

22
rej.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**CREACION DE UN LABORATORIO DE
MICOLOGIA MEDICA EN LA FES
ZARAGOZA**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLÓGICO

P R E S E N T A :

RENE GARDUÑO GUTIERREZ

U N A M
F E S
Z A R A G O Z A



LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

MEXICO, D. F.

MARZO, 1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**CREACIÓN DE UN LABORATORIO DE MICOLOGÍA
MÉDICA EN LA F.E.S. ZARAGOZA**

**EL PRESENTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN SE REALIZÓ
EN EL LABORATORIO DE PRODUCCIÓN DE CAMPUS I
DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA" BAJO LA DIRECCIÓN DEL M. EN C. JOSE
LUIS ALFREDO MORA GUEVARA**

DEDICATORIAS

A la memoria de mi padre, ARMANDO:

A pesar de que ya no estás con nosotros, te doy las gracias por tus enseñanzas y haber forjado en mí tus principios, que me han ayudado a regir mi vida por el buen camino; por enseñarme a luchar siempre con todas las fuerzas hasta el final y nunca perder la esperanza.

A mi madre, CATALINA:

Te doy las gracias por brindarme la oportunidad de superarme, por tus consejos, amor, ánimos, por ser mi apoyo y no perder la confianza en mí aún en los momentos difíciles, por tratar de ser mi padre y a la vez madre y sobre todo por ser mi amiga; que siempre seguirá enseñándome a ser cada día mejor.

A mis hermanos, ARMANDO, VICTORIA, MAXIMILIANO Y EN ESPECIAL, TARCILA y CATALINA:

Por ser cada uno de ellos un ejemplo a seguir, de superación, tenacidad, comprensión y amor; gracias por su apoyo.

A mis sobrinos, TALINA, LALO, PEDRO, COSSY, BETSA y muy en especial a MARIO:

Esperando que con este trabajo no olviden, que no importa que tan difíciles y duros sean los tiempos, con un poco de sacrificio y tenacidad se puede llegar al triunfo anhelado.

Con mucho amor a una personita muy especial, ROCIO DEL CARMEN CORONEL MORAN:

Por tener siempre tiempo para escucharme, comprenderme, darme ánimos y cariño; tanto en los momentos difíciles como en los buenos a lo largo de toda la carrera y en el presente trabajo de tesis; gracias por ser tan linda conmigo e impulsarme a cada momento, te amo Car.

A Sr. ADOLFO y Sra. MARY:

Les doy las gracias por brindarme su confianza y amistad durante todo este tiempo.

A mis amigos, PEDRO, MANUEL, ENRIQUE Y ARMANDO:

Por todos los buenos ratos que compartimos juntos, por su amistad sincera, que es lo único que no se puede comprar; gracias muchachos.

AGRADECIMIENTOS:

A la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza:

Por brindarnos los conocimientos teóricos adquiridos en sus aulas, y los prácticos en sus laboratorios, a lo largo de nuestra formación profesional.

A quienes conforman el jurado de tesis, por sus valiosos comentarios y sugerencias en la revisión del escrito:

- Q.F.B. María de las Mercedes Zamudio Durán.
- M. en C. José Luis Alfredo Mora Guevara.
- Q.F.B. Patricia Vidal Millán.
- Q.F.B. Ángel Barajas Chavarría.
- Q.F.B. María Galia Martínez Flores.

Al M. en C. José Luis Alfredo Mora Guevara:

Por la manera en que dirigió el presente trabajo, así mismo por su valiosa asesoría, orientación y apoyo.

Al Q.B.P. Antonio Capón Meneses Jefe del laboratorio de producción de campus I de la F.E.S. Zaragoza:

Por permitir el desarrollo de la parte experimental del presente trabajo, así como por sus donaciones de cepas de dermatofitos y sus valiosas aportaciones durante el proyecto de investigación

A la Dra. Obdulia Rodríguez Rodríguez Directora del Centro Dermatológico PASCUA:

Por la donación de sus cepas de dermatofitos y la información referente al manejo de pacientes infectados por estos microorganismos.

A la Q.B.P. Regina Herrera Nieto y al C.D. Jaime Cesar Islas Ramírez:

Por las facilidades y asesorías otorgadas en el uso adecuado del fotomicroscopio en campus II de la F.E.S. Zaragoza.

Al personal que trabaja en el laboratorio de producción de campus I por sus consejos y apoyo en el desarrollo del presente trabajo:

- Q.B.P. Ruth Paz González.
- C.D. Alfredo Salvador Sánchez Figueroa

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES HISTÓRICOS.....	6
DATOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	6
AGENTES ETIOLÓGICOS.....	7
GÉNERO TRICHOPHYTON.....	9
GÉNERO MICROSPORUM.....	11
GÉNERO EPIDERMOPHYTON.....	13
TIÑAS.....	15
FORMAS SUPERFICIALES DE TIÑAS.....	16
FORMAS PROFUNDAS DE TIÑAS.....	20
CANDIDOSIS.....	21
CRÍPTOCOCOSIS.....	28
TRATAMIENTO.....	30
OBJETIVOS GENERALES.....	34
OBJETIVOS PARTICULARES.....	34
HIPÓTESIS.....	34
MÉTODOS 1a. PARTE: REQUERIMIENTOS PARA INSTALAR UN LABORATORIO DE MICOLOGÍA MÉDICA.....	36
MÉTODOS 2a. PARTE: DESARROLLO EXPERIMENTAL EN EL LABORATORIO.....	36
RESULTADOS 1a. PARTE.....	42
RESULTADOS 2a. PARTE.....	62
GRÁFICAS.....	64
FOTOS.....	70
ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	72
CONCLUSIONES.....	73
ANEXO 1.....	74
ANEXO 2.....	81
ANEXO 3.....	82
GLOSARIO.....	105
BIBLIOGRAFÍA.....	108

INTRODUCCIÓN

CREACIÓN DE UN LABORATORIO DE MICOLOGÍA MÉDICA EN LA FES ZARAGOZA

RESUMEN

Estos organismos han acompañado al hombre, ya sea como fuente de alimento o ligado a rituales mágico religiosos. A algunos de éstos se les conoció en la América prehispanica como "teonanacatl que significa carne de los dioses " No obstante la micología médica data del Siglo XIX con los estudios de Langenbeck sobre candidosis, de Mahon en relación con la tiña alopecica y de Gruby sobre el favus

La comprensión de las micosis requiere del conocimiento profundo del parásito y del huésped. Estas relaciones parásito-huésped, constituyen la esencia del estudio de las micosis, así como de todas las enfermedades de origen infeccioso, su estudio se apoya en los datos proporcionados por los laboratorios

Actualmente la micología médica ha llegado a un desarrollo tal, que como disciplina ocupa un rango comparable en amplitud e importancia a la microbiología y la parasitología. Es evidente que al extenderse los campos de la micología médica y al disponer de nuevos avances en su conocimiento, se crea la necesidad de disponer de guías prácticas y fuentes de información adecuadas para el personal que dedica su tiempo al quehacer micológico, sobre todo para aquellos que se encargan del aislamiento e identificación de hongos patógenos para fines de diagnóstico de las micosis. Por todo lo anterior se tuvo la motivación para emprender la tarea de crear un laboratorio de micología médica y la presente guía metodológica en la FES Zaragoza

INTRODUCCIÓN

El módulo de Microbiología General II (MG-II), esta inserto en 7o semestre de la carrera de Q.F.B., Dicho módulo está conformado en forma teórica-práctica. Por otra parte desde la fundación de la FENEP Zaragoza en 1976, los planes de estudio de las diferentes carreras que la conforman no habian sufrido una actualización y es en 1989 cuando la carrera de Q.F.B., realiza su actualización, la cual fue aceptada en lo general, actualmente el plan de estudios encuentra actualizandose en lo particular. Por lo que en 1992 se realiza la primera actualización de la carta descriptiva, posteriormente cada año se han realizado las actualizaciones correspondientes

Por otra parte el manual de laboratorio del citado módulo, inicia su reestructuración en Noviembre de 1994, concluyendo en Mayo de 1995, que es cuando se envia al comite de la carrera. En el mes de Septiembre del mismo se regresa con los comentarios y sugerencias por parte del comite de la carrera, y en el mes de Noviembre de 1995, dicha carta se regresa para su envío al comite editorial y su posterior publicación

Paralelo a este proceso tan dinamico que está viviendo nuestra carrera, se ha producido material en forma aislada de cierto material de apoyo académico al modulo de MG-II. Pero estos trabajos no cubren las necesidades de apoyo que el módulo requiere, por lo que se desprende la necesidad de retomar un área como la micología, en especial los dermatofitos, con lo cual se hace indispensable la creación de un laboratorio de micología médica, toda vez que la incidencia de casos por dermatofitos y dermatomicosis en el Estado de México y DF alcanzan un total de 85081 (ochenta y cinco mil ochenta y uno) casos en 1993, dato proporcionado por la Secretaria de Salud (S.S.) (1).

¿ Qué es un ser vivo?

Es un organismo formado por una o varias células con capacidad de crecer, reproducirse, así como mantener su fisiología, morfología normales y regular su propia vida ante los cambios que acontecen a su alrededor. (16).

¿ Qué es la piel ?

La piel es una cubierta indispensable para una adecuada armonía, si falta, por causa de un traumatismo, enfermedades hereditarias, o de contagio, se pone en peligro la vida, o ésta puede ser incompatible con una extensa carencia de revestimiento cutáneo

La piel deriva del ectodermo y mesodermo, el primero da origen a epidermis, folículos pilosos, glándulas sebáceas y sudoríparas, uñas, melanocitos y células de Langerhans, el segundo origina tejido conjuntivo, músculo piloerector, vasos y células de dermis

Datos histológicos, se distinguen

Epidermis.

- Estrato basal: Hileras de células cilíndricas basófilas
- Estrato espinoso: Formado por células poliedricas.
- Estrato granuloso: Células con granulaciones.
- Estrato córneo: Células muertas aplanadas sin núcleo

Dermis

- Tejido conjuntivo.
- Vasos y nervios

Hipodermis.

- Adipocitos y tabiques de células de tejido conjuntivo

Funciones: Dar protección al cuerpo, mantener la temperatura, control hidroelectrolítico, ser queratínica, melánica, sebácea, sudoral, sensorial y perceptiva., (17).

¿ Qué es un hongo?

Los hongos según Whitaker en su clasificación de 1969, pertenecen al reino Fungi.

Clasificación

- Animal
- Vegetal.
- Fungi: Hongos.
- Protista
- Monera.

Los hongos son microorganismos eucarióticos (células con núcleo) pueden ser unicelulares o pluricelulares, uninucleados o multinucleados, además son quimiorganotróficos, la mayoría producen aflotoxinas que poseen de 1 a 2 núcleos de cumarina, la cual es muy tóxica para los seres vivos.

La pared de los hongos puede ser de quitina o de celulosa, los hongos se consideran saprófitos o saprobios (pueden alimentarse de materia en descomposición), requieren de una fuente de C, H, O, N y algunos oligoelementos como son F, Cu, Mg, Mn, Fe, Zn, son aerobios, son ligeramente acidófilos (crecen a un pH de 5 a 7), pueden ser:

- Psicrófilicos Crecen de 4 - 20°C
- Mesófilicos Crecen de 20 - 40°C
- Termófilicos Crecen de 40 - 70°C
- Dimórficos Posee diferentes tamaños
- Polimórficos Presenta diferentes colores
- Pleomórficos Presentan diferentes formas

Además los hongos no son fotosintéticos, carecen de clorofila. Se reproducen de manera natural por medio de esporas, (casi todas las partes de un hongo son potencialmente capaces de desarrollarse y dar un nuevo individuo)

Los hongos pertenecen al reino Fungi, división Eumicota (hongo verdadero)

Clase

- Zygomycetes
- Ascomycetes Reproducción asexual y sexual
- Basidiomycetes
- Deuteromycetes Reproducción asexual

Las esporas que se producen sexualmente tienen núcleos derivado de las células originales, las esporas asexuales, se producen por simple diferenciación del talo en crecimientos. El hongo está constituido por hifas que en conjunto forman micelio aéreo, o micelio vegetativo

- Hifas: Es una cadena de células que pueden ser sexuadas o asexuadas, en formación, ya sea en forma de cadenas transversas o tabiques, a medida que las hifas crecen se ramifican y se forma un micelio
- Micelio aéreo Este micelio crece y se eleva por arriba del sustrato, y en ocasiones es el encargado de soportar al esporangioforo
- Esporangioforo Estructura del hongo que se encarga de guardar a las esporas
- Micelio vegetativo Este micelio crece y penetra al interior del sustrato, absorbiendo de esta manera el alimento
- Espora Unidad estructural reproductiva de alta resistencia que al separarse del organismo es capaz de dar lugar a otro organismo nuevo

¿ Qué es un dermatofito ?

Son hongos que invaden tan sólo la superficie de la piel causando infección ya que tienen la capacidad de infectar todos los componentes cornificados de la piel, incluyendo pelo y uñas (4 y 5)

¿ Qué es una dermatomicosis ?

Son micosis superficiales ocasionadas por dermatofitos, hongos parásitos de la queratina, afectando piel y anexos, son de evolución crónica, debido a la reacción de el huésped a los productos metabólicos del hongo, más que a la invasión del tejido vivo por el microorganismo. (3 y 4).

¿ Qué es una levadura ?

Los términos "levadura" y "levaduroide" son propios para los microorganismos fúngicos unicelulares que se producen por gemación o de otra forma, y que en su estado anamorfo se consideran miembros del genero **Blastomycetes**. Además en el sentido más estricto de la palabra, no existen levaduras patógenas por naturaleza, más bien son oportunistas. Teniendo una fase levaduriforme a 37°C y una fase micelial de 20 - 25°C

¿ Por qué se eligieron a los dermatofitos en el presente trabajo?

Las dermatomicosis representan las enfermedades más frecuentes de la piel. Dentro del índice de incidencia de enfermedades en nuestro país se encuentran dentro de los diez primeros lugares de padecimiento infeccioso. Si bien no provocan mortalidad, representan una alta morbilidad y en algunos casos incapacidad para el paciente.

Además de que los agentes etiológicos de estas enfermedades pueden ser prevenibles, con una buena higiene del individuo.

¿Por qué se anexa Candidosis en el presente trabajo?

Debido a que es una levadura cosmopolita. Se considera como una de las infecciones por oportunistas más frecuente en seres humanos. La incidencia se ha elevado durante los últimos 20 años.

Constituye el 25% de las micosis superficiales. Afecta a individuos de cualquier edad, raza o sexo. No tiene relación con el clima, la situación geográfica ni el nivel socioeconómico. Se presenta en 5 al 20% de los recién nacidos.

Las formas profundas y sistémicas son raras, se presentan en 80 a 90% de los enfermos con SIDA; en México se han observado en un 60% y conforme pasa el tiempo va aumentando dicho porcentaje, predominan en boca y esófago.

¿Por qué se anexa Criptococosis en el presente trabajo?

Debido a que se trata de una enfermedad cosmopolita y rara. No tiene predilección por sexo, aunque hay ligero predominio en el varón. Es más frecuente en personas de 30 a 60 años de edad y rara en niños. Afecta más a individuos debilitados por enfermedad de Hodgkin, leucemia, diabetes, sarcoidosis, y en los últimos años a los enfermos de SIDA con mayor frecuencia, así como a pacientes bajo tratamiento con antibióticos, glucocorticoides o inmunosupresores. También se presenta en personas expuestas a excremento de palomas o a aire acondicionado, contaminado con éste, como suele suceder en la ciudad de México.

Esporas de reproducción asexual

- Artrospora



- Blastospora

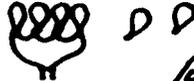


- Clamidiospora

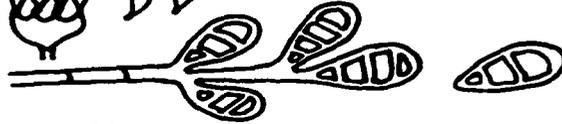


Esporas de reproducción sexual

- Basidiospora



- Ascospora



- Zigospora. (18 y 19).



¿Qué es micosis?

Se les llama micosis a las infecciones causadas por hongos microscópicos y toman su nombre de la parte del organismo que invaden (onicomicosis, afecta a la uña) o del hongo que las causa (coccidiomicosis por *Coccidioides immitis*). Los agentes de las micosis pueden ser endógenos o exógenos, los hongos endógenos se encuentran en mucosas o tegumentos de individuos sanos y solo en condiciones especiales del huésped (inmunodepresión, diabetes, antibioterapia) se convierten en patógenos, y los exógenos se encuentran en el exterior del individuo como lo es la piel

¿ Qué tipo de micosis hay ?

Según su localización hay 4 grandes grupos de micosis que son superficiales, subcutáneas, sistémicas y oportunistas

Las subcutáneas y sistémicas se pueden agrupar en las micosis profundas. En general las micosis superficiales se producen por contacto directo con el hongo, con la persona o animal infectado, afectan la piel, anexas y mucosas, como lo son las tiñas por ejemplo

Las micosis subcutáneas por lo general se adquieren del ambiente y el hongo penetra por traumatismos de la piel. En las micosis sistémicas las esporas del hongo penetran por inhalación y producen generalmente micosis pulmonar primaria de donde pueden diseminarse a cualquier otro órgano o sistema. Las micosis sistémicas pueden afectar piel, mucosas y las superficiales extenderse a órganos profundos, en general las micosis son de evolución subaguda o crónica, pueden durar años o ser letales

Las micosis oportunistas son causadas por hongos saprobitos que se transforman en patógenos bajo diferentes condiciones del huésped.

ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Fueron descritos por los griegos y los romanos, los primeros les llamaron herpes por su forma circular, y los segundos, tinea que significa larva o polilla

En el siglo XVII en México se utilizaba la "calota" como tratamiento en indígenas tarahumaras, no sin antes encomendarlos al Justo Martir, el santo de las tiñas, el tratamiento consistía en un birrete preparado con resinas calientes que se aplicaban en la zona afectada, dejándolo secar y luego se arrancaba bruscamente, de esta manera se desprendían las escutulas del favus, pero se producían grandes hemorragias

En 1882 en un suplemento del Oxford English Dictionary, ya apareció el término dermatofito, aunque se ignora cuando y quien lo acuñó. En 1890 Sabouraud inició el estudio sistemático de las dermatofitosis y en 1910 publicó una enciclopedia, cuyo tercer volumen "Les Teignes", se considera como una obra clásica de la literatura médica, clasificando por primera vez a los dermatofitos en 4 géneros, *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton* y *Achorion*

En 1934 Emmon, siguiendo las reglas de nomenclatura y taxonomía botánicas, clasificó a los dermatofitos en sólo 3 géneros, *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*, el cual incluía al género *Achorion*. Pese a la poca importancia clínica de las micosis superficiales, es interesante señalar que los dermatofitos estuvieron a punto de cambiar la historia, pues en 1942, durante la 2ª guerra mundial muchos soldados británicos aliados presentaron formas incapacitantes de "tiña de los pies" lo cual dio lugar a la obra "Fungi go to war"

En 1945, Latapi describió en México los primeros casos de Tokelau en la sierra Norte de Puebla. En 1977, Ajello hizo una revisión histórica y señaló que el conocimiento sobre dermatofitos ha sido paralelo al desarrollo de la micología médica en general (3).

DATOS EPIDEMIOLÓGICOS

Según Arenas (1993), los datos más recientes recopilados por él, son micosis cosmopolitas que predominan en zonas tropicales. Se consideran las más frecuentes de las enfermedades por hongos. En México se observa entre los diez primeros lugares de consulta dermatológica. Afecta a sujetos de cualquier raza, edad o sexo así como de cualquier medio socioeconómico u ocupación. En México se observa una frecuencia de los dermatofitos de la siguiente manera:

- *T. rubrum* 36 - 52%
- *M. canis* 14 - 24% ocasionando el 40% de las tiñas de la cabeza (5).
- *T. tonsurans* 15 - 28%
- *T. mentagrophytes* 5 - 8%
- *E. floccosum* 3 - 8%

Sin embargo en un artículo publicado por la revista del centro dermatológico Pascua en los meses de Mayo a Agosto de 1993, manifiesta que el 19% de personas que acuden al servicio de dermatología es debido a micosis, teniendo una incidencia los siguientes dermatofitos:

- *T. rubrum* 61.1%
- *M. canis* 23.7%
- *T. tonsurans* 7.2%
- *E. floccosum* 4.9%
- *T. mentagrophytes* 3.2%
- *M. gypseum* 0.8% (6).

En las estadísticas reportadas por el INDRE en 1993, en el Edo. de México y en el D.F. reportaron 85081 casos de dermatomicosis y dermatofitosis, los números de casos presentes en el país se anexan en la siguiente tabla:

NÚMEROS DE CASOS TOTALES DE DERMATOFITOSIS Y DERMATOMICOSIS				
Estado	Número	Estado	Número	
Aguascalientes	3794	Morelos	13722	
B. C. N.	8272	Nayarit	8364	
B. C. S.	2210	Nuevo León	51627	
Campeche	7724	Oaxaca	11126	
Coahuila	14618	Puebla	9463	
Chiapas	6185	Querétaro	9388	
D. F.	32885	Quintana Roo	7350	
Colima	4103	S. L. P.	7016	
Chihuahua	4992	Sinaloa	28974	
Durango	2513	Sonora	7716	
Guanajuato	22029	Tabasco	16320	
Guerrero	15423	Tamaulipas	34034	
Hidalgo	4374	Tlaxcala	4392	
Jalisco	43101	Veracruz	73260	
México	52196	Yucatán	5991	
Michoacán	5426	Zacatecas	5708	

Mientras que en un artículo de la revista *Mycosis* publicado en 1994, manifiesta que las micosis en México causadas por dermatofitos va cambiando constantemente con el paso del tiempo así como va variando la frecuencia de los agentes causantes de las dermatofitosis, como lo muestra el siguiente cuadro.

- *T. rubrum* 80.9%
- *T. mentagrophytes* 9.0%
- *M. canis* 5.3%
- *T. tonsurans* 2.8%
- *E. floccosum* 2.0%

Las variaciones observadas en los agentes etiológicos y formas clínicas de las dermatofitosis en México durante los últimos 20 años, reflejan la gran capacidad de adaptación de *Trichophyton rubrum* a las condiciones del huésped, razón por la cual sigue siendo el de mayor incidencia (7).

NOTA: la información epidemiológica, aquí mencionada es la más reciente, que se ha logrado obtener de las diversas instituciones de epidemiología, investigación y servicio a la comunidad

AGENTES ETIOLÓGICOS

Los microorganismos causales se llaman dermatofitos de acuerdo a la clasificación taxonómica, hongos queratinofílicos que limitan su presencia a estructuras que contienen queratina (pelo, uñas y capa córnea).

Clasificación taxonómica de los dermatofitos:

Sexuados

- Reino Fungi
- División Eumycota
- Subdivisión Ascomycotina
- Clase Euascomycetes
- Orden Eurotioales
- Familia Arthrodermataceae (Gymnoascaceae).
- Género *Arthroderma*.

Asexuados

- Subdivisión Deuteromycotina
- Clase Hyphomycetes.
- Orden Moniliales
- Familia Moniliaceae
- Género *Epydermophyton*,
Microsporium,
Trichophyton.

Se han identificado 41 especies anamorfas, casi todas viven como saprofitas del suelo y pueden aislarse por el método del anzueto, sólo 5 se consideran importantes como patógenos.

Clasificación de géneros y especies anamorfos de dermatofitos.

* Patógenos

Epidermophyton

- * *E. floccosum*.
- *E. stockdaleae*.

Microsporium

- * *M. canis*
- * *M. gypseum*.
- * *M. nanum*.
- *M. amazonicum*.
- *M. anamorfo de Arthroderma cookielum*
- *M. boullardi*.
- *M. cookei*.
- *M. equinum*.
- *M. ferrugineum*.
- *M. fulvum*.
- *M. gallinae*.
- *M. persicolor*.
- *M. praecox*.
- *M. racemosum*.
- *M. ripariae*.
- *M. van breuseghemii*.

Trichophyton.

- • *T. concentricum.*
- • *T. mentagrophytes.*
- • *T. rubrum.*
- • *T. schoenleini.*
- • *T. tonsurans.*
- • *T. verroscosum.*
- • *T. violaceum.*
- *T. ajelloi.*
- *T. equinum.*
- *T. flavescens.*
- *T. georgiae.*
- *T. gloriae.*
- *T. gourvili.*
- *T. longifusum.*
- *T. marianii.*
- *T. magnii.*
- *T. phaseoliforme.*
- *T. simii.*
- *T. soudanense.*
- *T. terrestre.*
- *T. vanbreuseghemii.*
- *T. yaudetii.*

Los géneros *Trichophyton*, *Microsporium*, *Epidermophyton* se distinguen entre si por sus características microscópicas, esto es por sus conidios y macroconidios, en especial por sus macroconidios, que son específicos de cada género (5).

GÉNERO TRICHOPHYTON.

Las especies de *Trichophyton* atacan el pelo, piel y uñas. En los pelos infectados pueden descubrirse arthrosporas dispuestas en hileras paralelas en el interior del pelo (tipo endothrix) o en hileras también paralelas fuera del pelo (tipo ectothrix).

Por examen macroscópico la colonia tiene aspecto algodonoso, granular o polvoriento, veloso, liso o céreo. La pigmentación varía notablemente ya que los cultivos pueden ser blancos, rosados, rojos, púrpúreos, violetas, anaranjados, amarillos a pardos.

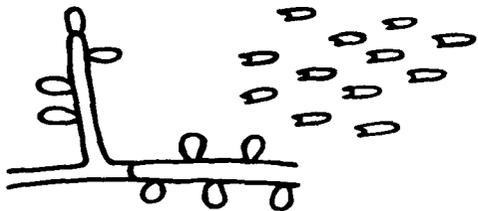
Por examen microscópico se ven gran número de microconidios en forma de pequeñas estructuras en maza o subsféricas, hialinas, de pared delgada, unicelulares, de 2 por 4 micras, que se originan en grupos o racimos o nacen aisladamente a los lados de las hifas (tirso).

Los macroconidios (husos) son raros o no existen en algunas especies, a menos que el hongo se desarrolle sobre un medio apropiado, y se ven como grandes estructuras fusiformes o en maza, hialinas, de pared gruesa o delgada y lisas, de 4 a 6 micras de anchura por 10 a 50 micras de longitud. Puede verse también otras estructuras, como micelio en raqueta, clamidiosporas, cuerpos nodulares e hifas en espiral.

GÉNERO TRICHOPHYTON

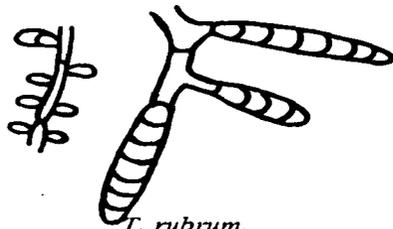
ESQUEMAS.

microconidios.



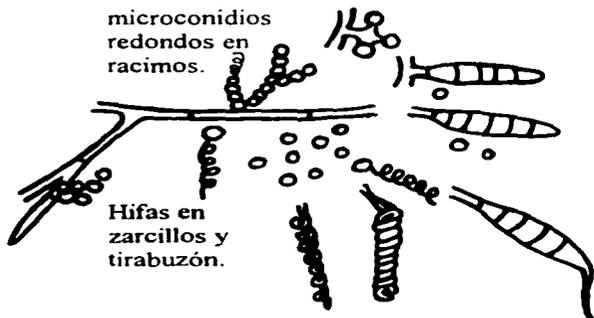
T. tonsurans.

macroconidios en salchicha.



T. rubrum.

microconidios redondos en racimos.



Hifas en zarcillos y tirabuzón.

T. mentagrophytes.

Candelabro fávico



T. schoenleinii.

GÉNERO *MICROSPORUM*.

