de fenol..... 0.012 g
- Agar..... 15 g
- Solución de urea al 40%..... 50 mL
- Agua destilada..... 1000 mL

Preparación:

Suspender 24 g del polvo en 950 mL de agua destilada.

Dejar reposar 5 minutos. Calentar con agitación frecuente y llevar a ebullición.

Distribuir en recipientes apropiados y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Enfriar a 50°C y agregar la solución de urea al 40% previamente esterilizada por filtración.

Fraccionar en tubos y dejar solidificar el medio en pico de flauta.

Validación del medio:

Control positivo: Inocular una cepa conocida o ATCC de *Cryptococcus* sp (el medio vira a color rosa intenso).

Control negativo: Inocular una cepa conocida de *Candida* sp (el medio conserva color amarillo-naranja).

Incubación a 28°C por 2 a 3 días.

Bibliografía

1. A. Skiada, C. Lass-Floerl, N. Klimko, B. Ibrahim, E. Roilides, G. Petrikkos. (2018). Challenges in the diagnosis and treatment of mucormycosis, *Medical Mycology*, Volume 56, Issue 1, Pages 93–101.
2. Bonifaz A. (2021). *Micología Médica Básica* (4.ª ed.). Editorial McGraw-Hill.
3. Casillas Vega, N. G. (2012). Fenotipificación y genotipificación del complejo *Cryptococcus neoformans* / *Cryptococcus gattii* en aislamientos clínicos del noreste de México. Universidad Autónoma de Nuevo León.
4. Clancy, C. J., & Nguyen, M. H. (2018). Diagnosing Invasive Candidiasis. *Journal of Clinical Microbiology*, 56(5).
5. Corzo-León, D. E., Armstrong-James, D., & Denning, D. W. (2016). Burden of serious fungal infections in Mexico. *Mycoses*, 58, 34-44.
6. Corzo-León, D.E., Luis D Chora-Hernández, Ana P Rodríguez-Zulueta, Thomas J Walsh. Diabetes mellitus as the major risk factor for mucormycosis in Mexico: Epidemiology, diagnosis, and outcomes of reported cases, *Medical Mycology*, Volume 56, Issue 1, January (2018), Pages 29–43,
7. Cruz, Rodrigo. (2014). Guía para el diagnóstico de laboratorio de enfermedad fúngica invasora por hongos filamentosos. *Revista Chilena de Infectología*, 31(2),173-179.
8. Dadwal, S. S., & Kontoyiannis, D. P. (2018). Recent advances in the molecular diagnosis of mucormycosis. *Expert review of molecular diagnostics*, 18(10), 845-854.
9. Guevara M, Urcia F, Casquero J. (2007). Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas. Lima: Ministerio de Salud.
10. Guilarte, C., Pardi, G. (2019). Pruebas para identificar especies de *Candida* en cavidad bucal. *Acta Odontológica Venezolana*, 47(3).

11. Hammond, SP, Bialek, R., Milner, DA, Petschnigg, EM, Baden, LR y Marty, FM (2011). Métodos moleculares para mejorar el diagnóstico e identificación de mucormicosis. *Revista de Microbiología Clínica*, 49 (6), 2151-2153.
12. Lin, C.-Y.; Wang, I.-T.; Chang, C.-C.; Lee, W.-C.; Liu, W.-L.; Huang, Y.-C.; Chang, K.-W.; Huang, H.-Y.; Kao, K.-C.; Dimopoulos, G. Comparison of Clinical Manifestation, Diagnosis, and Outcomes of Invasive Pulmonary Aspergillosis and Pulmonary Mucormycosis. *Microorganisms* (2019), 7, 531.
13. Martínez, R. L. (2012). *Micología Médica. Procedimientos para el diagnóstico de Laboratorio* (3.ª ed.). Editorial Trillas.
14. Méndez-Tovar LJ, Mejía-Mercado JA, Hernández-Hernández F, López-Martínez R, Silva-González I. Frecuencia de micosis invasivas en un hospital mexicano de alta especialidad. Experiencia de 21 años. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. (2016); 54(5):581-7.
15. Pemán J, Martín E., Rubio C. (2007). *Guía práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica*. Revista Iberoamericana de Micología, de Elsevier.
16. Russo, A., Tiseo, G., Falcone, M. et al. Pulmonary Aspergillosis: An Evolving Challenge for Diagnosis and Treatment. *Infect Dis Ther* 9, 511–524 (2020).
17. Salazar, A. S., Keller, M. R., Olsen, M. A., Nickel, K. B., George, I. A., Larson, L., Spec, A. (2020). Potential missed opportunities for diagnosis of cryptococcosis and the association with mortality: A cohort study. *EClinicalMedicine*, 27(3).
18. Warnock DW. (2020). Mycotic agents of human disease. In: Fleming DO, Hunt DL. *Biological safety principles and practices*. Washington D.C., American Society for Microbiology Press, 111-120.
19. World Health Organization. Regional Office for South-East Asia. (2009). *Laboratory manual for diagnosis of fungal opportunistic infections in HIV/AIDS patients*.
20. Zafar, A., Jabeen, K., Farooqi, J. (2017). *Practical guide and atlas for the diagnosis of fungal infections*.

**Identificación de hongos oportunistas de interés clínico por
Michelle Alejandra Ascencio Castillo
Aarón Jared Canela Castillo
Erika Enríquez Domínguez
erika.e.dominguez@gmail.com**

**Ilustraciones de
Karen Enríquez Domínguez**

**Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Diciembre de 2021**