Las especies de *Microsporium* atacan solamente la piel y el pelo. En los pelos infectados se identifica el hongo como una vaina de mosaico de pequeñas esporas en torno al tallo piloso, los pelos infectados emiten fluorescencia verde con luz de Wood

Por examen macroscópico en los cultivos de *Microsporium* desarrolla un micelio aéreo algodonoso, lanudo, enmarañado o polvoriento cuyo color varia de ante a blanco o a matices más intensos de pardo

Por examen microscópico la pared espinosa de los macroconidios caracteriza al género. Esta espora puede ser oval, de pared gruesa o delgada; en los lados de las hifas, sésiles, o sobre cortos esterigmas, nacen pequeños microconidios, en maza de 3 a 6 micras, unicelulares. Se advierten también hifas en raqueta, o en forma de peine, cuerpos nodulares y clamidiosporas. También cabe comprobar la ausencia de grandes macroconidios típicos multibacados.

GÉNERO MICROSPORUM

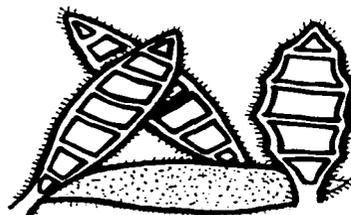
ESQUEMAS.

Macroconidios con
más de 6 lóbulos.



M. canis

Macroconidios
hasta 6
lóbulos.



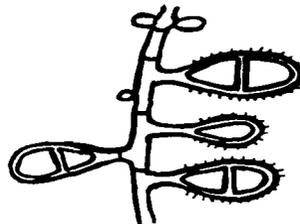
M. gypseum.

Macroconidios
deformados.



M. audouinii.

Macroconidios
enanos.



M. nanum

GÉNERO *EPIDERMOPHYTON*.

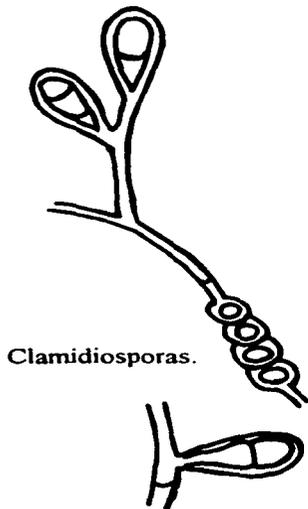
El pelo no es infectado por *Epidermophyton*, el cual sólo ataca la piel y las uñas

Macroscópicamente, su aspecto de los cultivos es, característicamente aterciopelado o polvoriento, con surcos radiales centrales y color amarillo-verdoso

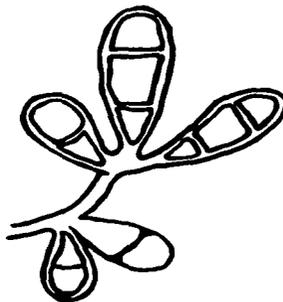
Por examen microscópico sólo se producen los grandes macroconidios de pared delgada, lisos, multitabcados y en maza. En el micelio se ven clamidiosporas e hifas en forma de raquetas, no se observa desarrollo de microconidios, sólo se incluye una especie en este género

GÉNERO EPIDERMOPHYTON

ESQUEMAS.



Macroconidios en mazo.



E. floccosum. (3 y 5).

TIÑAS

Para adquirir la enfermedad se precisa contacto con la fuente, el modo de contagio puede ser zoofílico (de animales a humanos), geofílico (de suelo a humanos) y antropofílico (de hombres a hombres).

La infección se explica en la siguiente manera: cuando una espora se deposita en la superficie de la piel, se reproduce en la capa córnea, inicialmente origina una papula y luego una lesión anular por la extensión radiada de los filamentos, también ocurre parasitación de vellos, y de este modo actúan como reservorios.

En la piel cabelluda el hongo se reproduce en la capa córnea (a nivel del orificio folicular), penetra e invade la vaina del pelo, se extiende hacia la profundidad sin sobrepasar la zona queratogénica; al mismo tiempo se extiende hacia la parte distal del pelo y lo transforma en un pelo grueso y frágil que se rompe con facilidad. Los arthroconidios pueden invadir la vaina del pelo sin destruir la cutícula (endothrix) o perforar y alterar esta última produciendo una vaina externa de conidios (ectoendothrix).

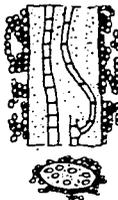
GRUPO ECTOTHRIX

Microspórico



M. canis.

Microide



T. mentagrophytes.

Megasporado



T. verroscosum.
(*ochraceum*)

GRUPO ENDOTHRIX

Tricofílico



T. tonsurans.

Fávico.



T. schoenleinii

En uñas el dermatofito penetra por la queratina blanda del hiponiquio, por el borde lateral de la uña, o por la lúnula y afecta el eponiquio, más rara vez puede hacerlo por la superficie de la lámina ungueal

Después afecta el lecho y en la uña misma se extiende por una red de túneles excavadas en la queratina dura sin invadir la matriz. El hongo penetra en los corneocitos o sólo los separa mecánicamente. La colonización produce una reacción del huésped debida a los productos metabólicos del hongo como son las queratinasas, proteasas, elastasas y lipasas. En algunos pacientes hay reacción inflamatoria intensa, en otros es mínima. El grado de la respuesta depende de dos factores, 1) de la especie causal, y 2) de el grado de hipersensibilidad del huésped.

Por todo lo anterior las dermatomicosis se han clasificado de la siguiente manera (3 y 5).

I.- Formas superficiales de tiñas

Tiña de la cabeza
Tiña del cuerpo
Tiña imbricada
Tiña inguinal
Tiña de la mano
Tiña de los pies
Tiña de las uñas

II.- Formas profundas de tiñas

Dermatofitosis inflamatorias
Querión de Celso
Favus.
Tiña de la barba
Granuloma tricofítico

I.- FORMAS SUPERFICIALES DE TIÑAS.

TIÑA DE LA CABEZA O TINEA CAPITIS.

DATOS EPIDEMIOLÓGICOS: Los agentes etiológicos implicados más frecuentes son *T. tonsurans*, *M. canis* y *M. gypseum*

CUADRO CLÍNICO: Puede ser seca o inflamatoria (descripción microspórica y tricofítica) La variedad seca se manifiesta por descamación y "pelos tiñosos" pelos cortos, gruesos, quebradizos, deformados y en ocasiones con una vaina blanquecina, que recuerdan el aspecto de "patitas de araña"

Las tiñas tricofíticas originan alopecia difusa con placas pequeñas e irregulares intercaladas con pelos sanos, en ocasiones sólo se observan como puntos negros (debido a que los cabellos se rompen cerca del orificio folicular), y puede haber lesiones muy pequeñas

Las tiñas microspóricas originan una o pocas placas redondeadas de mayor tamaño de las anteriores, de varios centímetros de diámetro, todos los pelos cortos se encuentran al mismo nivel, las placas se encuentran bien limitas. En ambas variedades clínicas en las zonas donde no hay pelo, hay prurito, ardor y descamación ligera. (5).

Reacción "IDE".

La reacción dermatofítide "ide" es una manifestación alérgica de la infección en un sitio distal, y las lesiones están desprovistas de microorganismos. Se encuentran en cualquier parte del cuerpo una serie de vesículas agrupadas (de tipo pustuloso), que están tiesas, producen comezón y a veces son dolorosas (4).

DIAGNÓSTICO: Es sugerido por el cuadro clínico, por pelo quebradizo y carente de brillo, pero sobre todo por examen directo del epitelio afectado (borde descamado) montado con hidróxido de potasio (KOH) y se observan las macroconidias características de cada género, el uso de la lámpara de Wood también es de ayuda (4).

Lámpara de Wood. Los cabellos infectados por *M. canis*, *T. mentagrophytes* por mencionar algunos, son fluorescentes a la luz ultravioleta. Esta "luz negra" se conoce comúnmente como lámpara de Wood. Parece que la sustancia fluorescente es producida por el hongo, únicamente en el pelo infectado que se encuentra en crecimiento activo (4).

TRATAMIENTO: Las tiñas secas de la cabeza curan solas al llegar la pubertad. Las formas inflamatorias curan solas en semanas o meses y dejan alopecia permanente. El tratamiento más adecuado es la griseofulvina de 10 a 20 mg/kg de peso al día y en casos resistentes hasta 30 mg. En mayores de 12 años de edad se administran 500 mg al día. Se aumenta la absorción si se toma el medicamento después de ingerir alimentos con grasas (leche o helados).

Se puede agregar antimicóticos tópicos o disulfuro de selenio al 2.5% de shampoo para eliminar las esporas viables de la superficie de la piel cabelluda, conviene frotar las zonas afectadas durante el baño después de unos 3 días, para eliminar pelos o escamas parasitadas, el tratamiento puede necesitar varios meses (4 y 5).

TIÑA DEL CUERPO O TINEA CORPORIS.

DATOS EPIDEMIOLÓGICOS: Los agentes implicados más comúnmente son *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, y *M. canis*.

CUADRO CLÍNICO: Es una tiña de la piel labra (lampiña). Se caracteriza por placas eritematoscamosas redondeadas, con bordes activos, vesiculosos, se extiende en dirección excéntrica y deja la parte central sana o con poca descamación, prurito leve, en forma muy común se encuentran dos tipos de lesiones, una es seca y escamosa anular (manchas anulares) y la otra es vesicular (forma de iris). La primera comienza como una área elevada de inflamación apenas diseminada. El borde está rojo y algunas veces ligeramente hinchado, mientras que el área se cubre con pequeñas escamas. La curación espontánea se presenta en el centro, en tanto que el borde avanza. En el segundo tipo de lesión, las vesículas aparecen en forma irregular o inmediatamente detrás del borde hiperémico y elevado que avanza. Se forma una costra, después sana en el centro de la lesión para dejar una área más o menos pigmentada. La variedad tricofítica origina placas pequeñas y múltiples, se presentan en cualquier parte del cuerpo. La microsporíca genera placas de mayor tamaño y en menor número a veces se forman círculos concéntricos, algunas placas son confluentes, por lo que alcanzan mayor tamaño y son políciclicas o irregulares (4 y 5).

DIAGNÓSTICO: La tiña corporis se caracteriza por la aparición en la piel carente de pelo, de lesión anular papuloescamosa, que puede ser simplemente escamosa o tiene un componente vesicular pustular en la periferia y tiene costra en el centro (cuadro clínico). Examen con KOH al 10% de las escamas que muestra hifas tabicadas con arthroconidios acomodados en forma irregular, cuadrada o redonda (4).

TRATAMIENTO: Se obtienen mejores resultados mediante desprendimiento de las costras y escamas con agua y jabón dos veces al día y después del desbridamiento administrar por vía tópica griseofulvina de 250 mg al día. (3 y 5).

TIÑA IMBRICADA O TOKELAU.

DATOS EPIDEMIOLÓGICOS: Es causada por *T. concentricum*

CUADRO CLÍNICO: Al parecer se transmite antroponómicamente, se caracteriza por placas papuloescamosas, dispuestas en anillos concéntricos, donde las escamas están adheridas a las lesiones las cuales son policíclicas, el eritema es escaso pero el prurito es intenso.

Se desprenden laminillas de epidermis y los bordes libres se dirigen hacia el centro. Un anillo pardusco rodea la periferia que se extiende en forma activa.

DIAGNÓSTICO: El aspecto de anillos policíclicos, policéntricos sin manifestación de eritema es tan característico que hay poca confusión en el diagnóstico. Así mismo como hacer un examen con KOH al 10% de las placas demostrando los macroconidios.

TRATAMIENTO: Se ha registrado curaciones completas con una dosis total de 2.4 g. de griseofulvina durante unos 18 días, en dosis de 0.5 g.

TIÑA INGUINAL O TINEA CRURIS

DATOS EPIDEMIOLÓGICOS: Puede ser causada por *T. floccosum*, *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*, son los más frecuentes.

CUADRO CLÍNICO: Afecta una o ambas regiones inguinales, región pubica, perineo, abdomen y región perianal; puede ser aguda o crónica y en ambas hay prurito intenso, la enfermedad es más común en varones, se caracteriza por placas de dermatitis escamosas, papulosas, elevadas, de bordes bien delimitados cuya periferia que se extiende activamente, se halla tachonada de vesículas o vesiculopustulas, las lesiones pueden ser bilaterales pero no necesariamente simétricas, las porciones centrales son de color pardo a rojo y se hallan cubiertas de escamas furfúraceas finas parecidas al salvado.

DIAGNÓSTICO: El aspecto clínico de las lesiones con sus bordes netamente definidos y periferia activa posee valor diagnóstico indiscutible, aun así se debe de practicar un montaje con KOH al 10% de los bordes en descamación.

TRATAMIENTO: Se recomienda griseofulvina en dosis de 250 mg por día, por vía tópica en forma de micropartículas.

TIÑA DE LA MANO O TINEA MANUUM

DATOS EPIDEMIOLÓGICOS: La mayoría de las infecciones son causadas por *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* y *E. floccosum*.

CUADRO CLÍNICO: Afecta una palma o ambas de las manos. La forma crónica es la más frecuente, se manifiesta por anhidrosis, hiperqueratosis difusa y descamación pulverulenta o placas eritematoscamosas, hay acentuación de los pliegues de flexión. La forma inflamatoria o aguda se debe fundamentalmente a *T. mentagrophytes*. Se caracteriza por vesículas que a veces adoptan el aspecto de eczema o dishidrosis, puede observarse un borde marginal, si afectan los pliegues interdigitales se conoce como intertrigo dermatofítico, hay acentuación de los surcos normales, descamación furfúracea y papulas o vesículas en los bordes. La elevación es crónica y el prurito es inconstante.

DIAGNÓSTICO: Por montaje directo de las escamas con KOH al 10%, se observan las macroconidias características.

TRATAMIENTO: Griseofulvina en forma de micropartículas por vía tópica en dosis de 500 mg por día. (4 y 5).

TIÑA DE LOS PIES O TINEA PEDÍS

DATOS EPIDEMIOLÓGICOS: Es originada por *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* o *E. floccosum*.

CUADRO CLÍNICO: Afecta pliegues interdigitales, plantas y bordes de los pies. Se manifiesta por escamas, maceración, grietas, fisuras (intertriginosa), vesículas y ampollas (vesículoampollar), escamas y áreas de hiperqueratosis o ulceraciones y costras melicéticas (agudas). Puede extenderse a los bordes de los pies, a su cara dorsal o dar formas de mocasin o en calcetín, según el nivel de afección. La evolución es crónica, se acompaña de prurito y olor fétido, cursa con exacerbaciones en épocas calurosas y remisiones en épocas frías.

Es más frecuente la forma seca, con anhidrosis, descamación fina o pulverulenta así como con acentuación de los pliegues de flexión.

DIAGNÓSTICO: Las placas escamosas, furfuráceas parecidas al salvado, o grupos de vesículas sobre las plantas así como fisuras y epidermis macerada, son sugestivas de la tinea pedis, y la confirmación se hace con examen microscópico directo de las escamas con KOH al 10%, observándose las macroconidias.

TRATAMIENTO: Es importante secar bien los pies después del baño y aplicar polvos fungicidas así como cambiar los calcetines diariamente, administrar griseofulvina por vía tópica, 250 mg del fármaco en ultraparticulas por día.

TIÑA DE LAS UÑAS

DATOS EPIDEMIOLÓGICOS: La causa principal, *T. rubrum*, seguida por *T. mentagrophytes*; predomina en las uñas de los pies un 70%, en especial de los primeros dedos en 27% afecta uñas de las manos y solo 3% de manos y pies.

CUADRO CLÍNICO: Las manifestaciones clínicas se clasifican como sigue

A.- Subungueal	
Distal	Paquioniquia
Lateral	Onicólisis
B.- Blanca superficial	Onicólisis
C.- Distrófica total	Onixis

En la onicomiosis subungueal distal y lateral, las uñas son opacas de color amarillento, marrón (café) o grisáceo, son frías y están erosionadas, los bordes dan la impresión de duplicarse, puede haber engrosamiento (paquioniquia), despegamiento (onicólisis) y es rara la invasión de la lámina ungueal (onixis).

La evolución es crónica con invasión lenta y progresiva.

La onicomiosis blanca superficial o leuconiquia tricofítica predomina en el primer dedo del pie, se caracteriza por pequeñas zonas de color blanco porcelana con superficie rugosa.

En la forma distrófica total, las uñas se rompen y desmoronan, tienen aspecto de madera carcomida y dejan un lecho engrosado que también puede quedar destruido.

DIAGNÓSTICO: Generalmente por cuadro clínico, y por montaje directo de las muestras con KOH al 10%.

TRATAMIENTO: La extirpación de las uñas incluyendo los detritos situados debajo de las mismas, es a veces eficaz. Sin embargo es necesaria la administración prolongada de griseofulvina en dosis de 0.5 gr en partículas pequeñas a finas 2 veces al día.

II.- FORMAS PROFUNDAS DE TIÑAS.

DERMATOFITOSIS INFLAMATORIAS.

Las dermatofitosis inflamatorias pueden depender de la respuesta inmunitaria al dermatofito en sí o de la aplicación prolongada de glucocorticoides. El aspecto modificado de las dermatofitosis de base se llama corticosteoico, que consiste en mayor eritema y extensión de las lesiones, presencia de placas satélite, estrias, atróficas y en el estudio micológico, aislamiento del dermatofito.

QUERIÓN DE CELSO

DATOS EPIDEMIOLÓGICOS: Es causada por *M. canis* y *T. mentagrophytes* principalmente.

CUADRO CLÍNICO: Es una tiña inflamatoria. Manifestada por un "plastron" inflamatorio constituido por pústulas y abscesos múltiples, hay adenopatías satélite y dolor a la presión, pero no fiebre, en las etapas iniciales es una foliculitis y en las avanzadas constituye el querion verdadero. Tomo su nombre de su aspecto, pues el término en griego significa "panal".

La alopecia es muy importante y es difícil de encontrar pelos tiñosos, sin tratamiento puede dejar alopecia definitiva. Hay infiltrado inflamatorio masivo agudo de las áreas afectadas y de los tejidos mas profundos. En las áreas adyacentes a la foliculitis, se sienten pantanosas a la palpación y el pus rezuma de los folículos. Es importante observar que el pus no se deba a invasión bacteriana secundaria, si no que se deba al hongo y en consecuencia no se necesita intervención quirúrgica.

DIAGNÓSTICO: Montaje directo de las muestras con KOH al 10% suele dar diagnóstico adecuado, además de el cuadro clínico.

TRATAMIENTO: Griseofulvina, 10 a 20 mg/kg de peso al día en menores, en mayores de 12 años hasta 500 mg al día, para disminuir el grado de alopecia cicatrizal, algunos recomiendan prednisona, 2 mg/kg de peso corporal al día durante las dos primeras semanas (4 y 5).

TIÑA FÁVICA O FAVUS.

DATOS EPIDEMIOLÓGICOS: Es causada por *T. schoenleumi*, *M. gypsum*, *T. violaceum*, principalmente.

CUADRO CLÍNICO: Puede afectar tanto la piel lampiña como el cuero cabelludo, se caracteriza por escútilas, es decir coqueletas constituidas por masa o filamentos y cubiertos por costras amarillentas, que dan el aspecto de miel en el panal (favus = panal) despiden un olor característico a "ratón mojado", cuando se desprenden las costras quedan al descubierto bases húmedas rojas y deprimidas. La evolución es crónica, sin tendencia a la involución.

DIAGNÓSTICO: El diagnóstico es evidente cuando se advierten en las lesiones escutulas amarillas típicas, olor a "ratón mojado", fluorescencia con lampara de Wood, no por eso está por demás hacer una preparación directa de la muestra con KOH al 10%.

TRATAMIENTO: Griseofulvina en forma de partículas pequeñas a finas en la mañana y en la noche después de una comida rica en grasa, 500 mg. al día.

TIÑA DE LA BARBA O TINEA BARBAE

DATOS EPIDEMIOLÓGICOS: Originada principalmente por *T. mentagrophytes*, *T. verroscum* y *T. rubrum*

CUADRO CLÍNICO: Es exclusiva de varones adultos, afecta las zonas de la barba o cuello, se caracteriza por pústulas foliculares aisladas o agrupadas de evolución crónica y que deja alopecia cicatrizal. El pelo en tales áreas puede ser quebradizo y sin brillo surgiendo entonces alopecia en porciones centrales.

DIAGNÓSTICO: Por medio de cuadro clínico y por montaje de las muestras con KOH al 10%.

TRATAMIENTO: Los pelos infectados deben depilarse manualmente y aplicar griseofulvina en forma de micropartículas finas, 500 mg al día.

GRANULOMA TRICOFÍTICO.

DATOS EPIDEMIOLÓGICOS: Suele depender de *T. rubrum*, aunque el caso original fue de *T. violaceum*.

CUADRO CLÍNICO: Se manifiesta por nodulos de consistencia firme, únicos o múltiples, casi siempre confluentes, pueden disponerse en placas eritematoscamosas o verrugosas. La evolución es crónica y poco dolorosa. En las mujeres se localiza en las piernas y hay antecedente de rasurado de las mismas, en otros sitios casi siempre hay uso previo, prolongado de glucocorticoides.

DIAGNÓSTICO: Por medio de examen directo de KOH al 10% de las muestras.

TRATAMIENTO: Aplicación de griseofulvina en forma de micropartículas finas por vía tópica, 500 mg por día.

NOTA: En casos de intolerancia a la Griseofulvina, puede utilizarse Terbinafina, 125 mg al día o ketoconazol, 33 a 66 mg/kg de peso corporal al día, es un tratamiento más prolongado, se recomiendan los imidazoles sobre todo en los inmunodeprimidos.

LEVADURAS

Candidosis

DEFINICIÓN: Micosis primaria o secundaria ocasionada por levaduras endógenas y oportunistas del género *Candida*, especialmente *Candida albicans*. Las manifestaciones clínicas son localizadas, diseminadas o sistémicas; pueden afectar piel, mucosas, estructuras profundas y órganos internos. Las alteraciones histopatológicas varían desde inflamación mínima hasta supuración o granuloma. La evolución es aguda, subaguda o crónica.

DATOS HISTÓRICOS: Hipócrates (460 a 377 a.C.) describió placas blanquecinas en la boca en pacientes debilitados y en recién nacidos. Galeno (130 a 200 a.C.) las observó en niños enfermos.

En 1842, Gruby describió este hongo, los presentó ante la Academia de Ciencias de París como "el verdadero muguet de los niños", así mismo, postuló la transmisión intrauterina y comunicó la primera candidosis. En 1875, Haussmann notó el vínculo entre candidosis vaginal de la madre y bucal del recién nacido.

En 1890, Schmorl informó la afección mucocutánea; en 1904, Dubendorfer, la inguinal, y en 1907, Jacobi, la cutánea.

ETIOPATOGENIA: Los agentes causales son levaduras anascosporadas, cuyo estado anamorfo pertenece a la subdivisión Deuteromycota, y su estado teleomorfo puede ser Ascomycotina o Basidiomycotina. Se han descrito 81 especies, de las cuales al menos 7 causan enfermedades en seres humanos. El género *Candida*, en sentido amplio es dimorfo.

Clase Blastomycetes
Familia Cryptococcaceae
Candida albicans
C. guilliermondii
C. parapsilosis
C. krusei
C. tropicalis
C. pseudotropicalis
C. stellatoidea

ETIOLOGÍA: El agente más frecuente es *Candida albicans*.

Puede tener diversas manifestaciones clínicas, tanto mucocutáneas, cutáneas, alérgicas, como generalizadas, pero en este trabajo sólo abordaremos las mucocutáneas y cutáneas. A continuación se listan dichas manifestaciones:

A. Afeción mucocutánea

1. Bucal:

Muguet
Glositis
Estomatitis
Queilitis
Boqueras

2. Vaginitis y balanitis

3. Perianal

B. Afeción cutánea

1. Candidosis intertriginosa
2. Paroniquia y onicomicosis
3. Eritema por pañal
4. Granuloma por *Candida*

A. AFECCIÓN MUCOCUTÁNEA

1. Bucal:

Muguet (algodoncillo)

CUADRO CLÍNICO: Presencia de una pseudomembrana de color blanco cremoso a grisáceo cubre lengua, paladar blando, mucosa bucal y otras superficies bucales. La membrana que se observa en la mucosa está compuesta de masa de hongos, tanto en la forma micelial, como de levadura. Con frecuencia, las placas membranosas se quiebran y tienen el aspecto de leche cuajada. La membrana es bastante adherente a la mucosa principal y su extirpación deja ver una base roja rezumante.

Glositis

CUADRO CLÍNICO: Se presenta un cuadro conocido como "Lengua pilosa negra". Esta enfermedad se caracteriza por hipertrofia de las papilas de la lengua y color negro-verdusco debido a la presencia de *Candida*.

Estomatitis

CUADRO CLÍNICO: Predomina en ancianos y a menudo se relacionan con prótesis dentarias, se presentan lesiones erosivas y dolorosas por debajo de la placa.

Queilitis

CUADRO CLÍNICO: Se observan grupos dispersos de erosiones satélites, atroficas, granulares, eritema y fisuras en el labio.

Boqueras

CUADRO CLÍNICO: Se manifiesta por un triángulo de base externa en las comisuras bucales constituido por eritema y fisuras.

TRATAMIENTO: Los colutorios con bicarbonato son eficaces, económicos y fáciles de aplicar; en caso de usarse prótesis dentarias, estas también deben de colocarse en esta misma solución o cicloheximida a 2%.

2. Vaginitis

CUADRO CLÍNICO: Se presenta inflamación, secreción de blanquecina a amarilla, espesa y grumosa; prurito intenso, sobre todo premenstrual y extensión de las lesiones a vulva, perineo y área inguinal. La mucosa vaginal muestra placas blanquecinas, amarillentas o pseudomembranosas, en ocasiones hay olor fétido.

Balanitis

CUADRO CLÍNICO: La piel del glande y corona se encuentra macerada, con placas blanquecinas, vesículas o pústulas y erosiones secundarias.

3. Perianal

CUADRO CLÍNICO: Es común en lactantes, en un principio, las lesiones están bien definidas, placas de color rojo opaco que coalescen y se extienden, con un borde irregular. Se forman vesículas que después se rompen para dejar un borde andrajoso, es común que las lesiones se extiendan hasta las nalgas y parte interna de los muslos, algunas ocasiones afecta genitales, parte inferior del abdomen. El prurito es mínimo en los lactantes sanos. En el caso de los adultos el prurito es grave y toda el área presenta dermatitis con inflamación intensa.

B.- AFECCIÓN CUTÁNEA

Candidosis intertriginosa

CUADRO CLÍNICO: El intertrigo se presenta más comúnmente en axilas, ingle, pliegues inframamarios, interglúteos, espacios interdigitales, pene y testículos, así como en ombligo. Las lesiones son muy características y bien definidas como áreas de "piel escaldada", que exudan con base eritematosa y borde festonado. La lesión está rodeada de erupciones "satélites", las cuales se desarrollan en forma de vesículas discretas, pústulas, o ampollas que se rompen y dejan una superficie desnuda, con bordes erosionados y rasgados. Estas se desarrollan e imitan a las lesiones originales.

TRATAMIENTO: En regiones genitales, pliegues y zonas del pañal se aplican fomentos con vinagre o ácido acético, una a dos cucharadas diluidas en un litro de agua. De los antimicóticos locales clásicos, que son útiles, se encuentra el vioformo en crema a 3%, la nistatina en forma de unguento, gotas, gel o suspensión, de 200,000 a 500,000 U/ml dependiendo la presentación se seleccionan según la localización y se aplican o administran dos a tres veces al día durante siete días a varias semanas.

Paroniquia y onicomicosis

CUADRO CLÍNICO: Las lesiones se caracterizan por el desarrollo de inflamaciones enrojecidas, dolorosas y se extienden hasta un centímetro fuera de la orilla paroniquial. En la paroniquia crónica es invadida la uña. En la onicomicosis que resulta, la placa ungueal cambia de color, se vuelve engrosada, endurecida y presenta estrias o surcos. La uña no se hace fríasil como sucede en la tinea unguium de etiología dermatófila.

TRATAMIENTO: Itraconazol, 100 mg al día por vía oral, es eficaz sobre todo en paroniquia y onicomicosis, se administra al menos seis meses.

Eritema del pañal

CUADRO CLÍNICO: Esta es una secuela común de la Candidosis bucal y perianal del recién nacido; la colonización inicial provoca dermatitis primaria irritante. Puede ir seguida de invasión de la epidermis por el hongo y el trastorno se agrava extendiéndose con frecuencia.

TRATAMIENTO: Con secado y la aplicación de clotrimazol en pomada, después de cada cambio de pañal o después cada baño.

Granuloma por *Candida*

CUADRO CLÍNICO: Las lesiones son muy distintas de las otras formas de Candidosis cutánea y mucocutánea. Se describen como papulas vascularizadas primarias cubiertas de una costra gruesa, adherente de color pardomarrillento. Estas pueden convertirse en callosidades o protrusiones de hasta 2 cm de largo.

TRATAMIENTO: El ketoconazol, 200 mg al día por vía oral, se recomienda ante afección de piel, mucosas y uñas, o en formas crónicas y profundas.

En formas profundas y sistémicas se utiliza anfotericina B, o 6 mg/kg de peso corporal como dosis total, sin sobrepasar una dosis total de 1 a 3 gr combinado con 5-fluorocitosina, 150 mg/kg por día.

DIAGNÓSTICO

Estudio micológico

Para el cultivo es indispensable que sólo se examinen las muestras recién obtenidas, sembrándolas por picadura en medios habituales como lo puede ser Sabouraud.

A temperatura ambiente los microorganismos crecen de forma rápida, de 24 a 48 horas, aparecen colonias lisas, blandas, pastosas, brillantes de color blanco o ligeramente beige, con el tiempo se hacen plegadas, rugosas o membranosas y a simple vista se observa el micelio sumergido.

La presencia de filamentos es característica del género *Candida*, su producción se estimula en medios sin carbohidratos, como el PZ (papa - zanahoria). Para distinguir *Candida albicans* de las otras especies, se practican las pruebas siguientes:

Filamentación en suero:

Se toma un inóculo de la colonia y se coloca en 0.5 ml de suero, se incuba a 37°C, en 2 a 4 hrs. Se producen tubos germinativos en *C. albicans* o *C. stellatoidea*.

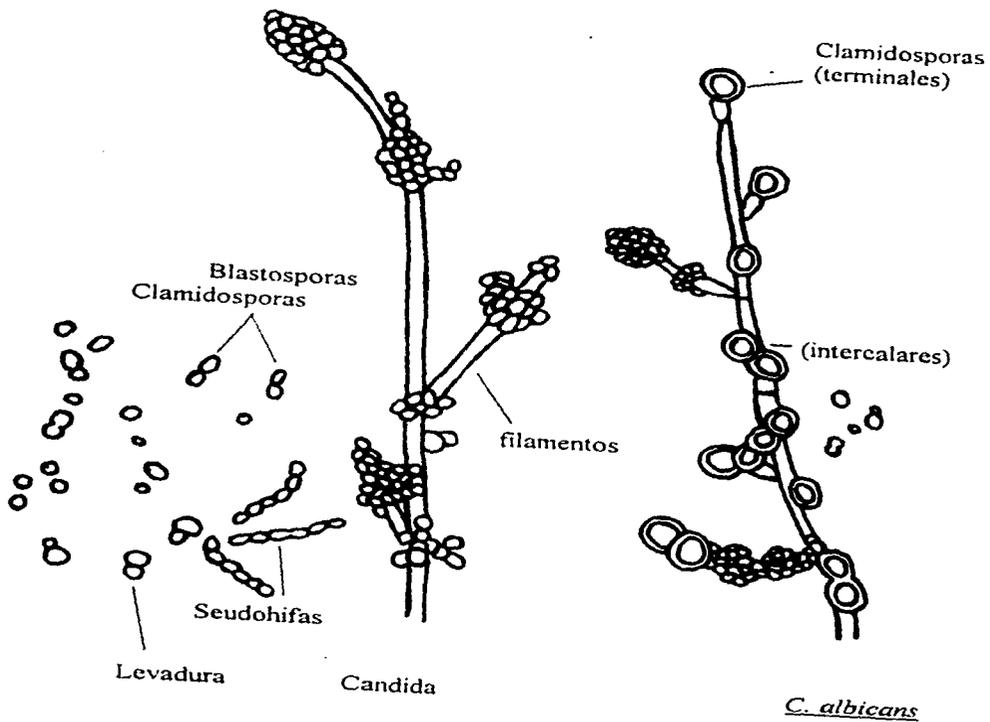
Resiembra de los cultivos en agar harina de maíz, agar PZ, agar arroz con Tween 80:

Se hacen algunas estrias en el fondo del tubo y luego una estria longitudinal profunda, en 24 a 48 horas se toma un fragmento de la gelosa donde se aprecie el desarrollo de filamentos en profundidad. Se observa como se producen rápidamente pseudohifas y racimos de blastosporas en verticilo y sobre todo las clamidosporas características de la especie *C. albicans* que son grandes, esféricas, de 8 a 12 µm de diámetro, de pared gruesa y con distribución intercalar o terminal.

El examen directo se practica a partir de exudado, esputo, escamas, raspado de uñas o centrifugado de orina. Se efectúa con KOH, solución de lugol o fisiológica. También se puede realizar frotis y teñirse con Gram, azul de metileno, PAS, Giemsa o Wright. Se observan abundantes esporas redondeadas u ovales de 2 a 4 µm de diámetro, blastosporas, pseudohifas, o hifas verdaderas.

GÉNERO CANDIDA

ESQUEMAS



La identificación de las especies se basa en sus características fisiológicas, como fermentación (zimograma) y utilización (auxonograma)

Características fisiológicas para la identificación de *Candida*

	<i>C. albicans</i>	<i>C. stellatoidea</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
Morfología:				
Micelio o pseudomicelio	+	+	+	+
Clamidiosporas	+	+/-	-	-
Filamentación en suero a 37°C por 4 Hrs	+	+/-	-	-
Auxonograma:				
Glucosa	+	+	+	+
Maltosa	+	+	+	+
Sacarosa	+	-	+	+
Galactosa	+	+	+	+
Lactosa	-	-	-	-
Rafinosa	-	-	-	-
Zimograma				
Glucosa	+	+	+	+
Maltosa	+	+	+	-
Sacarosa	+/-	-	+	-
Galactosa	+	-	+	-
Lactosa	-	-	-	-
Rafinosa	-	-	-	-
Otros caracteres				
Ureasa	-	-	-	-
Red. tetrazolio	Blanco	Rosa	Violeta	Rosa
Res. Actidione	+	+	-	-
Utilización KNO ₃	-	-	-	-

Criptococosis

DEFINICIÓN: Micosis oportunista causada por una levadura encapsulada *Cryptococcus neoformans*, de origen exógeno, se adquiere por vía respiratoria y es pulmonar en 90%, puede afectar cualquier viscera, musculo, hueso, piel y mucosas, pero tiene afinidad particular por el sistema nervioso central. La evolución es aguda, subaguda o crónica. La diseminación ocurre en pacientes debilitados o con inmunodeficiencia.

DATOS HISTÓRICOS: En 1894 y 1895, Busse y Buschke, describieron el primer caso en seres humanos con lesiones cutáneas y óseas. En 1901 Vuillemin clasificó a la levadura aislada en estos pacientes en el género *Cryptococcus* y llamó *C. neoformans* al hongo descubierto.

En 1951, Emmons aisló *C. neoformans* del suelo y posteriormente de excretas de palomas y otras fuentes.

En 1955, Baker y Haugen demostraron la presencia de la capsula.

En 1955, González Ochoa hizo mención del primer caso en México, tanto en forma generalizada, y posteriormente Lavalle una forma mucocutánea.

ETIOPATOGENIA: El agente causal es una levadura encapsulada, no micelial, de 20 a 30 μm de diámetro, *C. neoformans*, cuyo estado perfecto o teleomorfo es el Basidiomycete, que tiene dos variedades *neoformans* y *bacillispora*.

Subclase	Blastomycete
Orden	Cryptococcales
Familia	Cryptococcaceae
Estado anamorfo	<i>Cryptococcus neoformans</i>
Orden	Ustilaginales
Estado teleomorfo	<i>Holobasidium neoformans</i>

ETIOLOGÍA: Como ya se mencionó antes, se trata de *Cryptococcus neoformans* en estado anamorfo.

CUADRO CLÍNICO: Tiene diferentes manifestaciones clínicas, pero para el presente trabajo solo se tomarán en cuenta las de tipo cutáneo.

Las manifestaciones cutáneas son únicas o múltiples, en cualquier localización, pero predominan en cara, cuello y tórax. La morfología es muy variada, hay papulas, papulopústulas acneiformes, furunculoides o moluscoides, nódulos, placas verrugosas o zonas de hipodermatitis, incluso con vesículas, lesiones purpúreas o úlceras con bordes violáceos y dolorosos a la palpación que pueden llegar a tejido celular y están cubiertas de costras o escaras, cicatrizan espontáneamente o persisten con tendencia a fistulizar. Por lo general hay fiebre y poco ataque al estado general, la evolución es crónica, lenta, con remisiones parciales.

DIAGNÓSTICO

Estudio micológico

Para el examen directo se toma exudado de la lesión, se realiza con tinta china diluida en agua (1:5) y el criptococo se demuestra fácilmente como levaduras de 4 a 8 μm de diámetro, rodeadas por una cápsula mucosa de 1 a 10 μm de espesor y que no se colorea con la tinta china y semeja un espacio claro, ocasionalmente hay pseudofilamentos.

También es útil el examen directo con KOH ayuda a destruir otros microorganismos, células y artefactos que pueden confundirse con la levadura

Los cultivos deben de realizarse a 32 a 37°C en medio Sabouraud u otros medios de cultivo sin cicloheximida (actidione) que inhibe su crecimiento Para evitar contaminaciones se usan medios con antibióticos antibacterianos

En primocultivos las colonias se desarrollan en 48 hrs, son blancas o amarillentas, lisas y brillantes, en cinco a ocho días toman aspecto mucoso, se oscurecen y recuerdan el aspecto de leche condensada

Al examen microscópico de la colonia con tinta china se observan levaduras con su capsula. Si la cepa produce capsulas pequeñas se estimula su producción mediante siembra en agar chocolate e incubación a 37°C en atmósfera de CO₂

Cryptococcus no fermenta los azúcares, asimila dextrosa, galactosa, maltosa y sacarosa. Es positivo para ureasa. *Cryptococcus neoformans* se diferencia de otras levaduras no patógenas del género *Cryptococcus* por que utiliza galactosa pero no lactosa ni nitrato de potasio, crece a 37°C pero muere a 40 a 42°C

	<i>Cryptococcus</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
	No hay falsa filamentación	No hay falsa filamentación
Fermentación	-	-
Ureasa	+	+
Inositol	+	+
Utilización:		
Nitratos		-
Maltosa		+
Sacarosa		+
Lactosa		-
Galactitol		+
CreCIMIENTO a 37°C		+

TRATAMIENTO: Anfotericina B, 20 mg por día durante 10 semanas o dosis pequeñas y progresivas cada dos a tres días, con dosis total de 1 a 3 gr., es necesario hospitalizar al paciente durante su tratamiento

Por vía oral, 5-fluorocitosina, 150 mg por kg. al día en cuatro dosis, se observa resistencia rápida a este medicamento.

Por vía oral se administra ketoconazol, 200 a 400 mg al día. El itraconazol, 200 a 200 mg al día por periodos mayores a un mes

Con el fin de ampliar y actualizar el tema de *Dermatofitos*, se habla sobre su posible tratamiento

TRATAMIENTO.

El tratamiento contra las infecciones por hongos, data de cientos de años, pero la terapeutica efectiva contra las micosis inicia a principios del presente siglo

En 1903 Beurmann y Gougerot utilizo el yoduro de potasio para tratar la Esporotricosis En 1907 Whitfield utilizo *compuestos oleosos* contra micosis superficiales En 1940 la *sulfonamidas* fueron reportadas por sus propiedades fungistáticas, con una eficiencia limitada contra la Paracoccidiosis

En 1944 los benzimidazoles fueron los primeros azoles descubiertos, con actividad antimicótica Los azoles se pueden subdividir en imidazoles y triazoles

En 1951 Hazel y Brawn descubrieron que el polieno llamado *nistatina* tenia un efecto antimicótico

En 1952 los benzimidazoles fueron sustituidos por los clorimidazoles en forma de cremas con un buen efecto antimicótico

En 1956 Gold et al reportaron que el polieno llamado Anfotericina B , tenia un efecto contra las micosis sistemicas

En 1958 se descubrio que la griseofulvina que es un antimicotico oral es efectivo Ademas en forma tópica se vio que actuaba bien, eliminando las onicomicosis y las dermatomicosis

En 1969 se introducen los imidazoles, clotrimazoles y los miconazoles Le sigue en 1974 los econazoles, para 1977 se introduce el ketoconazol que es el antimicotico mas usado actualmente

En los años 80's se introducen los triazoles que incluyen al itraconazol y fluconazol

Clasificación de agentes antifúngicos

POLIENOS	MISCELÁNEOS	AZOLES	ALILAMINAS	MORFOLINAS
SISTÉMICOS				
Anfotericina B Nistatina	Flucitocine Griseofulvina Yoduro de potasio	IMIDAZOLES Miconazol Ketoconazol TRIAZOLES Itraconazol Fluconazol	Terbinatina	Amofollina
TÓPICOS				
Anfotericina B Nistatina Natamicina	ESPECÍFICOS Ciclopiroxolamina Haloprogin Tolnaftato Ciloquinol NO ESPECÍFICOS Solución de Whitfield Violeta de genciana Tiosulfato de sodio Propilen glicol	IMIDAZOLES Bifonazol Clotrimazol Econazol Miconazol Ketoconazol Oxiconazol Tioconazol Sulconazol TRIAZOLES Tereconazol	Terbinafina Naftifine	Amofollina

• POLIENOS

Los polienos se caracterizan por ser un macrólido unido a un éster o lactona. Existen aproximadamente 87 diferentes polienos con un efecto antibiótico y antimicótico. De los cuales solo tres tienen efecto clínico significativo que son: nistatina, anfotericina B y natamicina.

A) **Nistatina:** Producida por el *Streptomyces noursei* y *Streptomyces albidus*.
En forma tópica es efectivo contra la candidosis cutánea.

B) **Anfotericina B:** Producido por el *Streptomyces nodosus*.
Se indica en la Candidosis, Aspergilosis, Histoplasmosis, Blastomicosis, Coccidiomicosis, Mucormicosis, Esporotricosis y Paracoccidiomicosis, (micosis sistémicas).

El mecanismo de acción de los polienos es: se une irreversiblemente el fármaco con el ergosterol, el cual es el esteroles principal de las membranas de los hongos. Lo que causa alteraciones en la permeabilidad de las membranas de las células fúngicas y posteriormente mueren.

• MISCELÁNEOS

A) **Flucitocine:** Es una pirimidina fluorinada, que generalmente es bien absorbida.

Esta droga es metabolizada y excretada principalmente por la orina.

Este fármaco se usa en combinación con la Anfotericina B en micosis sistémicas, como lo son: Criptococosis, Candidosis y Aspergilosis.

El mecanismo de acción es, mediante el efecto que tiene el Flucitocine sobre la enzima que desamina a la citocina que contiene el hongo, lo que le causa una inhibición en la síntesis del RNA, que a su vez provoca la muerte del hongo.

B) **Griseofulvina:** Fue aislada del producto metabólico del *Penicillium griseofulvum*.

En 1958 se demostró su efectividad contra las dermatomicosis.

La griseofulvina es metabolizada por el hígado y excretada hasta en un 85% por heces, aun después de cinco días.

Está indicado en las dermatofitosis, tiñas del cabello, no es efectivo contra ninguna *Candida sp.*, también se le ha visto que tiene un efecto antiinflamatorio e inmunomodulador, auxiliar en condiciones reumáticas.

Está contraindicado en pacientes con alteraciones hepáticas o en casos de hipersensibilidad al fármaco. En animales se ha visto un efecto teratogénico por lo que está contraindicado en niño y mujeres embarazadas.

El mecanismo de acción de la griseofulvina es, inhibiendo la síntesis de ácidos nucleicos y deteniendo la reproducción celular en la fase de metafase.

• MISCELÁNEOS; AGENTES ANTIFÚNGICOS ESPECÍFICOS Y TÓPICOS.

A) **Ciclopiroxolamina:** Es una hidroxipiridona, que no tiene relación con la familia de los azoles o cualquier otro agente antifúngico. Está indicado en dermatofitosis, levaduras y *Actinomyces*.

Su mecanismo de acción es produciendo una interferencia primaria con productos que requiere para la síntesis de la membrana celular.

B) Tolnaftato: Es un antimicótico sintético de tiocarnato, descubierto e introducido en 1962

Actúa contra cualquier dermatofito, pero no tiene efecto sobre ninguna especie de *Candida*. Está indicado en la tiña pedis, tiña cruris, tiña manus.

El mecanismo de acción es inhibiendo la esqualen hipoxidasa, con una acumulación del escualeno en la célula intoxicándola.

• MISCELÁNEOS; AGENTES ANTIFÚNGICOS INESPECÍFICOS Y TÓPICOS.

A) Ungüento de Whitfield: Contiene 12% de ácido benzoico y 6% de ácido salicílico. Este compuesto tiene un efecto fungistático. Se usa para eliminar la dermatomicosis.

No tiene un mecanismo de acción determinado, aunque tiene un efecto queratolítico, causando descamación y queratinización epidérmica.

B) Tintura de Castellani: Es un compuesto de acción antibacteriana compuesto de tintura de carbolfucina, se uso en el eccema seborreico en el tiña pedis o pie de atleta interdigital y en la tiña imbricada del trópico.

C) Violeta de genciana: Es usada para tratar las candidiasis cutáneas y mucocutáneas. Tiene efecto antibacterial y antimicótico.

D) Ácido undecelénico en sal de sodio, calcio o zinc, este compuesto tiene efecto fungistático y astringente.

E) Solución de Propilen glicol-urea-ácido láctico: Con actividad antimicótica y queratolítica. Es útil en el tratamiento de Onicomosis, dermatomicosis, infecciones por bacterias, mohos y levaduras. Es eficaz contra la tiña versicolor.

• AZOLES.

A) Clotrimazol: Imidazol de amplio espectro, útil para tratar las dermatomicosis y las candidiasis, orofaríngea y vaginal.

No está indicado en las micosis sistémicas, porque la administración oral o parenteral, induce la producción de enzimas microsomales hepáticas, con lo que sufre el fármaco una degradación acelerada y por tal motivo tiene un bajo efecto antifúngico.

B) Nitrato de Miconazol: El modo de acción es similar a otros azoles.

El miconazol es metabolizado por el hígado y eliminado en la orina. La forma farmacéutica en que se presenta es en cremas, óvulos, soluciones y ungüentos.

C) Ketoconazol: Fue el segundo antimicótico de amplio espectro después de la Anfotericina B. El ketoconazol se metaboliza en el hígado.

El ketoconazol puede atravesar la placenta y provocar graves riesgos al feto, ya que se ha demostrado que es embriotóxico y teratogénico en ratones.

Se utiliza para dermatofitos, onicomosis, micosis sistémicas (Histoplasmosis, Coccidioimicosis, Paracoccidioimicosis, Cromomicosis) y Candidiasis en una dosificación de 200 a 400 mg. al día.

El mecanismo de acción de los azoles es, se une irreversiblemente el fármaco con el ergosterol, el cual es el esterol principal de las membranas de los hongos. Lo que causa alteraciones en la permeabilidad de las membranas de las células fúngicas y posteriormente mueren.

Con la introducción de nuevos antimicóticos como la terbinafina, itraconazol, bifonazol y fluconazol Útiles en el tratamiento de micosis superficiales y profundas, la terapéutica antifúngica, tiene una mejor perspectiva a futuro, como a continuación se expone

A) Terbinafina: Este medicamento es de la clase alilaminas. Es activa por vía oral y tópica. Se ha probado su actividad in vitro contra un amplio rango de microorganismos, dermatofitos, mohos, levaduras

La dosificación que se ha probado efectiva contra dermatofitos es de 250 mg / día / por 1 a 2 meses, con excelentes resultados

Por lo que la terbinafina es un buen antimicótico, con buena tolerancia y pocos efectos secundarios, sobre todo es un tratamiento, corto es eficaz contra tiña pedis y tiña unguium

El mecanismo de acción del fármaco, consiste en inhibir la enzima escualen hipoxidasa de la membrana del hongo. El bloqueo enzimático es resultado de la acumulación intracelular del escualeno, lo que causa alteraciones irreversibles de la membrana fúngica

B) Bifonazol: Es un derivado imidazólico, con gran actividad antimicótica, contra dermatofitos, mohos, hongos demateaceos, levaduras, hongos dimorfoicos

Presenta el mismo mecanismo de acción de esta familia de medicamentos, pues también interfiere con la síntesis de esteroides a nivel de la membrana celular de los hongos. Pero la principal diferencia es su mayor permanencia en la piel, hasta 50 y 60 horas en comparación con las 30 a 35 horas que permanece el miconazol o el clotrimazol en piel

La mejor vía de administración es la tópica, aunque también se está utilizando por vía oral

Los resultados contra la: tiña corporis, tiña cruris, tiña pedis, tiña manus, Pitiriasis versicolor, Candidosis cutánea, otomicosis, etc. es del 95% al 100%. Incluso en la Onicomicosis llega a curar en un 85 %

C) Fluconazol: Es un fármaco de la familia de los azoles. Ha sido utilizado en la eliminación de la candidiasis de genitales, dermatomicosis, con una sola toma semanal, de 150 mg / 2 a 4 semanas

Se usa en micosis profundas y en micosis oportunistas en pacientes con SIDA

Su potencia es comparada con la Anfotericina B, pero sin los efectos secundarios de la misma

D) Itraconazol: Es un fármaco de la familia de los azoles. Su mecanismo de acción es similar a otros azoles,

Se utiliza para eliminar dermatomicosis, candidosis, micosis superficiales, micosis profundas y micosis oportunistas.

Se usa de 100 a 200 mg / día / 2 a 4 semanas, con una mejoría después de la primera semana y una curación total al término del tratamiento

**OBJETIVOS
E
HIPOTESIS**

OBJETIVOS GENERALES.

1. - Instalar un laboratorio de micología en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (FES-Z)
2. - Dar a futuro servicio de laboratorio micológico, a la comunidad universitaria y público en general.
3. - Crear un cepario y un museo de hongos de importancia medica más comunes en el área metropolitana de la ciudad de México (dermatofitos)
4. - Producir material de apoyo.

OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Implementar, manuales de procedimientos para la instalación de un laboratorio
2. Formar, organizar y dar seguimiento de un cepario de dermatofitos más comunes en el área urbana y suburbana de la ciudad de Mexico y de influencia de las clinicas multiprofesionales
3. Generación de material de apoyo de dermatofitos para las áreas afines, para los módulos que manejan hongos (MG-II, Biología Médica, Agresión y Defensa I y Microbiología para la carrera de Medicina 1º y 2º año), como los son diaporamas, laminillas fijas, cultivos, etc

HIPÓTESIS.

1. Con el presente trabajo se pretende dar las partes para la instalación de un laboratorio de micología en la FES-Z.
2. En el laboratorio de micología en la FES-Z. se espera producir material de apoyo, como lo es un cepario, se podrá dar un servicio de micología a la comunidad de influencia y con esto crear fuentes de ingreso para la universidad, así como generar material de apoyo tanto teórico (manuales de tinciones, medios de cultivo) como práctico, cepas para el trabajo de laboratorios de estudio e investigación.

MATERIAL

MATERIAL	CANTIDAD
• Asas micológicas	10 pzas.
• Asas bacteriológicas	2 pzas.
• Bolsas de plástico calibre 200 y 300	1Kg de c/u
• Bisturios	3 pzas
• Cajas Petri marca PYREX o KIMAX de 100X15MM	200 pzas
• Cubrebocas	1 paquete
• Cubreobjetos	20 cajas
• Mecheros Fisher	4 pzas
• Mecheros Bunsen	2 pzas
• Lámparas de L. U. V.	3 pzas
• Estanteria	4 pzas de 250X100 cm.
• Gasas	1 paquete
• Pinzas	5 pzas
• Guantes	10 pares
• Portaobjetos	20 cajas
• Varillas en "V"	100 pzas
• Tubos de ensayo con tapa de rosca de baquelita de 18X150	3 cajas de 100 pzas
• Tubos de ensayo con tapa de rosca de baquelita de 13X100	3 cajas de 100 pzas
• Tubos de ensayo sin tapa de 18X100	3 cajas de 100 pzas
• Tubos de ensayo sin tapa de 13X100	3 cajas de 100 pzas
• Matraces de Erlenmeyer de 300, 500 y 1000 ml.	10 pzas de c/u
• Pipetas de 1, 5, 10 ml.	10 de c/u
• Balanza granataria marca OHAUS, capacidad 2610 gr	1 pza
• Microscopio óptico	1 pza

EQUIPO

- 1 Autoclave marca "AESÁ", modelo CV-250, voltaje 127 VCA, ciclos 60, Hecho en México, NOM-1-10644
- 1 Refrigerador marca AMERICAN tipo RC, modelo RC 300
- 1 Placa de calentamiento con agitación marca LINDBERG modelo 53166, watts 530, volts 127
- 1 Horno marca DGESIC, modelo HS, volts 127, ciclos 50/60
- 1 Incubadora marca RIOSA, modelo EC, serie ECME, volts 127, amp 121-A, ciclos 60/70, Temperatura a 37°C
- 1 Campana de extracción marca SQUARE Hecho en México, clase 2510, tipo FGI, pero idealmente
- 1 Campana de flujo laminar marca Purifix Clean Bench, modelo LABCONCO.

REACTIVOS

Azul de algodón de lactofenol
Azul de anilina corregido.

MEDIOS DE CULTIVO

Agar dextrosa de Sabouraud

MÉTODOS

MÉTODOS:

1a. PARTE: REQUERIMIENTOS PARA INSTALAR UN LABORATORIO DE MICROLOGÍA MÉDICA:

se debe realizar la siguiente investigación bibliográfica

- a) Acopio de bibliografía referente
- b) Investigación de la documentación, tramites de registros, documentación que acredita al profesional a cargo, instalaciones, mobiliario, equipo e instrumental, reactivos, etc ante las diferentes instituciones gubernamentales Para la posterior organización de un laboratorio de micología médica
- c) Validación de medios de cultivo, utilizados en el laboratorio de micología
- d) Manual de procedimientos y bioseguridad
- e) Recopilación de textos y artículos referentes, a dermatofitos con el fin de actualizar los conocimientos
- f) Aislar e identificar los dermatofitos mas frecuentes, en el area de influencia de la FES-Z y hacer un cepario
- g) Intercambiar muestras de dermatofitos con otras instituciones para de esta manera tener un cepario más completo para una mejor consulta
- h) Recopilación de muestras de personas de tipo piel, pelo, uñas, frotis de area genital

2a. PARTE: DESARROLLO EXPERIMENTAL EN EL LABORATORIO.

TOMA Y PREPARACIÓN DEL MATERIAL OBJETO DEL ANÁLISIS

Con la toma del material se puede influir ya de modo decisivo en el resultado del análisis las muestras contaminadas por gérmenes del medio ambiente dan resultados falsos positivos. Esto ocurre particularmente cuando se remiten uñas extraídas enteras para su análisis, o cuando se analizan tallos pilosos cortados en lugar de raigones, o escamas cutaneas gruesas y costras

Limpieza previa: La limpieza previa y diaria de acuerdo con el lugar de origen. El primer paso es la limpieza mecánica, eliminándose escrupulosamente cualquier deposito, a fin de dejar al descubierto el lugar previsto para la toma de material, al margen del fenomeno patológico sospechoso y junto al tejido todavia sano. Sin embargo una impregnación demasiado intensa, de la muestra con el alcohol dificulta el crecimiento del hongo. Los materiales, que son objeto del análisis micológico son principalmente lo siguientes

PIEL

Obtención del material: Primero se fricciona el foco sospechoso con una torunda de gasa (no emplear algodón) o con celulosa, impregnadas ligeramente con isopropanol del 70%, con la intensidad que permita la región de la piel afectada. Se desprenden y se desechan las escamas gruesas, costras y partículas de piel macerada, hasta que se encuentren al descubierto las escamas finisimas al margen del foco sospechoso. De estas se raspan y recogen con un bisturi, una cuchara cortante estériles unas 30 a 40 partículas de aproximadamente 1 mm cada una

Para recoger las partículas es apropiada la cara interior estéril de la tapa de la caja petri. Con ello se dispone del material necesario tanto para el análisis microscópico como para el cultivo.

PELOS

Obtención del material: En caso de sospecharse una infección del pelo por dermatofitos, han de extraerse con cuidado con una pinza de depilar los raigones pilosos del margen de los focos. Se recomienda un número de 20 a 40. Una parte de ellos se analiza microscópicamente en solución de potasa, el resto se siembra en medios de cultivo

UÑAS

Obtención del material: Se procede a la toma de la muestra de la uña. Las muestras se toman en áreas en las que se encuentra tejido patológico en vecindad inmediata con tejido sano o directamente en el medio de cultivo.

Paroniquia: En casos de paroniquia, el material de muestra se toma preferiblemente con un gancho micológico estéril o con un asa de platino abierta estéril.

FROTIS GENITAL

Vulva: Para el examen se procede a pasar por la vulva un portaalgodón estéril o mejor aun una torunda de gasa para obtener el material, que se extiende inmediatamente sobre el medio de cultivo. Si se comprueban en los órganos genitales exteriores manifestaciones patológicas que hacen sospechar una dermatomicosis, ha de seguirse la marcha indicada en el apartado "piel".

Pene: En el caso del órgano genital masculino, el cultivo "por calco" es el metodo de elección. Un medio de cultivo preparado se aprieta unas tres veces contra el glande, abarcandose tambien el prepucio. Si en el cuerpo del pene se observan impurezas que hacen sospechar una dermatomicosis, debe procederse en la forma descrita bajo "piel" (8).

PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO

EXAMEN DIRECTO

Es el más común de los procedimientos para la observación microscópica de los hongos, tanto a partir de productos biológicos como de su desarrollo en medios de cultivo. A través del examen directo se establece el diagnóstico en la mayoría de las micosis, ya que la morfología de cada hongo en estado parasitario es, en general, muy característica. Es importante evitar los errores de interpretación cuando se confunden las estructuras fúngicas con artefactos diversos. (14).

Observación microscópica directa de productos patológicos.

Cuando éstos son líquidos, basta agregar una gota de KOH al 15% en un portaobjetos y una o dos gotas de producto biológico por estudiar; se cubre la preparación con un cubreobjetos y se observa directamente al microscopio. En ocasiones se les puede agregar a la preparación una gota de algún colorante simple, para colorear y precisar los elementos fúngicos.

Cuando los elementos patológicos son pelos o escamas, se depositan sobre el portaobjetos dos gotas de KOH a una concentración de 15 a 20% o de lactofenol de Amman, para aclarar las estructuras tisulares y destacar las células fúngicas. Se deja actuar el aclarante por 5 minutos y se observa al microscopio. Se puede preparar una solución combinando 80 ml de KOH con 20 ml de glicerina, para evitar la precipitación rápida de potasa y conservar las preparaciones durante un periodo mayor.

La técnica del examen directo de escamas con cinta adhesiva transparente, para el diagnóstico, consiste en aplicar la superficie adhesiva, presionando un poco sobre las lesiones discrómicas, después se pega la cinta sobre un portaobjetos y se observa directamente al microscopio. También se puede agregar al portaobjetos antes de pegar la cinta una gota de azul policromo para teñir los elementos fúngicos.

Observación microscópica de cultivos

Si se trata de cultivos levaduriformes, basta con tomar un fragmento de colonia y disgregarla en una o dos gotas de agua, solución salina o algún colorante, para observar la preparación con el microscopio, si se trata de colonias filamentosas, hay que tomar con el asa micológica un fragmento del centro de la colonia y dilacerarlo con la ayuda de una aguja de disección, se agrega una o dos gotas de azul de algodón, se deposita el cubreobjetos y se observa al microscopio

FROTIS E IMPRONTA

Se realizan cuando la observación de los elementos fúngicos no es clara siendo, por tanto, necesario teñir los hongos para facilitar su observación

Las improntas se elaboran aplicando la superficie del portaobjetos sobre las lesiones por estudiar, ejerciendo una presión moderada. Cuando se trata de biopsias, el material se aplica sobre varios puntos del portaobjetos, de tal manera que quede el tejido adherido a la superficie

Una vez que los frotis y las improntas se han secado al aire, se fijan con calor o alcohol metílico y se tiñen con las técnicas indicadas en cada caso

TÉCNICAS DE MONTAJE

Tinción de pelos y escamas: Generalmente estos especímenes se procesan a través de un examen directo y las estructuras micóticas son fácilmente observables. Sin embargo, cuando se desea colorearlos y conservarlos con fines de enseñanza o de ilustración, se requiere una técnica de montaje y es necesario pegarlos o adherirlos al portaobjetos antes de la tinción, para realizar con facilidad el procedimiento tintorial elegido

Técnica Se pone una pequeña gota de albumina de Meyer sobre el centro del portaobjetos limpio y desengrasado. Extiendase la gota hasta hacer una fina película. Se depositan los pelos o las escamas parasitados y se presiona ligeramente con una superficie roma (como el mango de una asa micológica). Se seca lentamente a la flama del mechero y se deja la preparación toda la noche a una temperatura de 30 a 35 °C. Una vez que están bien adheridos los productos, se fijan con alcohol metílico, cubriendo la totalidad del portaobjetos y dejando que se evapore totalmente. Se inicia la técnica de coloración indicada y se monta con resina sintética

Montaje de preparaciones húmedas: Cuando se desea conservar temporalmente preparaciones de exámenes directos, como dermatofitos en pelos y escamas, levaduras, o bien preparaciones de microcultivos teñidos con azul de algodón, se recomienda hacer un doble montaje cubriendo el espécimen por conservar con un cubreobjetos de 15 X 15 mm, se sella perfectamente los cuatro lados del cubreobjetos con barniz de uñas transparentes y se deja secar. Posteriormente hay que agregar dos o tres gotas de resina sintética y aplicar un portaobjetos de 22 X 22 mm, se limpia el exceso de resina y se deja hasta que seque. Estas preparaciones deben de almacenarse en posición horizontal, para que no se decanten los elementos fúngicos y vigilarse periódicamente para evitar su desecación, agregando más resina sintética, evitando de esta manera que se seque el líquido de montaje

TÉCNICA DEL TAPIZ

En las técnicas usuales, la toma de muestra se hace generalmente recogiendo la muestra con ayuda de un bisturí o un raspador, para las lesiones pilares, los cabellos se extirpan con unas pinzas de depilar. Estas técnicas no son de gran ayuda para la búsqueda sistemática de dermatofitos u hongos queratinofílicos, o en ausencia de lesiones clínicamente detectables, para las cuales se ha descrito esta técnica:

El tapiz, es una técnica simple que consiste en frotar energicamente la superficie cutánea a estudiar con un trozo de tapiz (alfombra o "moqueta"), que mide 6X6 cm, se le quitan los pelos cortos. La moqueta debe de ser montada sobre una trama de fibras vegetales o animales

Los cuadrillos de tapiz son remojados en agua durante 48 hrs, después de lavados en agua destilada para quitarle pegaduras, asperezas y productos insecticidas eventualmente presentes

Luego se secan y se envuelven en papel para ser esterilizados en autoclave una hora a 120°C, los cuadritos entonces están listos para usarse

Al momento de la toma, el cuadro de tapiz se saca del papel y es frotado energicamente sobre la superficie cabelluda a estudiar, debido a que su naturaleza y estructura realizan el efecto de un cepillo de pelos de queratina bien apretados, donde las propiedades electrostáticas al ser frotados, también contribuyen a la captura de esporas

Después de haber sido frotada la zona de la lesión el cuadro se desplaza al interior de la caja de petri, y se pone en contacto de 2 a 3 veces con el medio de cultivo, posteriormente se cierra la caja y se pone a incubar

Este método ha permitido obtener aislamiento de diversos dermatofitos a partir de lesiones cutaneas, y los resultados son superiores a los obtenidos por metodos clásicos

TÉCNICAS DE TINCIÓN

En micología las técnicas de tincion pueden ser simples, compuestas o especiales para la aplicación en técnicas de histopatología La elección de la tecnica depende del producto que se va a procesar y de la finalidad que se persiga al realizar el procedimiento Entre las técnicas de tincion mas empleadas se encuentran las siguientes

Azul de algodón de lactofenol clásico

Es útil para realizar el examen directo de cultivos, ya que es una técnica rapida que permite visualizar las estructura fúngicas

La técnica consiste en depositar una gota de colorante sobre un portaobjetos y, sobre ella, colocar un fragmento pequeño de cultivo por estudiar, dilacerandolo perfectamente para poder hacer una buena observación, se coloca un cubreobjetos sobre la preparacion y se procede a la observación de la misma

Esta técnica de coloración se puede aplicar a los microcultivos, en los cuales sólo será necesario aplicar una gota de colorante entre el porta y el cubreobjetos con el hongo

Con esta técnica también se puede teñir preparaciones para conservación a largo plazo, para ésto sólo es necesario sellar los bordes de la preparación con barniz de uñas transparentes

Fórmula del colorante

Ácido láctico	20 g
Glicerina	40 g
Fenol en cristales	20 g
Azul de algodón al 1%	2 ml
Agua destilada	20 ml

Azul de algodón de anilina modificado

Se utiliza para preparaciones de microcultivos, principalmente de dermatofitos, la técnica consiste en agregar el colorante en el portaobjetos y en el cubreobjetos, de el lado donde se encuentra el crecimiento del hongo, hasta cubrir totalmente el portaobjetos y el cubreobjetos Se deja la preparación con exceso de colorante por un tiempo de 24 a 48 hrs, para la penetración del colorante a las estructuras fungicas.

Fórmula del colorante:

Solución A:

Fenol líquido	20 ml.
Ácido láctico	20 ml.
Glicerol	40 ml.
Agua destilada	20 ml.

Si el fenol no es líquido, colocarlo en un matraz en baño María hasta que se funda

Solución B

Azul de anilina 0.05 gr

Mezclar la solución A con B y filtrar para eliminar los grumos o precipitados de colorante

NOTA: Otras técnicas alternativas de tinción se encuentran en el anexo 1

TÉCNICA DE MICROCULTIVO, TINCIÓN Y MONTAJE.

Técnica tradicional

- 1 En la base de una caja de Petri de 10 cm de diámetro se coloca una varilla de vidrio doblada en forma de "V" (caballete)
- 2 Sobre la varilla se fija el portaobjetos de 76 X 22 mm, con ayuda de cinta adhesiva. Se deposita en la misma caja un cubreobjetos de 22 X 22 mm
- 3 Se esteriliza el material durante 15 minutos a 15 libras de presión
- 4 Se prepara una caja de Petri con el medio seleccionado de aproximadamente 5 mm de espesor
- 5 Se corta el medio en círculos de 1.5-2 cm de diámetro X 0.5-1 cm de alto con ayuda de un tubo estéril
- 6 Se coloca un círculo del medio de cultivo en el centro del portaobjetos de la caja de Petri
- 7 Se inocula alrededor del círculo del medio (de 4 a 6 ocasiones) una pequeña porción del hongo a estudiar
- 8 Se coloca el cubreobjetos sobre el medio inoculado
- 9 Se adiciona a la caja 10 ml de glicerina al 10%, teniendo cuidado de no mojar el cultivo
- 10 Se incuba en la oscuridad durante 7 a 15 días a 25 °C
- 11 Se elimina la glicerina y se agrega formaldehído al 10% por 30 minutos
- 12 Se retira el cubreobjetos y se coloca sobre el mismo portaobjetos en una de sus orillas laterales limpia
- 13 Se retira y desecha el fragmento de medio de cultivo del portaobjetos
- 14 Se cubre tanto el portaobjetos como el cubreobjetos (con crecimiento de la muestra) con azul de algodón de anilina modificado
- 15 Se deja reposar durante 48 hrs, cuidando que en este tiempo el colorante no se seque
- 16 Una vez transcurrido este tiempo se inclina el portaobjetos y el cubreobjetos, para eliminar todo el exceso de colorante, y se limpia con una gasa seca los lugares donde no hubo crecimiento de el hongo cuidando de no dañar el mismo
- 17 En caso de querer conservar las preparaciones durante largo tiempo, se hace lo siguiente. Se coloca una gota de resina sobre el centro de la preparación del portaobjetos y se coloca encima un cubreobjetos limpio, cuidando de no producir burbujas en la preparación
- 18 A un portaobjetos limpio se le agrega una gota de resina (sintética Sigma al 60% en xilol) y se cubre con el cubreobjetos que tuvo crecimiento, cuidando de no producir burbujas

NOTA: En caso de querer las preparaciones de manera más rápida después del paso 12, sólo se tiene que agregar una gota de azul de algodón de lactofenol clásico tanto al cubreobjetos y portaobjetos, y colocarles su correspondiente portaobjetos y cubreobjetos limpios respectivamente. Y de esta forma se podrá observar inmediatamente al microscopio

MEDIOS DE CULTIVO

Después de un examen en fresco, el espécimen patológico deberá ser cultivado. Como ya se ha explicado, la identificación primaria de los hongos depende del criterio morfológico, por tanto la morfología, color o producción de conidios de la colonia fúngica sólo podrá ser demostrada a través del crecimiento en el cultivo. Es recomendable para efectuar, el primoaislamiento del hongo a partir de un producto patológico, utilizar medios de cultivo.

Existen medios de cultivo para efectuar el primoaislamiento, los cuales tratan de ser más selectivos al adicionar antibióticos, como penicilina, estreptomycin, etc., o tener concentraciones bajas de antifúngicos o modificando el pH con el objeto de inhibir el crecimiento de bacterias u hongos contaminantes.

Es adecuado efectuar la incubación del primoaislamiento a temperatura ambiente. La incubación a 37 °C se recomienda en posteriores cultivos y de preferencia en cultivos puros. Esta temperatura es usada para la obtención de las formas parasitarias. El tiempo de crecimiento variará según el tipo de hongo. Las levaduras se desarrollan en un período de 24 a 48 horas después de la siembra, los hongos filamentosos, crecen de 2 a 4 días y, finalmente, la mayor parte de los hongos patógenos crecen después de 6 a 15 días a partir de la siembra.

Muchas veces la sola descripción de la morfología no ayuda a efectuar la determinación de la especie, debido a que se hace necesario conocer características bioquímicas y fisiológicas del organismo, para lo cual se han desarrollado medios de cultivo especiales para la determinación genérica y/o específica del hongo.

La determinación se logra gracias a los cambios que se producen en el cultivo, según el tipo de desarrollo que tenga el microorganismo en ese medio. Todos los medios de cultivo, a excepción del medio de tioglicolato, deberán ser puestos en refrigeración.

MEDIOS DE CULTIVO PARA AISLAMIENTO

Agar dextrosa-Sabouraud (Sabouraud simple)

Es un medio utilizado para el aislamiento, identificación y mantenimiento de la gran mayoría de los hongos patógenos. Su composición es la siguiente:

- Peptona 10 gr
- Glucosa 20 gr
- Agar - agar 20 gr
- Agua destilada 1000 ml

Procedimiento:

1. Disuelva los ingredientes en el agua.
2. Se deja reposar durante 10 minutos.
3. Ajuste el pH a 5.6.
4. Se esteriliza durante 15 minutos a 121 °C.

Para obtener el medio líquido, deberá prescindirse del agar.

NOTA: Medios de cultivo, de conservación técnicas de conservación en el anexo 3

RESULTADOS

RESULTADOS

1a. PARTE:

REQUISITOS Y DOCUMENTACIÓN NECESARIA PARA INSTALAR UN LABORATORIO DE MICROLOGÍA MÉDICA.

Organización:

La organización de un laboratorio micrológico debe de cubrir dos grupos de requerimientos para llevar a cabo sus actividades

- Requerimientos técnicos
- Requerimientos legales

El objetivo general que se persigue desde el punto de vista técnico, es el de efectuar determinaciones exactas, precisas, reproducibles y confiables. Desde el punto de vista legal el laboratorio debe de estar organizado de manera que en todas sus actividades, puedan cumplir con las disposiciones reglamentarias que establece la ley en sus diferentes aspectos sanitarios, fiscales, de pesas y medidas laborales, etc

Debe de contar con un organigrama, en el que se definen claramente las funciones y responsabilidades del personal integrante del laboratorio. Por lo que a continuación se presenta un esbozo de organización general, que puede adaptarse a las necesidades en un laboratorio de micología.

Dirección técnica:

Debe de estar encabezada por profesionales capacitados tanto técnica como administrativamente, que tienen la responsabilidad de coordinar y hacer que se lleven a cabo todas las actividades encaminadas al cumplimiento de los requerimientos antes mencionados

Requerimientos técnicos.

A fin de cumplir con estos requerimientos, la dirección técnica deberá contar con las siguientes secciones

- **Personal** Esta sección será la encargada de calificar, seleccionar y vigilar las actividades del personal que labora en el laboratorio
- **Reactivos, materiales, equipos e instrumentos** Deberá de cuidar el manejo de reactivos, materiales, equipos e instrumentos
- **Investigación técnica:** Se encargará de lo relativo a los métodos, la documentación técnica, los métodos de validación y la actualización de información científica.
- **Procesamiento de muestras:** Llevará a cabo todos los pasos necesarios para efectuar el análisis de las muestras, desde su recepción hasta la entrega de los resultados.
- **Seguridad:** Vigilará el cumplimiento de todas las disposiciones de seguridad para la protección del personal.
- **Garantía de calidad:** Se encargará de que se cumplan todas las disposiciones del programa de calidad, así como los procedimientos estándares de operación, validación y control de calidad.
- **Intendencia:** Será la encargada de llevar a cabo todas las operaciones de mantenimiento y limpieza de laboratorio.

Requerimientos legales

Los requerimientos son

- **La reglamentación sanitaria:** Se encargará de que se cumplan las diferentes reglamentaciones sanitarias fijadas por la Secretaría de Salud
- **Reglamentación laboral:** Comprende el cumplimiento de las disposiciones de la Secretaría de Trabajo y Previsión Social y las del Instituto Mexicano del Seguro Social
- **Reglamentación del departamento de bomberos:** Comprende las medidas de seguridad exigidas por el D D F a través del departamento de bomberos
- **Reglamentación ecológica:** Son las indicaciones relativas a la protección del medio ambiente
- **Reglamentación fiscal:** Incluye lo relativo a las disposiciones de materia fiscal de la Secretaría de Hacienda y Crédito Público

Personal

El laboratorio debe de contar con un organigrama actualizado en el que se definan claramente las funciones y responsabilidades del personal asignado a cada área, contando con el siguiente personal

- **Responsable sanitario:** Debe ser un profesional del área
- **Director del laboratorio:** Debe de tener una formación profesional, cuyas funciones deben ser entre otras las siguientes
 - Planear, organizar, ejecutar y controlar las actividades encaminadas al cumplimiento de los requisitos técnicos y legales vigentes, descritos anteriormente
 - Coordinar las actividades del laboratorio a fin de asegurar una adecuada administración de los recursos humanos y materiales
 - Reclutar, capacitar, evaluar, promocionar y sancionar al personal
 - Establecer políticas y objetivos del laboratorio y supervisar el cumplimiento de los procedimientos adecuados del laboratorio
- **Responsable de sección:** Debe de tener formación específica en su área y sus funciones son
 - Participar como auxiliar sustituto del director de laboratorio
 - Seleccionar la metodología adecuada de acuerdo a los recursos materiales y humanos disponibles
 - Distribuir adecuadamente el trabajo a fin de entregar oportunamente los resultados obtenidos.
 - Efectuar la interpretación y monitoreo de los resultados de acuerdo a los procedimientos establecidos, con objeto de garantizar los resultados y evitar la emisión de los informes incorrectos
 - Asegurar que halla un registro de datos y se realice conforme a los procedimientos adecuados del laboratorio
 - Establecer el programa de calibración, mantenimiento y uso del equipo e instrumentos a su cargo
 - Verificar que se cumplan las condiciones mínimas de seguridad, prevención y tratamiento de accidentes, primeros auxilios y eliminación correcta de desechos
 - Entrenar, capacitar, motivar y supervisar al personal a su cargo
- **Personal profesional analítico:** Debe de tener la formación profesional suficiente para desempeñar las funciones que le encomienda el responsable de la sección donde labora, sus funciones son
 - Efectuar los análisis de acuerdo a procedimientos operativos y métodos analíticos previamente probados
 - Proponer modificaciones a procedimientos y metodología que mejoren las condiciones establecidas vigentes
 - Responsabilizarse de los resultados emitidos
 - Cumplir con el reglamento interno de trabajo y las condiciones de seguridad establecidas
- **Personal auxiliar de laboratorio:** Estas personas son técnicos capacitados para realizar tareas específicas, bajo la supervisión del personal profesional tal, que garantice la confiabilidad de los resultados
- **Capacitación de personal:** El personal de nuevo ingreso recibirá suficiente información y entrenamiento para asegurar la confiabilidad de los trabajos que se le asignen.

- **Evaluación del personal:** El laboratorio implementará un sistema de evaluación de desempeño del personal de acuerdo a sus actividades y funciones.

Instalaciones

Comprenden las áreas de trabajo y todos los servicios auxiliares necesarios para el funcionamiento de las mismas, las instalaciones de las diferentes áreas de trabajo estarán integradas por los siguientes renglones

- **Características arquitectónicas:**

- **Superficie** La superficie de cada área será tal que permita la instalación de los equipos e instrumentos fijos que requieran, dejando un espacio suficiente entre uno y otro a fin de que el personal transite, trabaje cómodamente y se puedan llevar a cabo con facilidad los servicios de limpieza y mantenimiento necesarios

- **Ventilación** Las áreas deberán de estar bien ventiladas mediante accesos de aire colocados estratégicamente

- **Iluminación** Las áreas de trabajo tendrán iluminación natural y artificial adecuada para el correcto desempeño del trabajo

- **Acabados** En todas las áreas se preferirán acabados lisos sin interrupción de continuidad para paredes, techos y pisos, las uniones de techos-paredes, pisos-paredes, paredes-paredes deberán de ser redondeadas con acabado sanitario

- **Equipos auxiliares:**

Se consideraran como tales las campanas de extracción de gases, los hornos, las estufas, las autoclaves, las campanas de flujo laminar

Nota: En el área de microbiología además de tener los cuartos limpios, se deberá de tener zonas para autoclaves, estufas de cultivo, hornos, etc , así mismo en las zonas para autoclave deberá de existir medios adecuados de extracción para evitar la acumulación de calor

- **Servicios auxiliares:**

- Energía eléctrica

- Agua y drenaje

- Gas combustible, oxígeno

- Aire acondicionado

- Identificación de líneas de servicios mediante un código de colores

- **Mobiliario**

- Mesas

- Estantes

- Sillas

- Tarjeteros

- **Zonas de lavado.**

Cada una de las áreas deberá de contar con una zona propia de lavado y almacenamiento del material que utilicen; la zona de lavado deberá de contar con una zona de recepción de material sucio que estará dividido en, zona de recepción de material utilizado para soluciones acuosas y zona de recepción de material utilizado para soluciones orgánicas, y deberá de contar con una zona para la esterilización del material contaminado antes de que éste pase a la zona de recepción de material sucio

En el área de donde se lleve a cabo el lavado, se contará con tarjas de acero inoxidable dotadas de preferencia de servicio de agua caliente y fría Respecto al drenaje se deberá de seguir los lineamientos oficiales referentes al equilibrio ecológico.

- **Zona de secado.**

- **Zona de almacenamiento de material limpio.**

- **Zona de almacenamiento de reactivos volátiles.**

- **Zona de almacenamiento de reactivos no volátiles**

- **Zona de almacenamiento de instrumentos.**

- **Área de servicios administrativos.**

Esta área deberá de tener las siguientes secciones

- ⇒ Sección de recepción y registro de muestras
- ⇒ Sección de entrega de resultados de muestras
- ⇒ Biblioteca.
- ⇒ Archivo general técnico.
- ⇒ Archivo de documentación oficial
- ⇒ Sección de compras y pago a proveedores
- ⇒ Contabilidad
- ⇒ Servicios sanitarios y casilleros.
- ⇒ Sección de mantenimiento y limpieza.

Equipos e instrumentos, registro y documentación

Información general. se conservará un registro de cada aparato en el que figuren:

- a) Nombre y marca del equipo.
- b) Descripción resumida.
- c) Modelo, serie y fecha de adquisición
- d) Número de inventario.
- e) Nombre del fabricante o representante
- f) Compañía que proporciona servicio
- g) Manuales. Los cuales deben de comprender
 - Instructivo de instalación
 - Instructivo de operación
 - Instructivo de reparaciones de urgencia.
 - Instructivo de mantenimiento
 - Instructivo de calibración o verificación de parámetros.
 - Lista de accesorios de repuesto sugeridos
- h) Registro de control de uso, que comprenderá
 - Fecha de utilización
 - Tiempo utilizado.
 - Nombre de la persona que lo ocupó.
 - Muestra analizada.
 - Reporte de anomalías si las hubiera.
- i) Registro de mantenimiento y control de fallas.
- j) Registro de calibración; que comprenderá:
 - Nombre del instrumento o equipo.
 - Número de serie.
 - Fecha de calibración y/o verificación.
 - Persona o compañía que efectuó la calibración.
 - Fecha de la próxima calibración y/o verificación.
 - Observaciones.

Reactivos

Los reactivos que ingresen al almacén del laboratorio deberán ser claramente identificados con los siguientes datos:

- a) Nombre químico y calidad.
- b) Número progresivo de adquisición marcado en la tapa y en el frasco.
- c) Fecha de adquisición.

Para cada reactivo se llevará un registro en el que aparezcan los siguientes datos: identificación y registro de movimientos en que se consigne, fecha, cantidades y saldo.

Los reactivos químicos serán almacenados en estantes abiertos, en un local ventilado y fresco, separando aquellos cuya evaporación o sublimación pueda resultar contaminante para los demás reactivos, los solventes inflamables, serán almacenados en lugares frescos, separados del resto de los reactivos y alejados de mecheros, contactos y de todo lo que pueda provocar una ignición, los reactivos volátiles se deben almacenar en refrigeración

Las soluciones reactivas deberán tener una etiqueta en el frasco la cual debe de contener

- a) Nombre del reactivo
- b) Concentración expresada en P/V, V/V, etc
- c) Fecha de preparación
- d) Nombre del preparador

Las soluciones deberán estar contenida en frascos adecuados, protegidos de la luz, de la evaporación y de todo aquello que pueda hacer variar su integridad. Deberán estar almacenadas en forma de que se preserven de posibles alteraciones, así mismo deberán de poseer fecha de caducidad

Medios de cultivo

Identificación

- a) Nombre químico y calidad
- b) Número progresivo de adquisición marcado en la tapa y en el frasco
- c) Fecha de adquisición

Almacenamiento Se almacenarán aislados de los demás reactivos, en las condiciones de almacenamiento que indique el fabricante.

Verificación de calidad A cada medio de cultivo adquirido se le efectuarán las siguientes pruebas como mínimo

- Promoción de crecimiento para microorganismos específicos al medio
- Determinación de sensibilidad
- Determinación de pH antes y después de esterilizar el medio. Se recomienda diseñar estudios cualitativos y cuantitativos para el control de medios selectivos y diferenciales.

Preparación del medio El preparador llevará un registro del medio de cultivo en el que aparecerán los siguientes datos

- a) Identificación del medio
- b) Método utilizado
- c) Pesadas
- d) Calidad del agua destilada
- e) Control de esterilización
- f) Preparador
- g) Fecha de preparación
- h) Observaciones si las hubiera, como precipitación, caramelización, etc

Cultivos micrológicos (cepas).

Identificación Las anteriores, adicionando el origen de la cepa

Almacenamiento Todas las cepas deberán ser almacenadas en condiciones tales que se garanticen sus condiciones de actividad y pureza.

Control: Cada cepa que se adquiera deberá ser verificada mediante tinciones, microscopía y los resultados registrados con los siguientes datos:

- a) Identificación de la cepa.
- b) Métodos de control.
- c) Pruebas y resultados.
- d) Analista
- e) Fecha de análisis.

Resiembrado: Cada cepa será resembrada con la periodicidad que indique la bibliografía correspondiente. Asimismo, se llevará un registro del número de resiembras así como los resultados de control después de una incubación correspondiente.

Liofilización: De acuerdo a las necesidades del laboratorio las cepas pueden ser sometidas a este proceso

Procesamiento de muestras

Las muestras que reciba el laboratorio se someterán a un proceso que consta de los siguientes pasos:

Recepción y registro Constará de una zona específica de recepción de muestras y se llevará un registro de éstas con los siguientes datos:

- a) Número consecutivo de entrada
- b) Fecha de entrada.
- c) Nombre de quien solicita el análisis
- d) Nombre de la muestra
- e) Descripción física de la muestra
- f) Pruebas solicitadas

Almacenamiento previo al análisis Mientras la muestra permanece en espera de la orden de análisis, deberá ser almacenada en una zona delimitada y designada para el efecto en condiciones que no permita la alteración de la muestra.

Orden de análisis El responsable o la persona que éste designe, examinará la ficha de registro de entrada y determinará a qué analista corresponde ejecutar el trabajo, al efecto emitirá una orden de análisis que constará de los siguientes datos:

- a) Identificación de la muestra
- b) Solicitante del análisis
- c) Pruebas a realizar
- d) Analista a quien designe el análisis
- e) Fecha y firma de la persona que emite la orden de análisis

Análisis Deberá de haber una libreta de trabajo en la cual deberá de existir los siguientes datos:

- a) Solicitante del análisis
- b) Pruebas solicitadas
- c) Fecha en la que se inicia el análisis

Informe analítico Al terminar el análisis el analista deberá de redactar un informe el cuál contendrá lo siguiente:

- a) Resultados obtenidos
- b) Anexos como lo pueden ser fotos, etc
- c) Fecha y firma del analista.
- d) Fecha y firma del responsable del laboratorio.

Documentación general y archivos.

En forma indicativa se sugiere que el laboratorio cuente de manera fácilmente accesible con los siguientes documentos:

- a) Licencias y responsivas sanitarias.
- b) Documentación necesaria para cumplir con los demás requerimientos legales.
- c) Manual de procedimientos de validación.
- d) Manual de procedimientos de control de calidad.
- e) Manual de auditorías de calidad.
- f) Registro de resultados.
- g) Registro de métodos.
- h) Registro de calibración de instrumentos y equipo.

Todos los métodos, documentos e informes serán escritos en forma clara y empleando el vocabulario más sencillo posible.

En los documentos generales se señalarán el objetivo, antecedentes, alcance y responsabilidades pertinentes. Cualquier modificación o cancelación de un documento general o de un método será aprobada y firmada por una persona de reconocida autoridad dentro de la organización.

Los documentos se archivarán por grupos que reúnan información semejante. Asimismo se archivarán los informes de los análisis practicados.

Los demás documentos se mantendrán archivados por el tiempo que fijen los requerimientos legales y técnicos (12).

REQUISITOS DE LA NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-087-ECOL-1994.

Objeto: Esta norma oficial mexicana establece los requisitos para la clasificación, separación, envasado, almacenamiento, recolección, transporte, tratamiento y disposición final de los residuos peligrosos biológico-infecciosos que se generan en establecimientos que presten atención médica, así como laboratorios clínicos, laboratorios de producción de biológicos, de enseñanza y de investigación tanto humanos como veterinarios

Definición: Residuo peligroso biológico-infeccioso El que contiene bacteria, virus u otros microorganismos con capacidad de causar infección, o que contiene toxinas producidas por microorganismos que causan efectos nocivos a seres vivos y al ambiente, que se genera en establecimientos que presten atención médica, tales como hospitales y consultorios médicos, así como laboratorios clínicos, laboratorios de producción de biológicos, de enseñanza y de investigación tanto humanos como veterinarios

Clasificación de los residuos peligrosos biológico-infecciosos: Para efectos de esta norma oficial mexicana, además de los establecidos en la NOM-CRP-001-ECOL, se consideran residuos peligrosos biológico-infecciosos los provenientes de:

- La sangre
- Los productos derivados de la sangre
- Los materiales con sangre
- Los anteriores materiales, aun cuando se hayan secado, incluyendo el plasma, el suero y los derivados de la sangre, así como los recipientes que los contienen o los contuvieron
- Los cultivos y muestras almacenadas de agentes infecciosos
- La producción de biológicos
- Los patológicos
- Los tejidos, órganos, partes y fluidos corporales que se remueven durante las necropsias, la cirugía o algún otro tipo de intervención
- Las muestras para análisis.
- Los cadáveres de animales o partes de estos
- Los no anatómicos derivados de la atención a pacientes y de los laboratorios
- La cirugía y necropsia.
- Las terapias y unidades coronarias
- El equipo, material y objetos contaminados durante la atención a pacientes
- Los equipos y dispositivos desechables utilizados para la exploración y toma de muestras de laboratorio, como rectoscopios, otoscopios, espejos vaginales y similares.
- Los objetos punzocortantes usados
- Los que han estado en contacto con pacientes durante el diagnóstico y tratamiento, incluyendo navajas, lancetas, jeringas, pipetas Pasteur, agujas hipodérmicas, de acupuntura y para tatuaje, bisturíes, cajas petri, cristalería entera o rota, porta y cubre objetos, tubos de ensayo y similares.

Manejo: Los hospitales y establecimientos de atención médica deberán cumplir con las siguientes fases de manejo de sus residuos peligrosos biológico-infecciosos

- Identificación de los residuos y de las áreas donde se generen.
- Envasado de los residuos generados.
- Recolección y transporte interno
- Almacenamiento temporal
- Recolección y transporte externo.
- Tratamiento.
- Disposición final.
- Identificación y envasado

- Se deberán separar y envasar todos los residuos peligrosos generados en hospitales y establecimientos que presten atención médica, de acuerdo con sus características físicas y biológicas-infecciosas conforme a la tabla siguiente

TIPOS DE RESIDUOS	ESTADO FÍSICO	ENVASADO	CÓDIGO DE COLORES
Sangre; cultivos y muestras almacenadas de agentes infecciosos; y residuos no anatómicos derivados de la atención a pacientes y de los laboratorios	Residuos sólidos	Bolsas de plástico calibre 200	Rojo
	Residuos líquidos	Recipientes herméticos de metal o plástico	Rojo
Punzocortantes	Residuos sólidos	Recipiente rígido de metal o de plástico	Rojo
Patológicos	Residuos líquidos	Bolsas de plástico calibre 300	Amarillo
	Residuos sólidos	Recipientes herméticos de metal o de plástico	

- Las bolsas deberán ser de polietileno e impermeables, de calibre mínimo 300 para los residuos patológicos y de 200 para los demás, de acuerdo al color especificado en la tabla anterior de esta norma oficial mexicana
- Las bolsas se llenarán al 80% de su capacidad, cerrándose antes de ser transportadas al sitio de almacenamiento temporal
- Los recipientes de los residuos peligrosos punzocortantes deben de ser rígidos, de plástico o de metal, con tapa de seguridad o cierre hermético, etiquetados con una leyenda que indique "PELIGRO, RESIDUO PELIGROSO PUNZOCORTANTE BIOLÓGICO-INFECCIOSO", y marcados con el símbolo universal de riesgo biológico
- Los recipientes de los residuos peligrosos líquidos deben de ser rígidos, de plástico o metal, con tapa hermética, etiquetados con la leyenda que indique "PELIGRO, RESIDUOS BIOLÓGICO-INFECCIOSOS" y marcados con el símbolo universal de riesgo biológico con un rotulado de peligro

Recolección y transporte interno:

- Se destinarán carritos manuales de recolección exclusivamente para la recolección y depósito en el almacenamiento
- Los carritos manuales de recolección se desinfectarán diariamente con vapor o algún producto químico que garantice sus condiciones higiénicas
- Los carritos manuales de recolección deberán de tener la leyenda "USO EXCLUSIVO PARA RESIDUOS PELIGROSOS BIOLÓGICO-INFECCIOSOS" y marcado con el símbolo universal de riesgo biológico
- El diseño del carrito manual recolector deberá prever la seguridad de la sujeción de las bolsas y contenedores
- Los carritos manuales de recolección no deberán rebasar su capacidad de carga durante su uso
- No podrán utilizarse ductos neumáticos o de gravedad como medio de transporte interno de los residuos peligroso biológico-infecciosos, tratados o no tratados
- Se deberán de establecer rutas de recolección para su depósito en el almacén temporal.
- El equipo mínimo de protección del personal que efectúa la recolección consistirá en uniforme completo, guantes y mascarilla o cubreboca. Si se manejan residuos líquidos se deberán usar anteojos de protección.

Almacenamiento temporal.

- Se deberá destinar un área para el almacenamiento temporal de los residuos peligrosos biológico-infecciosos.
- Los residuos peligrosos biológico-infecciosos deberán almacenarse en contenedores
- Los contenedores deberán de ser de color rojo y estar rotulados con el símbolo internacional de "Riesgo biológico" y con la leyenda "PELIGRO, RESIDUOS PELIGROSOS BIOLÓGICO-INFECCIOSOS" El color rojo no podrá utilizarse en los contenedores de residuos no peligrosos
- El período de almacenamiento a temperatura ambiente no deberá exceder las 24 horas, a menos que ocurra putrefacción de los mismos, sin exceder de 4 días en total

Área de almacenamiento temporal.

- Deberá estar separada de las siguientes áreas de pacientes, visitas, cocina, comedor, instalaciones sanitarias, sitios de reunión, áreas de esparcimiento, oficinas, talleres y lavandería
- Estar ubicada donde no haya riesgo de inundaciones
- Contar con extinguidores de acuerdo al riesgo asociado
- Contar con pisos sellados e impermeabilizados
- Contar con muros de contención para detener derrames
- Contar con letreros, señalamientos alusivos a la peligrosidad de los mismos, en lugares y formas visibles
- Contar con una pendiente del 2% en sentido contrario a la entrada
- No deberán de existir conexiones con drenaje en el piso, válvulas de drenaje, juntas de expansión, albañales o cualquier otro tipo de abertura que pudiera permitir que los líquidos fluyan fuera del área protegida

Recolección y transporte externo.

- Sólo podrán recolectarse los residuos que cumplan con el envasado, embalado y etiquetado o rotulado
- Los residuos peligrosos biológico-infecciosos no deberán ser compactados durante su recolección y transporte
- El vehículo recolector deberá utilizarse únicamente para el transporte de este tipo de residuos y al concluirse la jornada deberá lavarse y desinfectarse
- No deberán de mezclarse con ningún otro tipo de residuos municipales o industriales

Tratamiento: Los métodos de tratamiento previstos en esta norma oficial son la incineración y la esterilización

El tratamiento podrá realizarse dentro del establecimiento o por una empresa autorizada para la prestación del servicio para el manejo de residuos peligrosos

Los residuos patológicos deberán incinerarse o depositarse en celdas de confinamiento

Los hospitales y establecimientos que presten atención médica deberán de presentar su programa de contingencias en caso de derrames, fugas o accidentes relacionado con el manejo de estos residuos

Esterilización: Los hospitales y establecimientos de atención médica que esterilicen sus residuos peligrosos biológico - infecciosos se realizará de acuerdo a la siguiente tabla

Parámetros iniciales de operación			
Tipo de autoclave	Temperatura	Presión	Tiempo de resistencia
	°C	Kg./cm ²	Min.
Por gravedad	121	1.20 - 1.27	90
Alto vacío	132	1.99 - 2.25	45
Retorta	130 - 204	2.50 - 21.10	25

Los parámetros de operación establecidos en la anterior tabla, se podrán modificar de acuerdo con las pruebas de monitoreo biológico, que se indican a continuación

- ⇒ Monitoreo.
- ⇒ Pruebas de esterilización
- ⇒ Se realizará un indicador biológico que serán las esporas de *Bacillus stearothermophilus*
- ⇒ La instalación que utilice este método deberá efectuar por lo menos 10 testigos y siempre que se realicen modificaciones a la composición o volúmenes de residuos tratados
- ⇒ Las capsulas con el indicador biológico deberán colocarse dentro de bolsas que contienen los residuos para verificar que el vapor ha penetrado a los sitios de mas difícil acceso
- ⇒ En el caso de las pruebas de monitoreo biológico resulten positivas, se efectuarán las variaciones de los parámetros iniciales de tiempo, temperatura y presión, revisando la forma en que están envasados los residuos hasta que la prueba de monitoreo biológico resulte negativa
- ⇒ Los resultados de estas pruebas deberán quedar registrados en una bitácora
- ⇒ Debe de llevar un registro de cada tratamiento, indicando los siguientes datos, así como aquellos otros que la autoridad determine fecha, volumen y tipo de residuos, tiempo de tratamiento, temperatura, presión de la autoclave, en su caso los resultados de monitoreo, así como el nombre, cargo y firma de persona responsable de la esterilización

Disposición final: Una vez tratados los residuos peligrosos biológico-infecciosos por el metodo de la autoclave se eliminarán como residuos no peligrosos, los tratados con el metodo de esterilización deberán triturarse y someterse a un proceso que los haga irreconocible

La disposición final de los residuos peligrosos biológico-infecciosos sin tratamiento deberán confinarse transitoriamente a una celda especial para la disposición de residuos peligrosos biológico-infecciosos después del plazo establecido por la norma oficial mexicana

Celda especial para la disposición de residuos peligrosos biológico-infecciosos.

Selección del sitio:

- Profundidad del manto friatico Profundidad vertical mayor de 15 m del nivel friatico
- Zona de recarga Debera estar ubicada a una distancia mayor de 1 km y aguas abajo de las zonas de recarga de acuíferos o fuentes de abastecimiento de agua potable
- Ubicación con respecto a la zona de fracturación Debera ubicarse a una distancia horizontal de 100 m como minimo del limite de la zona de fracturación o falla biológica
- Características de los estratos del suelo Se deberán conocer a través de un estudio geofísico, aplicandolo hasta una profundidad de 120 m
- Características del suelo Deberá reunir condiciones tanto de impermeabilidad como de remoción de contaminantes, representadas estas por el coeficiente de permeabilidad de 1×10^{-4} a la menos cinco cm/seg y por la capacidad de intercambio catiónico de 30 meq/100 gr de suelo
- Material para cobertura Como minimo con un 25% de material de cubierta en relación al volumen de los residuos a disponer diariamente
- Ubicación con respecto a cuerpo de agua A una distancia mayor de 1 km de las zonas de inundación, cuerpos de aguas y corrientes naturales.
- Ubicación con respecto a centros de población y vias de acceso A una distancia mayor de 500 m del área urbana; a una distancia mayor de 70 m de las vias de comunicación terrestre, a una distancia mayor de 3 km. de áreas naturales protegidas y aeropuertos, así como respetar el derecho de via de 20 m de cada lado de líneas de conducción de energía eléctrica, oleoductos, poliductos, gaseoductos y a una distancia mayor de 150 m de áreas de almacenamiento de hidrocarburos
- Topografía: La pendiente media en la base del terreno natural del sitio no mayor del 30%
- Limitación: No se podrá operar en un sitio destinado en zona fracturada.
- Estudio geofísico: Para determinar la estructura, zonas y capas acuíferas, así como la diferencia entre materiales permeables e impermeables y fijar espesores y posición de unos y otros, efectuando sondeos eléctricos verticales a una profundidad de 120 m, su número estará en relación a las hectáreas con que cuenta el sitio

- Estudio geohidrológico. Para conocer la profundidad a la que se encuentra el agua subterránea, así como la dirección, velocidad del escurrimiento, o flujo de la misma y su composición química
- Pozos de monitoreo para lixiviados. Los sistemas de monitoreo para lixiviados deberán de contar con 2 pozos de muestreo situados, uno en la dirección del flujo de las aguas subterráneas a 150 m antes de llegar al sitio y otro a 150 m aguas abajo del sitio

Construcción de la celda

- La celda deberá ser impermeabilizada artificialmente en las bases y los taludes, con objeto de evitar el flujo de lixiviados
- Se utilizarán membranas de polietileno de alta densidad, con un espesor mínimo de 1.5 mm
- La construcción de la celda deberá contar con los sistemas de capacitación y de monitoreo de lixiviados, así como de biogas
- Deberá de contar con los siguientes obras complementarias: báscula, cerca perimetral, caseta de vigilancia, drenaje pluvial y señalamientos

Monitoreo y control

- Se deberá de realizar un monitoreo en las aguas subterráneas cada 6 meses para verificar la presencia de lixiviados
- Cuando como consecuencia del monitoreo se detecte la presencia de lixiviados, estos deberán extraerse de los pozos correspondientes para su análisis, tratamiento y posterior confinamiento, conforme a las normas oficiales mexicanas correspondientes
- Los operarios de las celdas deberán contar con el equipo de protección personal que establezcan las disposiciones aplicables y las normas oficiales mexicanas de seguridad correspondientes
- Se deberá contar con un programa de atención a contingencias, desarrollado específicamente para casos de contingencias y desastres que pudiera ocurrir en las instalaciones y al realizar cualquiera de las actividades propias de la operación (13).

MEDIDAS DE SEGURIDAD INTERNAS EN EL LABORATORIO

Como otros laboratorios clínicos, los de micología médica no están exentos de accidentes de trabajo, sin embargo, éstos pueden reducirse al mínimo si se observan las más elementales normas de seguridad y prevención de los mismos, los cuales deberá de conocer el personal a través de programas de adiestramiento.

En los siguientes apartados se hará hincapié en algunas medidas de seguridad y procedimientos adecuados para aplicar en casos de accidentes, así como en algunas normas para elevar la calidad en el trabajo de laboratorio.

RIESGOS DE LABORATORIO

A pesar de que la mayoría de los hongos patógenos representan un riesgo para el hombre, solamente *C. immitis*, *P. brasiliensis*, *H. capsulatum* y *B. dermatitidis* se consideran altamente patógenos, por lo que deben manipularse extremando los cuidados y utilizando campanas de seguridad biológica de flujo laminar.

Si no se dispone de este equipo, se debe desinfectar la mesa de trabajo, evitar las corrientes bruscas de aire y utilizar dos mecheros. Los tubos de cultivo con desarrollo de colonias se incuban a 26 °C, y se anotan la fecha de la siembra sin manipularlos en exceso hasta la fecha de lectura. Los hongos de alta patogenicidad se incuban en un lugar diferente al del resto de los cultivos, de preferencia en cajones para este fin, de tal manera que al abrirse el cajón se pueda observar el desarrollo fúngico sin tener que manipular los medios.

Al terminar de sembrar las muestras o resembrar estos hongos, se desinfecta el área de trabajo con alcohol al 96% o con fenol al 5%. Se debe lavar las manos con agua y jabón y evitar llevarlas a los ojos o a las mucosas externas. No debe trabajarse con hongos, especialmente con los de micosis subcutáneas, si se tienen heridas o excofraciones en las manos

Una vez que se desechan los cultivos, se esterilizan en autoclave a 20 libras de presión durante 60 minutos antes de lavarlos o depositarlos en el incinerador

En caso de ruptura de tubos con hongos altamente patógenos, se informa al resto del personal de laboratorio para que lo abandonen de inmediato. Posteriormente hay que humedecer una toalla con suficiente agua para depositarla sobre el material roto y los fragmentos de cultivo, se recoge el material, y se repite el mismo procedimiento con una nueva toalla humedecida hasta dejar completamente limpia la superficie, luego se desinfecta con fenol al 15%. Todo el material contaminado debe esterilizarse

Las personas que han sido expuestas a estos accidentes serán vigiladas clínicamente durante varias semanas para detectar, en caso de contagio, cualquier sintomatología atribuible a algunas micosis. Se le practicarán reacciones serológicas y pruebas intradérmicas para vigilar seroconversiones o intradérmorreacciones positivas.

Uno de los problemas más frecuentes en los laboratorios de micología médica es la contaminación de cultivos y materiales por los llamados hongos contaminantes, por lo que la limpieza constante y adecuada de todas las áreas de laboratorio deben de extremarse y realizarse, por lo menos cada semana. Al mismo tiempo son importantes las siguientes medidas que deben de ser cumplidas estrictamente en el laboratorio

- ⇒ No comer ni beber dentro del laboratorio
- ⇒ No fumar dentro del laboratorio
- ⇒ No tener plantas naturales.
- ⇒ Llevar ropa de trabajo limpia.
- ⇒ Evitar corrientes de aire
- ⇒ No permitir la entrada a visitas o personas extrañas al laboratorio.

RIESGOS DE MATERIAL Y EQUIPO

Para evitar los accidentes, incendios, quemaduras o inhalación de productos tóxicos, deben de ser observadas las siguientes medidas de seguridad:

1. No usar ropa de vestir ni de trabajo hecha con materiales 100% sintéticos
2. Hacer revisiones y mantenimiento periódico del equipo electromecánico, como motores, centrifugas, agitadores, etc.
3. Tener fuera del laboratorio una área de almacén de reactivos, medios de cultivo y materiales diversos, almacenando los frascos de alcohol, ácidos y álcalis sobre tarimas en el suelo
4. Manipular los productos químicos, como cáusticos, corrosivos, inflamables o venenos, con guantes de seguridad
5. Depositar la basura en recipientes cerrados separando los materiales no contaminados y depositar estos últimos en cubetas de lámina para esterilizarse antes de lavarse o desecharse.
6. Tener una regadera de presión para casos de quemaduras por ácidos o álcalis
7. Usar pipetas automáticas
8. Tener disponibles guantes, cubrebocas y protectores de cara para manejar inhalantes tóxicos o corrosivos.
9. Tener dentro del laboratorio un extinguidor para fuego producido para madera o papel y otro para fuego eléctrico o de químicos alcohol o benceno.
10. Disponer de una manta automática para cubrir totalmente a la persona en caso de quemaduras
11. Tener un botiquín de primeros auxilios, que además contenga soluciones neutralizantes de ácidos y álcalis, como bicarbonato de sodio al 5% y ácido bórico al 3% respectivamente. Estos deben de ser aplicados sobre las mucosas o la piel afectada, previo lavado con abundante agua
12. Extremar las precauciones de almacenamiento y manejo de tanques de gas, poniéndolos en lugares bien ventilados y no accionando sin necesidad las válvulas, probar estas con jabonadura periódicamente.

13. Los lugares de circulación del personal en el laboratorio deben ser del tipo de los corredores sin fin, para no quedar atrapados en caso de accidentes. Se debe disponer de salidas de emergencia.
14. Los animales de experimentación no deben de entrar ni de permanecer en los laboratorios, para ello es conveniente disponer de bioterios y salas de manejo de animales, que guarden todas las normas sanitarias y garanticen la buena marcha de los experimentos.
15. Tener un lugar visible de teléfonos de emergencia, talleres de mantenimiento y cuerpo de gobierno de la institución.

MANEJO DE MUESTRAS DE ALTO RIESGO

Se consideran muestras de alto riesgo aquellas que proceden de pacientes con diagnóstico comprobado de hepatitis viral tipo B, SIDA, o de otras enfermedades infectocontagiosas como tuberculosis, de las cuales se mencionan a continuación las principales medidas recomendadas por la OMS y el Center for Diseases Control (CDC) para la prevención de infecciones accidentales en el personal del laboratorio.

1. Lavarse las manos antes y después del contacto con los pacientes.
2. No reutilizar las jeringas y agujas después de sangrar o punjionar a los pacientes.
3. Desechar jeringas, agujas, recipientes, frascos, gasas y todos los utensilios empleados en la toma y manejo de las muestras, envolviéndolos en papel resistente y cerrando perfectamente el paquete con cinta adhesiva antes de esterilizarlos o incinerarlos.
4. Uso de guantes desechables, cubrebocas y bata cerrada.
5. Uso de lentes o mascarillas si hay riesgo de salpicaduras o contacto con algún aerosol de los pacientes.
6. Pipeteo mecánico de los fluidos patológicos.
7. Desinfectar el lugar de trabajo donde se procesan las muestras con hipoclorito de sodio al 0.5%, formol al 20% o con fenol al 5%, antes y después de usarlo.
8. Manejar las muestras y el material empleado con movimientos lentos y seguros para evitar tirarlos y ocasionar punciones accidentales o cortaduras. En caso de producirse heridas, éstas deberán lavarse energicamente con agua y jabón antiséptico y vigilar al accidentado con reacciones serológicas periódicas.
9. Muchos autores no recomiendan etiquetar en forma especial las muestras de pacientes con SIDA, en vista de que todas las muestras patológicas deben ser manejadas con extremo cuidado, sin embargo, la falta de esta etiqueta podría causar una falsa confianza en el manejo de la muestra.

PRECAUCIONES QUE DEBE TENER EL PERSONAL DE LABORATORIO

1. Mientras se trabaja con material potencialmente infeccioso, se deberá usar bata o uniforme de laboratorio.
2. Se deberá usar guantes para evitar el contacto directo de la piel con sangre, objetos manchados con sangre, líquidos corporales, excreciones, secreciones, así como superficies, materiales y objetos expuestos a esos productos.
3. Lávese las manos con los guantes puestos con hipoclorito de sodio al 5% diluido en agua 1:10, cada media hora.
4. No se deberá comer o fumar en áreas de trabajo.
5. Lavarse la manos después de quitarse la ropa protectora y antes de salir del laboratorio. Se dejará la bata en el sitio de trabajo y sólo se sacará para lavarla.
6. Después de cualquier derrame de material potencialmente infeccioso es preciso limpiar la superficie de trabajo de los laboratorios con hipoclorito de sodio al 5%.
7. No abrir la centrifuga hasta que haya parado totalmente.
8. Limpie la centrifuga con hipoclorito cada vez que se use.
9. No se emplee la boca para succionar líquidos con cualquier clase de pipeta. Úsese pipetas automáticas y perillas de hule para las pipetas de vidrio.
10. Tener un recipiente con hipoclorito para desecho, en el que verterá el material utilizado.

MEDIDAS PREVENTIVAS QUE DEBE VIGILAR EL JEFE DE SECCIÓN

- a) Informar al personal bajo sus órdenes de las medidas de protección que se debe emplear.
- b) Colocar la información con las medidas de seguridad, en un lugar visible
- c) Firmar de enterado todo el personal a su cargo
- d) Proporcionar todo el material necesario para cumplir con las medidas preventivas

MEDIDAS PREVENTIVAS QUE OBSERVARÁ A LA COORDINACIÓN DE TOMA DE PRODUCTOS

- a) Proporcionar el número de guantes y cubrebocas que necesita el personal cada semana
- b) Llevar el control de los guantes y cubrebocas usados diariamente
- c) Todas las agujas, jeringas y demás material desechable que pueden estar contaminados y que se empleen en pruebas de laboratorio, deberán esterilizarse preferiblemente en autoclaves antes de eliminarlas
- d) Cuando se tomen muestras a pacientes aislados, se deberá usar bata y cubrebocas

NORMAS GENERALES PARA EL PERSONAL DE LABORATORIO EN EL MANEJO DE MUESTRAS DE PACIENTES CON VIH+ (SIDA)

El riesgo de adquirir infección por VIH, después de un accidente de laboratorio con muestras contaminadas, es muy bajo; sin embargo, es necesario prevenir al personal, para reducir su exposición al material contaminado.

No obstante que todas las muestras clínicas que llegan al laboratorio deben procesarse con extremo cuidado, conviene que los productos provenientes de pacientes con VIH+ sean etiquetados con las siglas VIH+ SIDA, ya que la mayoría de infecciones accidentales en el laboratorio ocurre cuando se maneja material de estos pacientes, sin conocer su procedencia. Los productos con mayor riesgo de producir accidentes por mal manejo son: secreciones vaginales, orina, heces, sangre y sus derivados, así como líquido cefalorraquídeo, pleural, pus y semen. Las medidas generales que deben adoptarse en el laboratorio para evitar los riesgos de infección están anotados en la sección *Manejo de muestras de alto riesgo*.

Una vez que se tiene sospecha o evidencia de haber derramado líquidos o productos infectados en las superficies del laboratorio, estas deben limpiarse con una solución de hipoclorito de sodio al 0.5% dejando actuar durante 30 minutos; posteriormente se debe lavar la superficie con agua y detergente, usando en todo momento guantes gruesos, el instrumental que se utilizó en el procesamiento de las muestras, debe de sumergirse en la solución de hipoclorito de sodio durante 30 minutos, se esteriliza en autoclave, y posteriormente se lava con agua caliente y detergente. Otros materiales como jeringas, agujas y pipetas, se depositan en recipientes rígidos y cerrados para esterilizarse en autoclave. El material desechable deberá colocarse en doble bolsa e incinerarse, o bien, esterilizarse, en autoclave o calor seco.

Cuando ocurra contaminación en mucosa, se debe lavar la zona afectada con abundante agua, si el derrame es sobre una herida o piel lacerada, habrá que lavar con agua y jabón, posteriormente se deberá aplicar un antiséptico cutáneo. Es conveniente presionar la herida para provocar sangrado.

El accidente deberá comunicarse inmediatamente al jefe de laboratorio para que este dé las indicaciones de seguimiento del caso, que básicamente consiste en identificar al paciente de quien proviene la muestra, y comprobar si es VIH+. Inmediatamente se hará la prueba para determinar el estado de VIH del trabajador. Si el resultado es negativo, se repite la prueba a los 2, 3, 6 y 12 meses; si en alguno de estos últimos estudios la prueba es positiva, se asumirá en principio que el trabajador adquirió la infección por accidente en el laboratorio (14).

CONTROL DE CALIDAD

Las medidas utilizadas se fijan de acuerdo al nivel de cada laboratorio, a sus funciones y a sus programas, pero ninguno de éstos debe dejar de contemplar la vigencia de calidad en el renglon de materiales, cultivos, reactivos y colorantes, equipo y técnicas empleadas

Materiales: Hay que almacenar el material en lugares secos y limpios y desechar el material de vidrieria cuando hay roturas para evitar accidentes. Una vez envuelto y esterilizado el material, deberá almacenarse en lugares limpios y cerrados y no usarlos despues de dos meses de almacenamiento

Cultivos: Se deben de almacenar en lugares secos y frescos. De un lote de medios preparados se separa una parte para hacer pruebas de esterilidad, dejando algunos durante tres dias a temperatura ambiente y otros a 37°C

Hay que probar cada lote de los medios para constatar su efectividad, inoculándolos con hongos para verificar un adecuado desarrollo, o bien sometiendo los medios a pruebas de validacion las cuales se describirán en el apartado de validacion de medios de cultivo

Reactivos y colorantes: Se recomienda no usarlos despues de seis meses de su preparacion y desecharlos si aparecen cambios de coloracion, contaminacion o precipitacion. Solo deben de prepararse las cantidades de reactivos y colorantes que se estimen necesarias para ser utilizadas a corto plazo

Hay que hacerse frotis para observar si hay disminucion de calidad de los colorantes y reactivos, para desecharse de inmediato

Equipo: Es necesario constatar diariamente la temperatura de las incubadoras, refrigeradores y congeladores. Las variaciones de un grado por encima o por debajo de la temperatura seleccionada son aceptables. Las autoclaves deben ser probadas cada vez que se usen, marcando los materiales por esterilizar con cinta testigo como prueba de esterilidad. Se requiere limpiar el interior de la autoclave cada semana, vigilando que el nivel de agua sea el indicado y que los empaques cierren perfectamente para que la presión y la temperatura alcancen los topes deseados. los hornos de calor seco, siempre tendran que contener termómetros que indiquen la temperatura durante el proceso de esterilización, no conviene usar estos hornos para calentar otros materiales diferentes de los que van a esterilizarse

Es conveniente que los microscopios estén siempre limpios, tanto el sistema óptico como las partes fijas, asimismo deberán de quitarse las preparaciones inmediatamente despues de observarlas, cuidando de no humedecer la platina con líquidos de montaje. una vez terminada la observacion se tapanán con cubiertas para protegerlo del polvo. El sistema óptico se ajustará cada vez que sea necesario y se le dará mantenimiento anualmente de limpieza y engrasado (14).

VALIDACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Considerando la importancia que representa el control de calidad de los medios de cultivo, herramienta clave en las determinaciones micológicas y microbiológicas, se deben de validar los medios de cultivo utilizados, sin embargo es necesario enfatizar que cada laboratorio debe auxiliarse, implementar y documentar sus propios procedimientos. A continuación se redacta un modelo de validacion de medios de cultivo

Alcance:

Debe de aplicarse a cada lote de medio de cultivo que se utilice en las determinaciones micológicas. Cada lote de medio de cultivo debe someterse a las siguientes determinaciones

1. Determinación de pH.

Esta se efectuará a 25 °C usando potenciómetro validado o calibrado. Determinar el pH del medio de cultivo cuidando que el electrodo quede sumergido en el seno del medio, a la temperatura indicada por el fabricante, cuando ésta no se especifica en el marbete, hacer la determinación a 25 °C +/- 2 °C, de ser necesario ajustar el pH del medio con soluciones de HCl o NaOH 0.5 M según se requiera.

2. Prueba de esterilidad

Se recomienda someter a esta prueba al 4% de las unidades preparadas incubando a 35 - 37 °C (24 - 48 horas) o bien a 20 - 25 °C (5 - 7 días), la incubadora debe de estar validada. Para lo anterior es necesario saber la forma de esterilizar adecuadamente por los siguientes métodos.

2.1 Esterilización por calor húmedo (autoclave).

Este proceso está destinado para esterilizar todo, medio de cultivo o solución que soporte temperatura de 122 °C +/- 1 °C.

1. Distribuir los volúmenes no mayores de las 2/3 partes de la capacidad del recipiente previamente estériles y limpios (tubos, matraces, frascos)
2. Todo material a esterilizar debe cubrirse de tal forma que permita la penetración del vapor, si se utilizan recipientes con tapon de rosca, este debe procesarse con el tapon a medio cerrar (no utilizar papel aluminio ni celofán)
3. Los ciclos de esterilización deben de programarse de acuerdo a las instrucciones del fabricante del medio de cultivo.
4. Distribuir el medio de cultivo en recipientes de capacidad semejante, preferentemente no mezclar recipientes de diferentes capacidades.
5. Cuando el volumen sea mayor de 100 ml, el tiempo de esterilización debe de establecerse durante la validación del equipo.
6. Operar el esterilizador (autoclave) de acuerdo a las instrucciones del equipo (generalmente a 121 °C durante 15 a 20 minutos)
7. Al término del proceso no abrir la puerta antes de que la temperatura del autoclave baje a 70 °C
8. Todo medio de cultivo debe identificarse incluyendo como mínimo la fecha de esterilización y el nombre.
9. Separar parte del material para su evaluación de calidad de acuerdo al procedimiento "Promoción de crecimiento"
10. Los medios esterilizados deben de colocarse en el área destinada y almacenarse en las condiciones establecidas por el fabricante.

2.2 Esterilización por filtración

Este proceso se aplica a medios de cultivo o soluciones que contengan ingredientes termolábiles.

1. Los aparatos utilizados para la filtración deben de estar estériles y perfectamente limpios.
 2. Deben de utilizarse filtros de esteres de celulosa o equivalente con una porosidad máxima de 0.22 micras.
 3. El recipiente receptor del medio o solución debe de estar estéril.
 4. Todos los pasos subsecuentes deben efectuarse en condiciones asepticas.
 5. Preparar el equipo utilizado para la filtración bajo procedimientos internos.
 6. Si el equipo a usar contiene más de 2 plazas (embudos) comprobar en uno de ellos su esterilidad haciendo pasar a través de él, 100 ml de solución diluyente estéril (salina isotónica, solución amortiguadora de fosfatos, agua destilada) y ensayar bajo la siguiente metodología
- Adicionar al diluyente filtrado 100 ml de caldo de soya tripticaseína estéril o un medio equivalente preparado al doble de concentración.

- Incubar el matraz a 32 - 37 °C durante 7 días (observar periódicamente) Registrar los resultados en la libreta correspondiente
 - Todo medio esterilizado debe almacenarse de acuerdo a las condiciones establecidas por el fabricante.
7. En las restantes plazas se efectúa el proceso de esterilización haciendo pasar la solución o medio de cultivo a través del recipiente filtrante
 8. Distribuir el material filtrado en los recipientes estériles deseados e identificarlos perfectamente incluyendo como mínimo la fecha de esterilización y el nombre
 9. Separar parte del material para su control de calidad de acuerdo al procedimiento "Promoción de crecimiento"

Nota: Cada proceso de esterilización debe registrarse en una libreta conteniendo los siguientes datos:

- Fecha del proceso
- Condiciones del proceso (tiempo, temperatura y/o presión)
- Porosidad de la membrana
- Material procesado
- Nombre y firma del operador
- Uso del material

3. Prueba de promoción de crecimiento

El propósito de esta prueba es el demostrar que los diferentes tipos de medios de cultivo que se emplean cumplen con el fin para el cual fueron diseñados

Procedimiento:

Los microorganismos empleados en las pruebas de promoción de crecimiento deben de formar parte de la colección de cada laboratorio y deben de estar identificadas. La selección de ellas depende del tipo de medio de cultivo por estudiar

Si el medio pretende inhibir específicamente un cierto microorganismo o a un grupo de ellos, incluirlos en el ensayo, en tales casos debe observarse tanto la intensidad del desarrollo de los microorganismos deseables como las características de sus colonias (tamaño, color)

Para determinar el grado de inhibición que muestre el lote ensayado, incluir simultáneamente en la prueba un medio no inhibitorio.

Los medios indicadores se prueban con cepas de referencia de comportamiento bien definido, tanto en sentido positivo como negativo para cada sustrato en estudio

Preparación y estandarización del inoculo (microorganismo a prueba).

Los cultivos empleados deben de ser recientes de 24 - 48 horas para hongos levaduriformes, y de 7 a 28 días para hongos filamentosos. Las temperaturas de incubación serán las óptimas para el microorganismo de que se trate

Método:

1. La cosechar de cada microorganismo de prueba se suspende en solución salina fisiológica (0.85%), regulador de fosfatos pH 6.9 +/- 0.1.
2. Preparar una suspensión con el diluyente seleccionado, de tal forma que a 580 nm dé una lectura espectrofotométrica entre 50 y 80% de transmitancia.

3. A partir de la suspensión obtenida preparar diluciones decimales y mediante la técnica de vaciado en placa, seleccionar aquellas en las que se encuentren aproximadamente 10, 100 y 1000 UFC/ml, para este recuento utilizar agar para métodos estándar.

Medios de cultivo líquidos

1. Preparar un volumen determinado del o de los medios de cultivo a probar
2. A cada uno de los tubos o recipientes que contienen el medio de cultivo, adicionar 1.0 ml, de la suspensión del microorganismo de prueba que contenga entre 10 y 100 UFC/ml
3. Simultáneamente sembrar por duplicado 1.0 ml de la suspensión para la cuenta en placa, con el fin de confirmar la viabilidad y recuperación del inóculo

Interpretación:

- Si los tubos o recipientes que contienen el medio de cultivo inoculado presentan turbiedad y la cuenta en placa es la esperada, la prueba de promoción de crecimiento es correcta y el lote del medio de cultivo se aprueba para su uso
- Si no se presenta desarrollo en los medios líquidos y la cuenta en placa es correcta, el lote del medio de cultivo debe rechazarse
- Si no se presenta desarrollo en los medios líquidos ni en las placas, debe verificarse la viabilidad de los inóculos empleados y repetir la prueba
- Todo resultado deberá registrarse en la libreta o formato correspondiente

4. Estabilidad

Periódicamente efectuar los puntos 1, 2 y 3, a los medios de cultivo preparados y almacenados, tanto para establecer si las condiciones de almacenamiento fueron apropiadas como para determinar la vida útil de cada medio de cultivo (caducidad)

Validación del proceso de esterilización por calor húmedo

Objetivo: Garantizar la efectividad del proceso de esterilización por calor húmedo

Procedimiento:

1. Cargar el autoclave, según la configuración establecida y colocar los indicadores biológicos en las posiciones asignadas
 - Tiras de discos de esporas de *B. stearothermophilus* con una concentración mínima de esporas de 10 a la 5/tira de disco.
 - Ampulas con esporas de *B. stearothermophilus* con un concentración mínima de 10 a la 3 a 10 a la 5/ampula conteniendo medio de cultivo con indicador
 - Suspensión o liofilizado de esporas de *B. stearothermophilus* con una concentración mínima de esporas 10 a la 6/unidad
 - Los indicadores biológicos deben de ubicarse dentro o muy cercanos a los recipientes a validar.
 - Cada estudio deberá desafiarse con un mínimo de 5 indicadores biológicos y un máximo de 20 indicadores biológicos tratando de monitorear toda la cámara
2. Correr el ciclo de esterilización tomando lecturas de presión y temperatura durante el proceso
Terminado el ciclo de prueba, incubar los indicadores de la siguiente forma (dependerá de la presentación)

- Indicador biológico en tiras de papel o liofilizado. Sembrar las muestras aseptícamente en tubos que contengan 10 ml de caldo soya tripticaseina (CST) estéril. Incubar los tubos entre 55 - 60 °C y observarlos diariamente hasta completar 7 días de incubación (o bien de 35 - 37 °C).
 - Indicador biológico en ampollita conteniendo medio de cultivo e indicador de pH (generalmente púrpura de bromocresol), incubar las ampollitas a 55 - 60 °C durante un periodo mínimo de 7 días.
 - Indicador biológico en tira impregnada con medio de cultivo deshidratado e indicador de pH. Colocar las tiras aseptícamente en 3 ml de agua destilada estéril, agitar e incubar a 55 - 60 °C durante 7 días (o bien a 35 - 37 °C).
3. Debe de incluirse un control positivo e incubarse en las mismas condiciones que en el inciso anterior para cada presentación del indicador biológico.
 4. Los medios de cultivo utilizados durante la prueba debe de haber cumplido con la prueba de promoción de crecimiento.

Criterio de aceptación:

- Para ciclos cuya temperatura nominal sea de 121 °C se permite una caída de la temperatura de 1.5 - 2 °C, siempre y cuando esta caída no se observe durante más de 5 minutos.
- El crecimiento debe de ser negativo para los indicadores biológicos de prueba y positivo para el control, con el siguiente criterio para cada presentación.
- Indicador biológico en tiras de papel y liofilizado. Las muestras inoculadas en CST no presentan turbiedad en el medio después de la incubación.
- Indicador biológico en ampollita. No se observa turbiedad en el medio de cultivo y el color del indicador no se modifica después del periodo de incubación. El control positivo presenta turbiedad del medio de cultivo y vire del indicador debido a la producción de ácido a las 24 - 48 horas.

Nota: Si se observa vire del indicador a las 24 - 48 horas sin crecimiento opalescente, reincubar por 48 horas más y asegurarse mediante una siembra en placa, la presencia y/o ausencia de células viables.

- Indicador biológico en tira impregnada de medio de cultivo deshidratado e indicador de pH. El criterio es el mismo que en el punto anterior.

Validación del proceso de esterilización por calor seco

Objetivo: Garantizar el proceso de esterilización por calor seco.

Procedimiento:

1. Cargar el horno según la configuración establecida y colocar los indicadores biológicos (tiras de papel conteniendo esporas de *Bacillus subtilis* Var *Niger* a una concentración mínima de 10 a la 8 esporas/unidad) en las posiciones asignadas.
2. Correr ciclo de esterilización tomando lecturas de temperatura durante el proceso.
3. Terminado el ciclo de prueba, sembrar individualmente las tiras conteniendo el indicador biológico en tubos que contengan 10 ml de CST estéril. Incluir un control positivo.
4. Incubar los tubos a temperatura de 30 - 35 °C y observarlos diariamente durante 7 días.

Criterio de aceptación:

- Las lecturas de temperatura deben de ser constantes con variaciones de +/- 10 °C.
- El crecimiento de los indicadores biológicos debe ser negativo después de 7 días de incubación. El control positivo debe presentar crecimiento satisfactorio después de 24 - 48 horas de incubación.

Validación del proceso de esterilización por filtración

Objetivo: Demostrar la integridad de la membrana de filtración y su capacidad para retener los microorganismos presentes en soluciones y medios de cultivos no esteriles.

Procedimiento:

1. La membrana filtrante se somete a una prueba de reto (desafío) con *Pseudomonas diminuta* ATCC 19146 (para membranas cuyo diámetro de poro es de 0.22 micras) y *Serratia marcescens* (para membranas cuyo diámetro de poro es de 0.45 micras) en concentraciones de 10 a la 3 a 10 a la 7 y de 10 a la 4 a 10 a la 8 células/ml respectivamente
2. Preparación de los microorganismos de prueba
 - Estriar por separado cada una de las cepas de desafío en placas de AST
 - Incubar las placas durante 24 - 48 horas a 30 - 35 °C
 - Transferir una asada de cada microorganismo de prueba a cada uno de los matraces que contengan 50 ml de CST estéril
 - Incubar a 30 - 35 °C +/- 0.5 durante 24 horas
 - A partir de los cultivos obtenidos en el paso anterior, preparar diluciones decimales hasta las concentraciones especificadas anteriormente en el punto 1, utilizando como diluyente CST
 - Mediante la técnica de vaciado en placa y usando agar soya tripticaseína, determinar el número de UFC en cada una de las diluciones incubando éstas a 30 - 35 °C +/- 0.5, durante 48 horas
 - Seleccionar la dilución de *Pseudomonas diminuta* que muestre 10 a la 3 y 10 a la 7 UFC/ml, y la de *Serratia marcescens* que muestre 10 a la 4 y 10 a la 8 UFC/ml
3. Filtración:
 - Prepare el equipo bajo procedimiento adecuadamente establecido
 - Filtrar asépticamente aplicando una presión de 2.8 kg/cm²
 - Incluir en el proceso testigos negativos
 - Incubar el material filtrado y los controles a 30 - 35 °C +/- 0.5, durante 7 días con revisiones diarias

Criterio de aceptación:

Testigo positivo: Debe presentar crecimiento en un periodo máximo de 48 horas.

Testigo negativo: No debe de presentar crecimiento

Si los medios de cultivo filtrados no presentan crecimiento al final del periodo de incubación, se considera que los microorganismos de desafío son retenidos

Si se presenta un crecimiento en los medios de cultivo filtrados, es indicativo que:

- Una mala colocación de la membrana en el sistema de filtración (por lo que debe verificarse que se coloque correctamente).
 - Una membrana defectuosa.
 - Un proceso de esterilización defectuoso.
 - Una distribución heterogénea del diámetro del poro especificado.
- Debe por lo tanto determinarse la causa de la falla.

Documentación:

Cada prueba debe de registrarse en una libreta o en un formato que contenga por lo menos los siguientes datos:

- Marca.
- Lote.
- Código.
- Tamaño
- Tamaño de poro.
- Resultados.
- Aceptado y/o rechazado. (15).

2a PARTE:

RESULTADOS EXPERIMENTALES DE LABORATORIO

TABLA DEL LUGAR DE AISLAMIENTO Y TIPIFICACIÓN DE DERMATOFITOS

PACIENTES DEL CENTRO DERMATOLÓGICO PASCUA	LABORATORIO DE PRODUCCIÓN DE LA F.E.S. ZARAGOZA
<i>Epidermophyton floccosum</i>	<i>Microsporium nanum</i> *
<i>Microsporium canis</i>	<i>Microsporium fulvum</i> *
<i>Microsporiumypseum</i>	<i>Trichophyton schoenleinii</i> *
<i>Trichophyton rubrum</i>	<i>Trichophyton terrestre</i> *
<i>Trichophyton tonsurans</i>	<i>Trichophyton verrucosum</i> *
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>Trichophyton soudanense</i> *
	<i>Trichophyton violaceum</i> *

* Los siguientes microorganismos (que no se han logrado aislar en México) se obtuvieron del laboratorio de Producción de la F.E.S. ZARAGOZA.

Todos estos microorganismos se aislaron y tipificaron mediante crecimiento en tubos, cajas y microcultivos hasta obtener cepas puras de acuerdo a la literatura de micología consultada. Una vez obtenidas las cepas puras se determinó el tiempo de crecimiento óptimo a cada uno de los dermatofitos mencionados de la siguiente manera:

CRECIMIENTO EN TUBOS, CAJAS Y MICROCULTIVO:

Cada tubo, caja y microcultivo se leyó cada 24 hrs hasta determinar el punto óptimo de crecimiento y parar el mismo. Los resultados en días de crecimiento óptimo para tubo, caja y microcultivo de cada microorganismo se muestra en la siguiente tabla:

TIEMPO DE CRECIMIENTO EN AGAR DEXTROSA DE SABAURAU (EN DIAS)

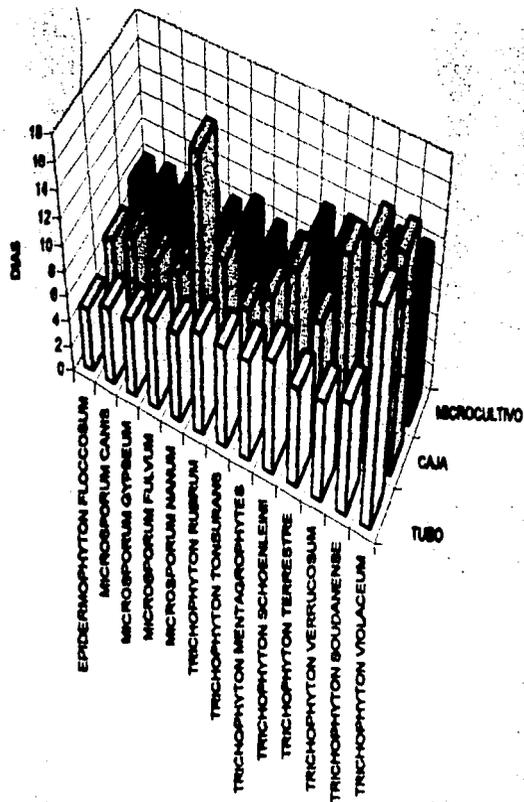
	TUBO	CAJA	MICROCULTIVO
<i>Epidermophyton floccosum</i>	5	7	8
<i>Microsporum canis</i>	6	8	8
<i>Microsporum lysatum</i>	6	7	8
<i>Microsporum fulvum</i>	7	7	8
<i>Microsporum lanosum</i>	7	17	8
<i>Trichophyton rubrum</i>	8	10	9
<i>Trichophyton tonsurans</i>	8	7	8
<i>Trichophyton mentenophyces</i>	8	9	8
<i>Trichophyton schoenleinii</i>	9	12	11
<i>Trichophyton terrestric</i>	8	9	11
<i>Trichophyton verrucosum</i>	8	15	11
<i>Trichophyton soudanense</i>	9	17	12
<i>Trichophyton violaceum</i>	17	17	12

NOTA: Se repitió el cultivo en tubo 25 veces y en caja 20 veces de cada dermatofito y se repitió 25 veces el microcultivo de los hongos ya aislados.

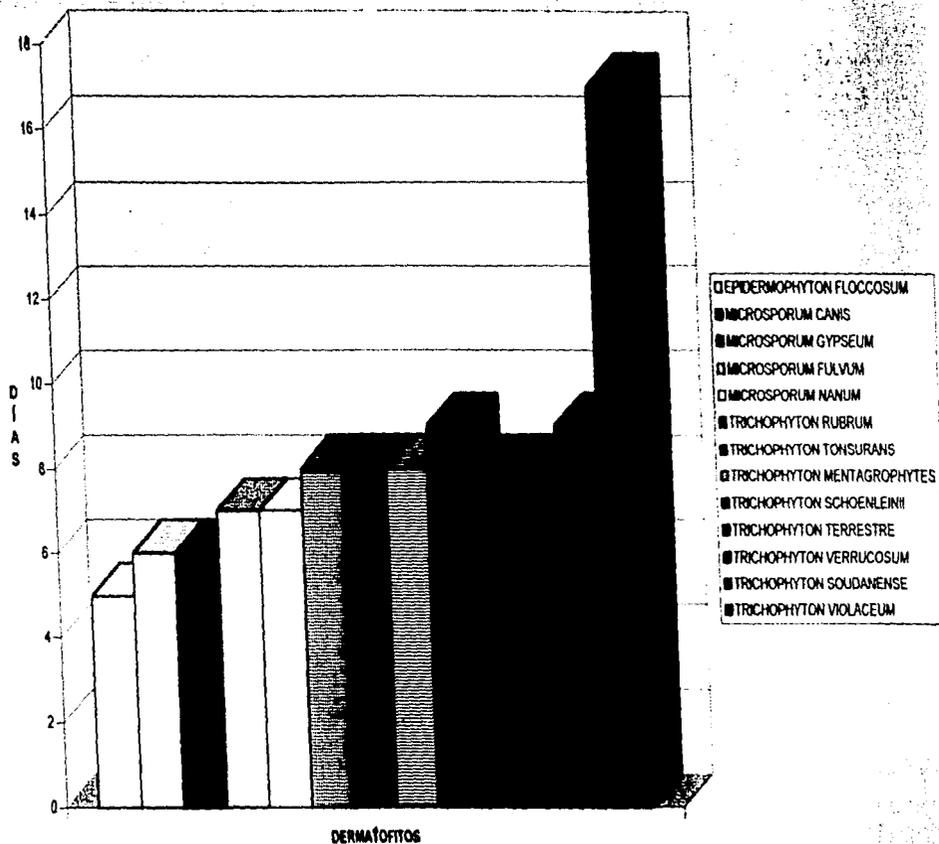
De los datos anteriores se integran las siguientes tablas de crecimiento

GRÁFICAS

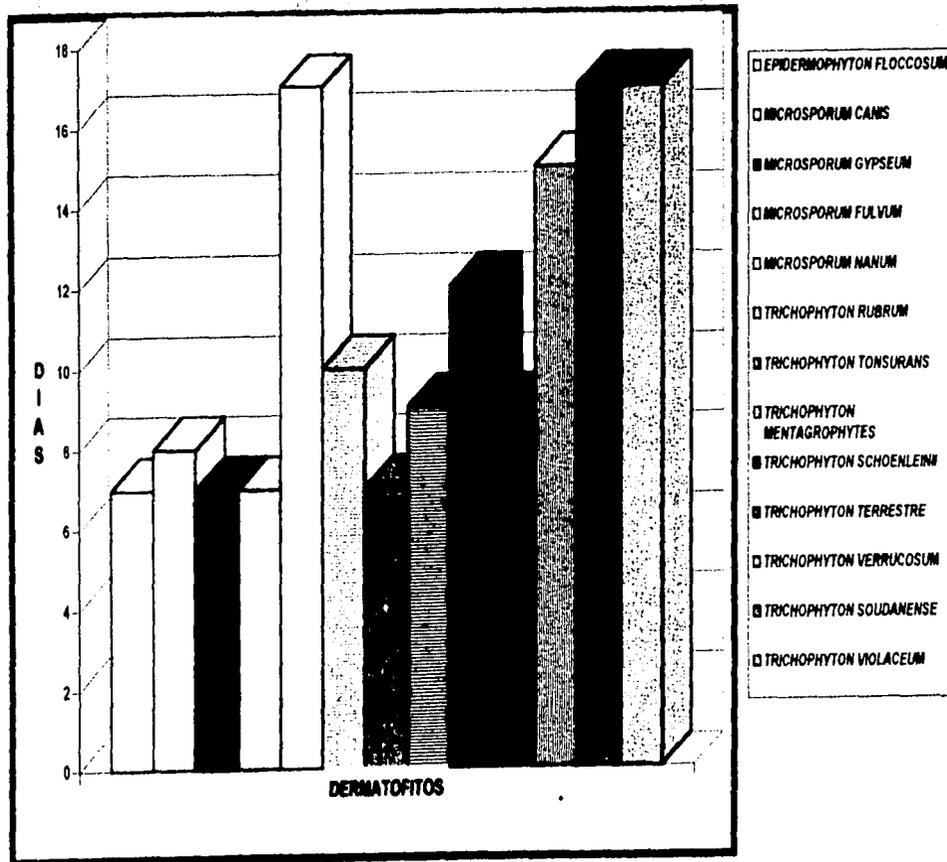
GRÁFICA DE CRECIMIENTO DE DERMATOFITOS



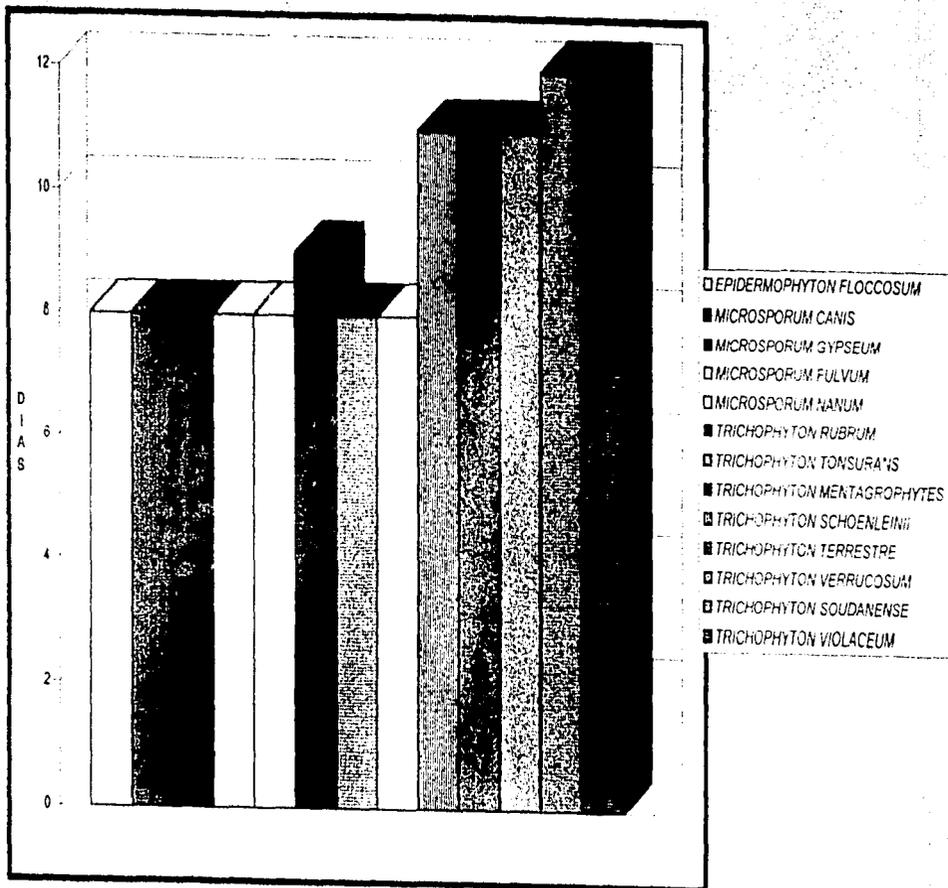
GRÁFICA DE CRECIMIENTO EN TUBO



GRAFICA DE CRECIMIENTO EN CAJA



GRAFICA DE CRECIMIENTO EN MICROCULTIVO

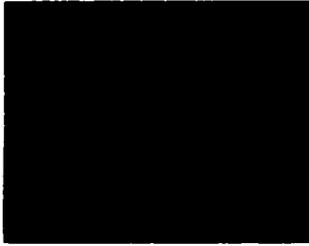


La tipificación de cada microorganismo se hizo de acuerdo a sus características macroscópicas y microscópicas y se corroboró con la literatura micológica consultada, obteniéndose los siguientes datos:

	CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS	CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS	AISLAMIENTO
<u><i>Epidermophyton floccosum</i></u>	Colonias blancas, con micelio aterciopelado con surcos radiales Reverso de color crema	Macroconidias en forma de mazo de pared delgada y multitabacadas	Centro dermatológico Pascua
<u><i>Microsporum canis</i></u>	Colonias blancas a amarillas, con micelio algodonoso-lanudo o polvoriento, de color ante en el centro Reverso color amarillo-ámbar	Macroconidias espiculadas de pared gruesa, fusiforme (semilla) con 7-8 lóbulos	Centro dermatológico Pascua
<u><i>Microsporum gypseum</i></u>	Colonias blancas con centro pardo-crema con surcos radiales y micelio algodonoso Reverso color amarillo-pardo	Macroconidias de pared delgada, espiculada y elipsoidales con 4-6 lobuladas	Centro dermatológico Pascua
<u><i>Microsporum fulvum</i></u>	Colonias blancas con centro ligeramente elevado de color ante claro y se tornan polvorizantes Reverso color amarillo-ante	Macroconidias en forma de semillas de ajonjolí de pared delgada, con 4-6 lobuladas, se tiñen en menor intensidad que las hifas	Laboratorio de producción de la I. E. S. Zaragoza
<u><i>Microsporum nanum</i></u>	Colonias umbonadas blancas, que se tornan polvorizantes y de color ante, con crecimiento radial Reverso de color ante	Macroconidias con lobulos, en forma de pera y de tamaño ligeramente pequeño	Laboratorio de producción de la I. E. S. Zaragoza
<u><i>Trichophyton rubrum</i></u>	Colonias umbonadas, con micelio aterciopelado de color blanco y crecimiento radial, en tubo produce un color vino Reverso color rojo-vinoso	Macroconidias alargadas, de pared delgada y tabicadas	Centro dermatológico Pascua
<u><i>Trichophyton tonsurans</i></u>	Colonias blancas con centro amarillo, con relieves y hundimiento, micelio aterciopelado corto (bajo) Reverso color ámbar.	Macroconidios alargados de pared delgada y tabicadas (de 6-8 tabiques)	Centro dermatológico Pascua

	CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS	CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS	 AISLAMIENTO
<u><i>Trichophyton mentagrophytes</i></u>	Colonias umbonadas, blancas con micelio aterciopelado corto y con crecimiento radial Reverso de color amarillo-ante	Macroconidios alargados en forma de lápiz, de pared gruesa, tabicados (6-8 tabiques)	Centro dermatológico Pascua
<u><i>Trichophyton schoenleinii</i></u>	Colonias pequeñas de color blanco-ante, de aspecto liso, acuminado y cerebriforme, con crecimiento lento. Reverso color ante.	No presenta macroconidios, se observan en las hifas las estructuras llamadas "candelabros favicos".	Laboratorio de producción de la F. E. S Zaragoza
<u><i>Trichophyton terrestre</i></u>	Colonias blancas con centro de color crema a ante y micelio aterciopelado Reverso color ante-amarillo	Microconidias que salen de la hifa basal formando un ángulo de 90°, son menos pigmentadas las hifas que las primeras, la punta de la hifa puede estar enrollada o formando una clamidiospora, las macroconidias son en forma de lagrima y escasas	Laboratorio de producción de la F. E. S Zaragoza
<u><i>Trichophyton verrucosum</i></u>	Colonias umbonadas de color blanco-ante, con micelio de tipo aterciopelado corto y de crecimiento lento. Reverso color ante	En SDA forman hifas delgadas y clamidiosporas a lo largo de la hifa cuando el cultivo es maduro, en SDA no presentan macroconidias, solo microconidias en forma de lagrimas	Laboratorio de producción de la F. E. S Zaragoza
<u><i>Trichophyton soudanense</i></u>	Colonias blancas con centro crateriforme y pliegues profundos hacia las orillas. Reverso color amarillo a anaranjado	Hifas septadas que nacen de la hifa basal o madre formando un ángulo de 90°, no presenta macroconidias, pero si hay atroconidios en forma de lagrimas pequeñas	Laboratorio de producción de la F. E. S Zaragoza
<u><i>Trichophyton violaceum</i></u>	Colonias blancas con centro umbonado y micelio aterciopelado corto. Reverso color blanco-ante	Se observan hifas en forma de astas de tenos con escasa producción de macroconidias	Laboratorio de producción de la F. E. S Zaragoza

FOTOGRAFIAS



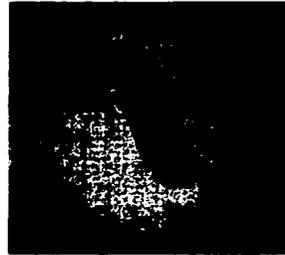
Epidermophyton floccosum



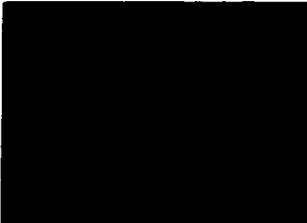
Microsporium canis



Microsporium gypsum



Microsporium nanum



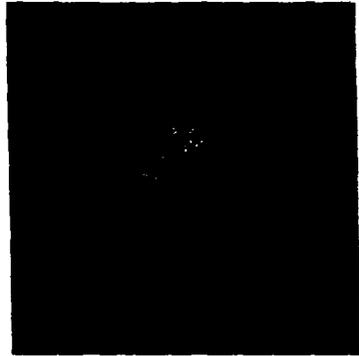
Microsporium fulvum



Trichophyton tonsurans



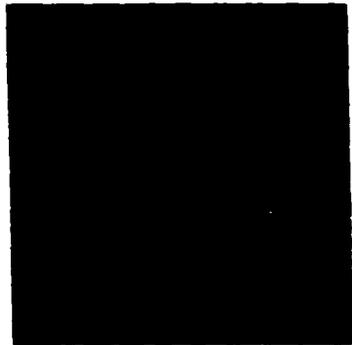
Trichophyton mentagrophytes



Trichophyton rubrum



Trichophyton soudanense



Trichophyton terrestris

ANÁLISIS DE RESULTADOS

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Para fines prácticos se desglosan de la manera siguiente

1. **Aislamiento de los dermatofitos de pacientes.** Las zonas físicas mas problemáticas para tomar la muestra de estudio, fueron las zonas genitales y perianal, debido a la pena que experimentan los pacientes, así mismo los niños impedían una toma de muestra adecuada debido a su constante movimiento
2. **Purificación y tipificación de los dermatofitos.** El principal obstáculo fue el estar aislando a los hongos por medio de resiembras, debido a que en una muestra en ocasiones se encontraban más de un dermatofito e inclusive también levaduras, para su identificación también hubo problemas debido que no hay mucho material bibliográfico para poder comparar los dermatofitos obtenidos de manera individual, además de que la morfología colonial no siempre fue la ideal
3. **Transporte** Se tuvo problemas al transportar las cepas desde el centro dermatológico PASCUA hasta el laboratorio de producción de la F E S Zaragoza donde se continuó con el trabajo experimental, debido a que los tubos de transporte carecían de tapa de toska y la que tenían eran de algodón, corriendo el riesgo de desatarse y contaminarse
4. **Resiembra:** En primer lugar las cepas otorgadas por el centro dermatológico PASCUA ya eran un poco viejas por lo que costo un poco de trabajo su nuevo crecimiento, en ADS (agar dextrosa de Sabouraud)
5. **Morfología colonial** Fue necesario repetir las resiembras de cada dermatofito en
Caja: Se repitieron 20 veces
Tubo: Se repitieron 25 veces
Teniéndose que observar cada 24 hrs después del tercer día de siembra para corroborar las características morfológicas coloniales de cada dermatofito, con la bibliografía correspondiente, tanto en tubo como en caja
6. **Microcultivo.** Para determinar la morfología microscópica hubo que hacerse 25 microcultivos de cada dermatofito y leerlos de uno en uno cada 24 hrs a partir del 7º día al 12º día para encontrar las estructuras sexuales características de cada hongo para compararse con la bibliografía respectiva, lográndose así su identificación de cada dermatofito
7. **Con todo lo anterior se discute la técnica de tinción la cual se probó, tanto la clásica y la modificada ambas se encuentran desglosadas en el presente trabajo, lográndose observar mejor las estructuras fúngicas con la técnica modificada**

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Con el presente trabajo se concluye lo siguiente

1. Se recopilaron los metodos de tincion, medios de cultivo, microcultivo para dermatofitos, como material de apoyo para las areas afines, para posteriormente implementar un manual de procedimientos
2. Se observo que la técnica de tincion modificada es superior a la clasica, lograndose observar mejor las estructuras fungicas con la primera, que con la segunda tecnica
3. Se formo y organizo un cepario de dermatofitos mas comunes en el area urbana y suburbana de la ciudad de México, se logro cumplir este punto satisfactoriamente, y con el presente trabajo se puede dar los primeros pasos para la implantación de un laboratorio de micología medica
4. Se espera que el laboratorio una vez instalado, pueda servir para la docencia, el servicio y la investigación, micológica y dermatologica para las carreras afines
5. Se sugiere una tesis o servicio social, para la generacion de material biologico y didactico
6. Es necesario recopilar bibliografia referente a levaduras patogenas, oportunistas y hongos oportunistas; asi como realizar un cepario y preparaciones fijas de los microorganismos anteriores, con el proposito de tener un marco de referencia en dado caso de que llegará a obtenerse una muestra de este tipo en algún paciente
7. Con base en los resultados obtenidos en la tesis se sugiere probar tiempo optimo de crecimiento para microcultivos, en cada dermatofito, estandarizando las condiciones de humedad y temperatura.
8. Con base en los resultados obtenidos en la tesis, se sugiere probar diversas técnicas de tinción en diferentes tiempos.
9. Con esta tesis se dan los puntos teóricos, prácticos y legales para la instalación de un laboratorio de micología médica.

ANEXOS

ANEXO 1

TÉCNICAS ALTERNATIVAS DE TINCIÓN

Azul de metileno

Azul de metileno	1 g
Alcohol	60 ml.
Agua destilada	250 ml.

Para exámenes en fresco o coloraciones compuestas hay que mezclar los tres componentes y utilizar la mezcla. Los hongos adquieren un color azul semejante al azul de algodón, aunque el hongo se observa más intenso que el fondo de el campo. Es muy útil para la observación de *C. minutissimum* (agente causal del *crurisma*).

Zafranina

Zafranina	0.5 g
Agua destilada	100 ml

Hay que diluir el colorante con el agua destilada y emplear la disolución. Los elementos fúngicos se tiñen de color rojo intenso, y el resto del campo toma un tono incoloro o rosa pálido. Esta técnica de tinción es útil para el estudio de cultivos y productos biológicos líquidos.

Tinción negativa con tinta china

Es una tinción especial para visualizar *C. neoformans* en I.C.R., improntas o exámenes directos de cultivos.

La tinta china se emplea en una dilución de 1:2 con agua destilada.

La técnica consiste en colocar una gota del producto biológico por examinar y una gota de tinta china separadas por unos 3 mm, sobre ellas se coloca un cubreobjetos y se procede a la observación.

C. neoformans se observa sin teñir con la cápsula refringente y una pequeña levadura en su interior, en tanto que el campo de observación tiene un fondo negro.

Hidróxido de potasio - tinta negra (Parker 51)

Es útil para teñir principalmente filamentos y levaduras de escamas de pacientes con pitiriasis versicolor.

La técnica es simple y consiste en aplicar sobre las escamas por estudiar una gota de KOH - tinta Parker, después se aplica un cubreobjetos y se procede a observar.

KOH	94 ml.
Tinta Parker 51	6 ml.

Gram

Se emplea para teñir productos biológicos líquidos, exudados de lesiones, improntas y macerados de biopsia. Todos los hongos son positivos a la coloración de Gram. *C. neoformans*, que por la presencia de la capsula no toma la coloración; también es útil para teñir algunos Actinomicetales causantes de seudomicosis.

Procedimiento

1. Hacer un frotis y fijarlo con calor.
2. Cubrir con cristal violeta durante un minuto y después lavar ligeramente con agua corriente.
3. Cubrir con Lugol durante un minuto y lavar con agua corriente
4. Decolorar con una cantidad de 10 a 20 gotas de una solución de alcohol - acetona al 50%, y lavar con agua corriente.
5. Cubrir con safranina durante 30 segundos y lavar ligeramente con agua corriente, dejar secar y observar

Giemsa

Es útil para detectar *H. capsulatum* y *P. marneffei*, hongos que con otras técnicas resulta en ocasiones difíciles de identificar.

Procedimiento:

1. Hacer un frotis y cubrir con etanol al 100%
2. Dejar secar al aire.
3. Cubrir con 10 gotas de colorante de Giemsa durante un minuto
4. Cubrir con un buffer de agua destilada durante 5 minutos
5. Lavar con agua destilada y dejar secar.

Las levaduras de *H. capsulatum* y *P. marneffei* se ven de color rosa, rodeadas de una zona sin teñir en el interior de los macrofagos, se observa un fondo azul.

Fite

Procedimiento:

1. Pasar el frotis por dos baños de cinco minutos cada uno en una mezcla de tolueno (2 volúmenes) y aceite mineral o vegetal (un volumen).
2. Secar con papel filtro.
3. Decolorar con alcohol ácido (5% de ácido láctico).
4. Lavar con agua corriente.
5. Teñir con azul de metileno como contraste durante 3 minutos
6. Lavar con agua corriente.
7. Secar al aire y observar.

Las bacterias del género *Nocardia* toman un color rojo y cualquier otro Actinomicetal toma un color azul igual a la coloración del fondo.

Tinción de ascas y ascosporas de levaduras

Esta técnica permite visualizar las ascas y las ascosporas de todos los hongos, y es especialmente útil cuando se trata de visualizar levaduras de *Hemiascomycetes*, ya que con las tinciones habituales es muy difícil distinguir sus formas sexuales

Reactivos:

- | | |
|------------------------|---------|
| a). Verde de malaquita | 7.60 g. |
| Agua destilada | 100 ml. |
| b). Safranina | 0.25 g. |
| Agua destilada | 100 ml. |

procedimiento:

1. Preparar un frotis de la levadura y dejar secar
2. Cubrir con verde de malaquita durante 5 minutos y después calentar ligeramente.
3. Eliminar el exceso de colorante con agua corriente
4. Cubrir con safranina durante 30 segundos
5. Lavar con agua corriente y dejar secar

Las ascas y las ascosporas se tiñen de color verde, en tanto que las levaduras toman una coloración roja

Fite con cortes histológicos

Técnica:

1. Desparafinar los cortes sumergiendolos durante 10 a 20 minutos en dos recipientes (vasos de Koplín) sucesivos conteniendo una mezcla de un volumen de aceite de cacahuete (mani), de oliva o de algodón y 2 volúmenes de xilol.
2. Secar con papel filtro hasta que se observe opaco
3. Quitar los cristales residuales con solución de yodo (tintura) durante 2 minutos, seguida de una solución de hiposulfito o tiosulfato de sodio o alcohol
4. Lavar con agua corriente.
5. Teñir en frío con carbofucsina durante un periodo de 15 a 20 minutos
6. Lavar con agua corriente.
7. Decolorar con alcohol ácido durante un periodo de 1 a 2 minutos hasta obtener una coloración rosa pálido.
8. Lavar con agua corriente
9. Dejar secar y observar.

Tinción de Kinyoun

Se emplea para teñir bacilos parcialmente resistentes al ácido alcohol. Es principalmente útil en el caso de los Actinomicetales del género *Nocardia* que se decoloran en exceso con la técnica de Ziehl - Neelsen habitual

Técnica:

1. Preparar un frotis de material por teñir.
2. Cubrir en frío durante cinco minutos con carbofucsina de Kinyoun
3. Lavar con agua corriente.
4. Remover el exceso de colorante con etanol al 50 %.
5. Lavar con agua corriente.
6. Decolorar con ácido sulfúrico al 1 % durante un periodo de 2 a 3 minutos.
7. Lavar con agua corriente.
8. Cubrir con azul de metileno durante un minuto.
9. Lavar con agua corriente, dejar secar y observar.

Los actinomicetales se teñirán de rojo y se observarán en un fondo azul.

Ácido peryódico de Schiff (PAS)

Es útil para especímenes, sobre todo en aquellos casos en donde el examen con KOH ha resultado negativo

Técnica:

1. Sumérgase los cortes en alcohol al 95 % o absoluto para asegurar la adherencia de las raspaduras sobre la laminilla si se trata de escamas hay que fijarlas con albúmina de Meyer
2. Enjuáguese en agua corriente
3. Colóquese la laminilla en el ácido peryódico de Schiff al 0.5% por dos minutos
4. Lavar con agua corriente
5. Agregar reactivo de Schiff + DMS (dimetilsulfoxido) al 0.5% por 1-2 minutos
6. Lavarse con agua corriente
7. Cubrir con verde brillante durante 1 a 2 minutos.
8. Lavar con agua corriente durante 10 minutos
9. Decolorar y deshidratar en baños de alcohol al 70, 80 y 95% (dos minutos por baño).
10. Pasar por dos baños de xileno (dos minutos por baño)
11. Montar en resina sintética

Preparación de la albúmina de Meyer.

1. Batir una clara de huevo a punto de turrón
2. Agregar un volumen de glicerina igual a la clara prebatida
3. Mezclar lentamente hasta homogeneizar
4. Agregar un cristal de TIMOL como conservador y filtrar
5. Mantener en reposo a 4 °C durante 24 horas

Los filamentos fúngicos, conidios y esporas aparecen rojos o rosa intenso. El cemento de algunos granos en los micetomas (*Maduraella mycetomatis*) adquieren un color amarillo o naranja. Los núcleos celulares se ponen verde y la colágena, verde claro; el glucógeno y la mucina rojas. El citoplasma que es verde en general, adquiere un tinte rosa.

Azul de policromo

Es una técnica útil para teñir a *M. furfur*, el hongo se observa de color violeta claro en un fondo azul.

Técnica:

1. Fijar el producto biológico al portaobjetos con albúmina de Meyer.
2. Flamear ligeramente y dejar secar.
3. Lavar con solución de Carnoy durante un periodo de 20 a 30 minutos y dejar secar.
4. Teñir con azul de policromo durante 20 minutos.
5. Lavar con agua corriente
6. Diferenciar con agua acidulada (ácido acético al 1%) durante un minuto
7. Lavar con agua corriente.
8. Deshidratar con alcohol absoluto durante 2 minutos
9. Sumergir en xilol durante 20 minutos.
10. Montar en bálsamo de Canadá.

Para preparar el azul de policromo se necesita.

- Azul de metileno 1 g
- Carbonato de potasio 1 g
- Agua destilada 400 ml
- Ácido acético 3 ml

Procedimiento:

1. Disolver el azul de metileno y el carbonato de potasio en el agua destilada.
2. Hervir la mezcla durante 30 minutos y dejar enfriar.
3. Agregar el ácido acético cristalizante.
4. Agitar hasta la disolución total.
5. Poner en ebullición hasta reducir el volumen al 50%.
6. Enfriar con agua corriente.

Mucicarmin de Mayer para *C. neoformans*

Esta tinción es útil para teñir a *C. neoformans* y en la cual la mucina se tiñe de rosa intenso, los núcleos de color negro y la periferia de color amarillo.

Técnica:

1. Desparafinar los cortes, rehidratarlos con xileno y después pasarlos sucesivamente por soluciones alcohólicas de concentración decreciente.
2. Teñir durante 7 minutos con solución de Weigert.
3. Lavar con agua corriente de 5 a 10 minutos.
4. Sumergir en una solución de mucicarmin diluida durante 30 a 60 minutos.
5. Lavar con agua destilada.
6. Teñir con solución de amarillo de metanil durante 1 minuto.
7. Lavar rápidamente con agua destilada.
8. Lavar rápidamente con alcohol al 95%.
9. Deshidratar por medio de dos pases en alcohol absoluto.
10. Aclarar con dos o tres pases por xileno y montar en la resina sintética.

Preparación de las soluciones utilizadas.

Solución A:

- Hematoxilina 1 g
- Alcohol al 95% 100 ml.

Solución B:

- FeCl₃ en solución acuosa al 29% 4 ml.
- Agua destilada 950 ml.
- HCl concentrado 1 ml.

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

b). Solución de amarillo de metanilo:

- Amarillo de metanilo 0.25 g.
- Agua destilada 100 ml
- Ácido acético glacial 0.25 ml

c) Colorante de mucicarmin:

- Carmin 1 g.
- Cloruro de aluminio 0.5 g
- Agua destilada 2 ml

Azul de Alcian para *C. neoformans*

En esta técnica las levaduras de *Cryptococcus neoformans*, se observan de color azul claro y los mucopolisacáridos de azul turquesa.

Procedimiento:

1. Desparafinar los cortes.
2. Teñir los cortes con azul de Alcian durante 20 minutos.
3. Lavar con agua corriente.
4. Teñir con safranina durante 5 minutos.
5. Deshidratar por medio de pases sucesivos de alcoholes al 50, 70, 95% y alcohol absoluto.
6. Montar en resina sintética.

Grocott - Gomori

Con esta técnica los hongos se tiñen de color negro al igual que algunas bacterias, la mucina adquiere un color gris oscuro, las partes internas del micelio, rosa oro, el fondo aparece de color verde claro. Debe tenerse cuidado al observar los cortes teñidos con esta técnica, ya que algunas fibras como las reticulares o las de elastina y otras se tiñen de color negro.

Técnica:

1. Desparafinar los cortes en dos baños de xileno y dos de alcohol al 95%.
2. Colocar los cortes en una solución de ácido crómico durante 1 hora.
3. Lavar con agua corriente durante 15 segundos.
4. Sumergir en bisulfito de sodio al 1 % durante 1 minuto.
5. Lavar con agua corriente durante 5 a 10 minutos.
6. Lavar con agua destilada (cuatro cambios).
7. Colocar en una solución de nitrato de plata metenamina y mantener el recipiente a 60 °C durante 30 a 60 minutos, hasta que las secciones adquieran un color marrón claro.
8. Pasar por seis baños de agua destilada.
9. Colocar en cloruro de oro hasta cambiar de tono, durante 2 a 5 minutos.
10. Lavar con agua corriente.
11. Teñir con verde brillante durante 40 a 45 segundos.
12. Deshidratar con alcohol al 95% y después con alcohol absoluto; aclarar en dos baños de xileno.
13. Montar en resina sintética.

- a). **Ácido crómico:**
- **Ácido crómico** 5 g.
 - **Agua destilada** 100 ml.
- b). **Metenamina al 3%:**
- **Hexametileno tetramina** 3 g.
 - **Agua destilada** 100 ml.
- c). **Solución de nitrato de plata metenamina:**
- **Solución de nitrato de plata al 5%** 5 ml.
 - **Solución de metenamina al 3%** 100 ml.
- d) **Bisulfito de sodio al 1%:**
- **Bisulfito de sodio** 1 g.
 - **Agua destilada** 100 ml.
- e). **Solución de bisulfito de sodio al 2%:**
- **Bisulfito de sodio** 2 g.
 - **Agua destilada** 100 ml.
- f). **Verde brillante.**
- **Verde brillante SF** 0.2 g.
 - **Agua destilada** 100 ml.
 - **Ácido acético glacial** 0.2 g.
- g). **Nitrato de plata:**
- **Nitrato de plata** 5 g.
 - **Agua destilada** 100 ml.
- h). **Solución bórax:**
- **Bórax** 5 g.
 - **Agua destilada** 25 ml.
- i). **Nitrato de plata metenamina:**
- **Solución de bórax** 2 ml.
 - **Agua destilada** 25 ml.
- j). **Cloruro de oro:**
- **Cloruro de oro** 10 ml.
 - **Agua destilada** 90 ml.

Anaranjado de acridina

1. Fijar en alcohol absoluto durante 1 minuto, sumergir la preparación en ácido acético al 1% y lavar con agua destilada.
2. Teñir con anaranjado de acridina durante 2 minutos
3. Eliminar el exceso de colorante con buffer de fosfatos durante 1 a 2 minutos
4. Diferenciar en cloruro de calcio 0.1 M durante 1 a 2 minutos
5. Deshidratar, aclarar y montar en resina sintética

La solución acuosa de anaranjado de acridina al 0.1%, se diluye a 0.01% con solución buffer de fosfatos con un pH de 6

Las estructuras fúngicas se observan de color naranja al microscopio de luz.

ANEXO 2

TÉCNICAS ALTERNATIVAS DE MICROCULTIVO

Cultivo en portaobjetos

Es una técnica de gran utilidad para el estudio de los hongos, se puede emplear para:

- a) Identificación taxonómica de hongos
- b) Estudios de ontogenia de los conidios
- c) Obtención de material para microfotografía y micrografía electrónica
- d) Elaboración de preparaciones permanentes útiles en la enseñanza
- e) Como apoyo para identificación diferencial.
- f) Como control para las cepas de colecciones de hongos.

Los medios de cultivo y tiempos de incubación son variables, dependiendo del hongo por procesar y de los fines que se persiguen al realizar la técnica. En general puede decirse que los medios de cultivo más usados son: agar papa dextrosa, extracto de malta, agar Borelli, agar Sabouraud simple y medio de Czapek. El tiempo de incubación normalmente es de 7 a 15 días y la temperatura habitual es de 25 °C.

Técnica del emparedado

1. Sobre una caja de Petri con medio de cultivo, se depositan 5 a 8 fragmentos del hongo por estudiar.
2. Se introducen en el agar de 4 a 6 cubreobjetos estériles de 22 X 22 mm de un ángulo aproximado de 45 °.
3. Se cierra la caja y se incuba de 7 a 15 días a 25 °C
4. Cuando el cultivo ha alcanzado su madurez se retira un cubreobjetos de la caja y se coloca sobre un portaobjetos, sobre el cual previamente se ha depositado una gota de azul de algodón.
5. Se deposita una gota de azul de algodón sobre el cubreobjetos y se cubre con otro cubreobjetos de 24 X 40 mm.
6. Se repite el procedimiento con los demás cubreobjetos contenidos en la caja de cultivo

Con esta técnica se tienen dos planos de enfoque

Método de Rivalier y Seydel

Es una técnica de microcultivo que permite evidenciar de forma clara las estructuras morfológicas en su arreglo y disposición natural, se realiza para la identificación de cultivos o bien, para preparar material de enseñanza.

1. Sumergir un portaobjetos estéril en medio de cultivo a 56 °C
2. Colocar el portaobjetos sobre un caballete en una caja de Petri
3. Inocular el centro del portaobjetos con el hongo a estudiar
4. Depositar en la caja de Petri 10 ml de agua destilada estéril, sin mojar el cultivo
5. Incubar a 25 °C en la oscuridad
6. Cuando el cultivo alcance su madurez, desprender el exceso de agar y secar en la estufa a 37 °C durante 24 horas
7. Sumergir la preparación en colodión ligero.
8. Escurrir el exceso de colodión y dejar secar durante 24 horas en posición horizontal

Preparación del colodión

- Colodión oficial (sin aceite de ricino) 1 ml
- Alcohol absoluto 2 ml
- Éter sulfúrico 2 ml

ANEXO 3

Agar Sabouraud-Antibióticos (Sabouraud antibióticos)

Es un medio para el aislamiento de la mayoría de los hongos patógenos. La cicloheximida inhibe el desarrollo de los hongos contaminantes y el cloranfenicol a las bacterias

Composición:

- Pentona 10 gr
- Glucosa 20 gr
- Agar - agar 20 gr.
- Cloranfenicol 500 mg.
- Cicloheximida 500 mg
- Agua destilada 1000 ml.

Procedimiento:

1. Disuelva en el agua los primeros 3 ingredientes.
2. Ajuste el pH a 5.6.
3. Se deja reposar durante 10 minutos.
4. Se esteriliza durante 15 minutos a 121 °C.
5. Se deja enfriar a 50 °C aproximadamente.
6. En un ambiente estéril, se agregan los antibióticos.

El medio líquido se prepara de la misma forma, solo que sin agar - agar.

Agar aceite de oliva

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

Composición:

- Agar dextrosa Sabouraud 6.5 gr.
- Tween 80 2 ml.
- Aceite de oliva 2 ml.
- Vitamina A 10 gotas.
- Cloranfenicol 0.5 gr.
- Agua destilada 100 ml.

Procedimiento:

1. Disuelva por calor el Sabouraud en el agua.
2. Agregue los otros ingredientes.
3. Se esteriliza a 121 °C durante 15 minutos.

Agar extracto de levadura - fosfato con amoníaco

Es un medio utilizado para el aislamiento de *Histoplasma capsulatum* y *Blastomyces dermatitidis* a partir de productos biológicos.

Composición:

- Extracto de levadura 1 gr.
- Amortiguador de fosfatos pH de 6 2 ml.
- Agar 20 gr.
- Cloranfenicol 0.5 gr.
- Agua destilada 1000 ml.

Procedimiento:

1. Mezcle los ingredientes con el agua destilada y agite.
2. Se pone en ebullición agitando con frecuencia.
3. Deposite 18 ml en tubos con tapón de rosca.
4. Se esteriliza a 121 °C durante 15 minutos.
5. Se ajusta el pH a 6.0 a temperatura ambiente.

Empleo con amoníaco:

1. Vacíe el medio contenido en los dos tubos, sobre una caja de Petri en el momento de usarlo.
2. Inocule 0.5 a 1.0 ml del espécimen en la superficie del medio.
3. Inmediatamente después de la inoculación agregue una gota de amoníaco concentrado a la superficie del agar, permitiendo su difusión.

El amoníaco a altas concentraciones inhibe el crecimiento de hongos no patógenos.

Tioglicolato

Es un medio utilizado para el aislamiento de Actinomycetes anaerobios.

Composición:

- Peptona 20 gr.
- L-cistina 0.25 gr.
- Glucosa 6 gr.
- Cloruro de sodio 2.5 gr.
- Tioglicolato de sodio 0.5 gr.
- Sulfito de sodio 0.1 gr.
- Agar 0.7 gr.
- Agua destilada 1000 ml.

Procedimiento:

1. Disuelva los ingredientes.
2. Ajuste el pH a 7.2.
3. Se esteriliza a 121 °C por 15 minutos.
4. Se almacena a temperatura ambiente.

Lowenstein-Jensen

Es un medio utilizado para el aislamiento de Actinomycetes aerobios.

Composición:

- Fosfato monopotásico 2.4 gr.
- Sulfato de magnesio 0.24 gr.
- Citrato de magnesio 0.6 gr.
- Asparagina 3.6 gr.
- Glicerol grado reactivo 12 ml.
- Agua destilada 600 ml.
- Harina de papa 30 gr.
- Huevos revueltos enteros 1000 ml.
- Verde de malaquita al 2 % 20 ml.

Procedimiento:

1. Disuelva las sales y la harina de papa en el agua.
2. Se esteriliza a 121 °C por 30 minutos.
3. Lave con cepillos los huevos frescos (de no más de una semana de antigüedad) con solución jabonosa al 5% y déjelos en ella durante 30 minutos.
4. Enjuague los huevos perfectamente con agua corriente.
5. Ponga los huevos en alcohol al 70% durante 15 minutos.
6. Rompa los huevos y deposítelos en frascos estériles el contenido.
7. Se homogenizan los huevos con perlas de vidrio estériles.
8. Agregue un litro de la suspensión de huevo a la suspensión de sales - papa.
9. Agregue el verde de malaquita y envase.
10. Se ponen los tubos a 85 °C durante 50 minutos.

Anaerobiosis

Es un medio utilizado para el aislamiento y conservación de Actinomycetes del género *Actinomyces*.

Composición:

a) Solución 1:

- Ácido pirogálico 100 gr.
- Agua destilada 150 ml.

b) Solución 2:

Para obtenerla mezcla A y B.

Mezcla A.

- Carbonato de sodio 10 gr.
- Agua destilada 100 ml.

Mezcla B

- Fosfato de potasio 17.40 gr.
- Agua destilada 100 ml.

Procedimiento:

1. Deposite por partes iguales y por separado las soluciones 1 y 2 en la caja de Bray.
2. Siembre en estria el producto biológico en la tapa de la caja de Bray que debe tener el agar simple.
3. Tape la caja con la placa inoculada y selle con cinta adhesiva.
4. Incline la caja en varias direcciones para mezclar las soluciones 1 y 2; esto produce una reducción de las moléculas de O₂, dando lugar a un ambiente microaerofílico.
5. Se incuba a 37 °C durante 5 días.

MEDIOS EMPLEADOS PARA CONSERVACIÓN

Agar papa dextrosa

Composición:

- Pulpa de papa 250 gr.
- Glucosa 20 gr.
- Agar 20 gr.
- Agua destilada 1000 ml.

Procedimiento:

1. Pelar la papa y cortarla en pedazos finos.
2. Poner en ebullición durante 30 minutos.
3. Filtrar a través de una gasa y reponer el volumen anterior.

4. Añadir agar y glucosa.
5. Disolver por calentamiento.
6. Esterilizar a 121 °C durante 20 minutos.
7. Envasar la mezcla.

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 cleistotecios de *Aellomyces dermatitidis*.

Composición:

- | | |
|-----------------------------------|----------|
| • Tierra de jardín | 500 gr. |
| • Agua de la llave | 1200 ml. |
| • Glucosa | 2 gr. |
| • Extracto de levadura | 1 gr. |
| • KH ₂ PO ₄ | 0.5 gr. |
| • Agar | 15 gr. |

Procedimiento:

1. Mezclar la tierra con el agua.
2. Esterilizar a 121 °C durante 3 horas
3. Filtrar a través de papel filtro mientras esté caliente.
4. Reponer el volumen hasta 1000 ml.
5. Añadir los demás ingredientes.
6. Ajustar el pH a 7.0.
7. Esterilizar a 121 °C durante 20 minutos.

MEDIOS EMPLEADOS PARA AISLAMIENTO Y/O CONSERVACIÓN

Agar Czapek-Dox

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

Composición:

- | | |
|-----------------------|----------|
| • Sacarosa | 30 gr. |
| • Nitrato de sodio | 2 gr. |
| • Fosfato dipotásico | 1 gr. |
| • Sulfato de magnesio | 0.5 gr. |
| • Cloruro potásico | 0.5 gr. |
| • Sulfato ferroso | 10 mg. |
| • Agar | 15 gr. |
| • Agua destilada | 1000 ml. |

Procedimiento:

1. Disolver por calor todos los ingredientes.
2. Ponerlos en ebullición durante 10 minutos.
3. Esterilizar a 121 °C durante 20 minutos.
4. Envasar.

Medio de Garrod

Se utiliza para aislar y conservar los Actinomicetes.

Composición:

- Extracto de carne 3 gr.
- Cloruro de sodio 5 gr.
- Peptona 10 gr.
- Almidón soluble 1 gr.
- Agar 20 gr.
- Agua destilada 1000 ml.

Procedimiento:

1. Disolver todos los ingredientes en el agua.
2. Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.
3. Envasar.

MEDIOS EMPLEADOS PARA AISLAMIENTO Y/O DIFERENCIACIÓN

Agar-niger (Staib-Seeliger)

Se utiliza para la identificación de *Cryptococcus neoformans* y su aislamiento a partir de substratos muy contaminados. *C. neoformans* adquiere un color marrón oscuro al desarrollarse en este medio de cultivo.

Composición:

- Semilla de niger 50 gr.
- Fosfato de potasio dihidrogenado 1 gr.
- Creatinina 1 gr.
- Penicilina 20 U/ml.
- Estreptomicina 40 mg/ml.
- Cloranfenicol 1 mg/ml.
- Difetil 100 mg/ml.
- Etanol 1 ml.
- Agar 15 gr.
- Agua destilada 1000 ml.

Procedimiento:

1. Preparar la solución madre de extracto de levadura disolviendo la levadura en 100 ml. de agua.
2. Esterilizar por filtración.
3. Disolver el agar en 1000 ml. de agua.
4. Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.
5. Enfriar a 45 °C.
6. Añadir 6 ml. de la solución madre de extracto de levadura
7. Envasar

Medio de Gorodkows

Se usa para la obtención de ascas de *Saccharomyces cerevisiae*.

Composición:

- Glucosa 0.63 gr
- Cloruro de sodio 1.30 gr.
- Extracto de carne 2.50 gr.
- Agua destilada 250 ml.

Procedimiento:

1. Mezclar los ingredientes y disolverlos con calor.
2. Poner la mezcla a ebullición durante 5 minutos.
3. Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

Agar alfácil

Se usa para la obtención de cleistotecios de *Ajellomyces capsulatus*.

Composición:

- Alfácil (celulosa) 20 gr.
- MgSO₄ 1 gr.
- KH₂PO₄ 1.5 gr.
- Nitrato de sodio 1 gr.
- Extracto de levadura 0.5 gr.
- Agar 20 gr.
- Agua destilada 1000 ml.

Procedimiento:

1. Disolver por calentamiento todos los ingredientes.
2. Ajustar el pH a 5.7.
3. Esterilizar a 121 °C durante 20 minutos.
4. Envasar.

Agar avena-jitomate

Se utiliza para la obtención de ascosporas de *Arthroderma spp.*

Composición:

- Harina de avena para bebe 10 gr.
- Puré de jitomate 10 gr.
- MgSO₄ - 7H₂O 1 gr.
- Nitrato de sodio 1 gr.
- Agar 10 gr.
- Agua destilada 1000 ml.

Procedimiento:

1. Disolver por calentamiento los ingredientes en el agua.
2. Ajustar el pH a 5,6.
3. Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos
4. Envasar.

Agar cereal

Se utiliza para la producción de ascocarpos de los hongos *Gymnascaceae*.

Composición:

- Cereal mixto precocido 10 gr.
- Fosfato dipotásico 1,5 gr.
- Sulfato de magnesio 1 gr.
- Nitrato de sodio 1 gr.
- Agar 18 gr.
- Agua destilada 1000 ml.

Procedimiento:

1. Disuelva en el agua los componentes con calor.
2. Se ajusta el pH a 5,6.
3. Se esteriliza a 121 °C durante 15 minutos.
4. Se envasa.

Medio de gis

Se utiliza para obtener la fase sexual de *Saccharomyces cerevisiae* y permite diferenciarlo de otras levaduras no ascosporadas.

Procedimiento:

1. En un tubo de cultivo de 15 X 150, colocar un fragmento de gis cortado por su eje longitudinal en forma diagonal.

2. Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos
3. Agregar 3 ml de agua destilada estéril.
4. Inocular en el centro de la parte plana la levadura a estudiar.
5. Incubar a temperatura ambiente durante 5 a 8 días. Se toma una muestra del cultivo y se tiñe con la técnica para ascosporas.

MEDIOS PARA DIFERENCIACIÓN

Medio de prueba para dermatofitos (DTM)

Se utiliza como medio selectivo para el aislamiento de dermatofitos a partir de muestras muy contaminadas con bacterias u otros hongos. El indicador de pH permite identificar fácilmente a los dermatofitos, pues por el desarrollo de estos cambia el color amarillo del medio a rojo, debido a la degradación de la fitona y a la liberación de los compuestos alcalinos.

Composición

● Fitona de soya	10 gr.
● Dextrosa	10 gr.
● Agar	20 gr.
● Agua destilada	1000 ml.
● Solución de rojo de fenol al 0.5 %	40 ml.
● HCl 0.8 N	6 ml.
● Cicloheximida	500 mg.
● Acetona	2 ml.
● Sulfato de gentamicina	100 000 U.
● Agua destilada estéril	2 ml.
● Clorotetraciclina	100ml.
● Agua destilada estéril	25 ml.
● NaOH 0.1 N	15 ml.
● Agua destilada c.b.p.	100 ml.

Procedimiento:

1. Disolver 0.5 gr. de rojo de fenol en 15 ml de NaOH y aforar a 100 ml con agua destilada.
2. Disolver la cicloheximida en 2 ml de acetona.
3. Disolver la gentamicina en 2 ml de agua estéril.
4. Disolver la clorotetraciclina en 25 ml de agua estéril.
5. Disolver la fitona, la dextrosa y el agar por calentamiento en 1000 ml de agua destilada.
6. Añadir a la mezcla del agar, 40 ml de rojo de fenol al 0.5 %.
7. Homogenizar y añadir la gentamicina.
8. Esterilizar a 12 libras de presión durante 10 minutos.
9. Enfriar a 47 °C y añadir la solución de clorotetraciclina en ambiente estéril
10. Envasar

Agar Trichopyton (1 - 7)

Se utiliza para la diferenciación de los dermatofitos de acuerdo con sus necesidades vitamínicas (ver cuadro 3.1)

Composición

a) Agar 1 (medio base de caseína sin vitaminas)

- Hidrolizado de caseína libre de vitaminas 2.5 gr
- Glucosa 40 gr.
- Sulfato de magnesio 0.1 gr.
- Fosfato de potasio 1.8 gr.
- Agar 15 gr.
- Agua destilada 1000 ml.

b) Agar 2.

- Agar 1 con 50 mg de inositol.

c) Agar 3.

- Agar 1 con 50 mg de inositol y 200 ug de tiamina.

d) Agar 4.

- Agar 1 con 200 ug de tiamina.

e) Agar 5.

- Agar 1 con 2 mg de ácido nicotínico.

f) Agar 6 (medio base de nitrato de amonio sin vitaminas)

- Nitrato de amonio 1.5 gr.
- Glucosa 40 gr.
- Sulfato de magnesio 0.1 gr.
- Fosfato de potasio 1.8 gr.
- Agar 15 gr.
- Agua destilada 1000 ml.

g) Agar 7

- Agar 6 con 30 mg de HCl - histidina.

Procedimiento:

1. Disolver por calentamiento los ingredientes del medio seleccionado.
2. Poner a ebullición durante 1 minuto.
3. Esterilizar a 121 °C durante 12 minutos.

Cuadro 3.1 Características generales de los principales dermatofitos

Dermatofitos	Invasión al pelo	Requerimientos nutricionales específicos
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Ectotrix y endotrix. Cadenas de conidios tamaño mediano	No reportados
<i>Trichophyton rubrum</i>	Ectotrix y endotrix. En la primera, cadena de conidios grandes; en la segunda, conidios más pequeños	No reportados
<i>Trichophyton schoenleitmii</i>	Endotrix. Hifas con burbujas aéreas en el pelo; conidios escasos o ausentes	No reportados
<i>Trichophyton tonsurans</i>	Endotrix. Abundantes cadenas de conidios, lo que hace que el pelo se encurve	Crece mejor en presencia de tiamina
<i>Trichopyton verrucosum</i>	Ectotrix. Grandes conidios en cadenas	Todas las cepas requieren tiamina
<i>Trichophyton violaceum</i>	Endotrix	Tiamina. Muchas cepas requieren también inositol. El crecimiento aumenta a 37°C
<i>Trichophyton concentricum</i>	No se conoce	Responde ligeramente a la tiamina en el 50% de aislamientos
<i>Trichophyton soudanense</i>	Endotrix como: <i>T. tonsurans</i> y <i>T. violaceum</i>	No crece en nitrato de amonio o histidina como fuentes de nitrógeno. No se estimula con tiamina
<i>Microsporum canis</i>	Ectotrix. Masas de conidios pequeñas	Ninguno reportado. Crece profusamente en arroz refinado
<i>Microsporum gypseum</i>	Principalmente Ectotrix. Conidios dispersos y en cadenas	No reportado
<i>Microsporum fulvum</i>	Ectotrix. Similar a <i>M. gypseum</i>	No reportado

Penetración del pelo

Se utiliza para la diferenciación de algunos dermatofitos que tienen la capacidad de producir órganos perforantes.

Composición:

- Sol. de extracto de levadura al 10 % 3 ml
- Agua destilada 20 ml
- Cabello de niño prepúber cortados en fragmentos de 1 cm, esterilizados.

Procedimiento:

1. Mezclar la solución de extracto de levadura con el agua
2. Se vierte 2 ml de la solución en cada tubo.
3. Agregar de 5 a 10 cabellos por tubo
4. Inocular los cabellos con el hongo por estudiar.
5. Incubar durante 4 semanas a temperatura ambiente.
6. Observar los pelos aclarados con KOH o con azul de algodón.

Agar Biggy

Se utiliza para la identificación de colonias de *Candida spp* y otras levaduras, las cuales toman una coloración que varía del marrón al negro brillante. Inhibe el desarrollo de muchas bacterias y hongos contaminantes.

Composición:

- Glucosa 10 gr.
- Extracto de levadura 1 gr.
- Glicina 10 gr.
- Citrato de bismuto amónico 5 gr.
- Sulfito de sodio 3 gr.
- Cloranfenicol 0.5 gr.
- Agar 20 gr.
- Agua destilada 1000 ml.

Procedimiento:

1. Disolver en el agua todos los ingredientes.
2. Esterilizar a 110 °C durante 20 minutos.

Agar harina de maíz

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

Composición:

- Harina de maíz 62.5 gr.

- Agua destilada 1500 ml.
- Tween 80 15 ml.
- Agar 19 gr.

Procedimiento:

1. Disolver la harina de maiz en el agua destilada.
2. Dejar reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
3. Filtrar a través de papel filtro y reconstituir el anterior volumen.
4. Añadir el agar.
5. Añadir el Tween 80.
6. Esterilizar a 121 °C durante 20 minutos.

Agar harina de arroz - Tween

Favorece la producción de clamidioconidios de *C. albicans*.

Composición:

- Harina de arroz 10 gr
- Tween 80 10 ml
- Agar 10 gr.
- Agua destilada 1000 ml.

Procedimiento:

1. Hervir durante 30 segundos la harina de arroz.
2. Filtrar a través de gasa y reconstruir el volumen.
3. Agregar el agar y disolver.
4. Agregar el Tween 80.
5. Esterilizar a 120 °C durante 20 minutos.
6. Dejar reposar toda la noche en baño María a 60 °C.
7. Decantar la porción clara y filtrar a través de una gasa.
8. Esterilizar a 120 °C durante 20 minutos.
9. Envasar.

Agar papa - zanahoria - bilis

Es un medio particularmente favorable para la obtención de clamidioconidios en *C. albicans*.

Composición:

- Pulpa de zanahoria 20 gr.
- Pulpa de papa 20 gr.
- Agar 20 gr.
- Bilis fresca de buey 150 ml.
- Agua destilada 1000 ml.

Procedimiento:

1. Macerar la pulpa de la papa y la zanahoria durante una hora.

2. Poner la mezcla en ebullición durante 5 minutos.
3. Filtrar a través de papel filtro y reponer el volumen original
4. Añadir el agar y fundirlo.
5. Añadir la bilis de buey.
6. Esterilizar a 120 °C durante 15 minutos.

Agar Papano-Levine (cloruro de trifenil tetrazolio)

Se utiliza para identificar algunas especies del género *Candida* por el color que desarrollan las colonias sobre este medio, lo cual está determinado por la capacidad que tienen algunas especies de reducir el trifenil tetrazolio en diferentes grados.

Composición:

- Peptona 10 gr.
- Extracto de levadura 1 gr.
- Dextrosa 40 gr.
- Agar 15 gr.
- Agua destilada 1000 ml.
- Cloruro de trifenil tetrazolio 0.1 gr.
- Neomicina o cloranfenicol 0.5 gr.

Procedimiento:

1. Disolver en el agua todos los ingredientes a excepción del cloruro de trifenil tetrazolio.
2. Esterilizar a 121 °C durante 20 minutos.
3. Enfriar el medio a 50 °C
4. Añadir el trifenil tetrazolio en condiciones de esterilidad
5. Ajustar el pH a 6.0.
6. Envasar.

Agar caseína

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

Composición:

- Leche en polvo descremada 10 gr.
- Agua destilada. 200 ml.
- Agar 2 gr.

Procedimiento:

1. Disolver la leche en 100 ml. de agua, agregándola poco a poco para evitar la formación de grumos.
2. Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.
3. Disolver el agar en 100 ml de agua.
4. Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.
5. Enfriar ambas soluciones a 48 °C, se mezclan y se homogeneiza.
6. Envasar.

Medio de gelatina para hidrólisis.

Se utiliza para demostrar la actividad proteolítica de algunas especies de hongos y de Actinomycetes causantes de micetoma y cromomicosis

Composición:

- Gelatina 10 gr.
- Caldo de infusión - corazón 2.5 gr.
- Agua destilada. 1000 ml.

Procedimiento:

1. Disolver los ingredientes por calentamiento en el agua.
2. Dejar a ebullición durante 2 minutos.
3. Ajustar el pH a 7.2
4. Esterilizar a 15 libras de presión durante 10 minutos.

Agar dextrosa - urea

Se utiliza para poner de manifiesto la producción de ureasa por los géneros *Trichopytum*, *Criptococcus* y *Nocardia*. La reacción se hace evidente por el cambio de color del medio hacia el magenta.

Composición:

- Dextrosa 1 gr.
- Peptona 1 gr.
- Cloruro de sodio 5 gr.
- Fosfato monopotásico 2 gr.
- Urea 20 gr.
- Agar 15 gr.
- Rojo de fenol 12 mg.
- Agua destilada 1000 ml.

Procedimiento:

1. Disolver la urea en 100 ml. de agua destilada y esterilizar por filtración.
2. Disolver los ingredientes restantes en 900 ml. de agua.
3. Esterilizar a 121 °C durante 20 minutos.
4. Enfriar a 50 °C.
5. Agregar la solución de urea en ambiente estéril.

MEDIOS PARA OBTENCIÓN DE FASES PARASITARIAS

Agar infusión-cerebro-corazón

La siembra en este medio favorece la conversión de las fases miceliales de algunos hongos dimórficos en fases parasitarias si se incuban a 37 °C.

Composición:

- Agar infusión - cerebro - corazón 52 gr
- Agua destilada 1000 ml.

Procedimiento:

1. Mezclar el medio deshidratado con el agua destilada
2. Calentar con agitación frecuente y poner en ebullición por un minuto.
3. Vaciar 8 ml. del medio en tubos de tapón rosca.
4. Esterilizar la mezcla a 121 °C durante 15 minutos

Medio de Converse

Se utiliza para obtener las formas parasitarias (esférulas con endosporas) de Coccidioides immitis.

Composición:

- Glucosa 1 M 22 ml.
- Acetato de amonio 1 M 16 ml
- Fosfato de monopotasio 1 M 3.75 ml.
- Fosfato dipotásico 1 M 3 ml.
- Sulfato de magnesio 1 M 1.6 ml.
- Sulfato de zinc 0.001 M 1.24 ml.
- Cloruro de sodio 0.01 M 24 ml.
- Bicarbonato de sodio 0.01 M 14 ml.
- Cloruro de calcio 2 ml.
- Agua destilada c.b.p. 1000 ml.

Procedimiento:

1. Mezclar todos los ingredientes y aforar con agua a 1000 ml.
2. Llenar los tubos con 10 ml del medio.
3. Esterilizar la mezcla a 121 °C durante 15 minutos.
4. Ajustar el pH a 6.5.

Medio para cultivo de esférulas

Composición:

- KH_2PO_4 6.260 gr.
- ZnSO_4 0.036 gr.
- MgSO_4 3.994 gr.
- NaHCO_3 1.176 gr.
- CaCl_2 0.029 gr.
- NH_4 acetato 12.334 gr.
- Glucosa 39.635 gr.
- KH_2PO_4 6.846 gr.
- NaCl 0.014 gr.

- Caseína hidrolizada 20 gr.
- Agua destilada 1000 ml.

Procedimiento:

1. Disolver los ingredientes en el agua.
2. Ajuste el pH a 6.0.
3. Esterilice la mezcla a 121 °C durante 10 minutos.
4. Disolver el medio a una proporción de 1:10 con agua destilada estéril.
5. Disolver en tubos tapándolos con algodón y papel aluminio hasta el momento de utilizarlos.
6. Al momento de utilizar el medio, agregar lo siguiente:
 - Biotina 1:10 000 0.5 ml.
 - Glutaliona 0.005 M 0.5 ml.
7. Las soluciones deberán esterilizarse por filtración.

Medio para células fumagoides

Se utiliza para obtener in vitro las células fumagoides.

Composición:

- Caldo dextrosa Sabouraud 100.0 ml.

Composición:

1. Esterilizar el medio de Sabouraud a 121 °C durante 15 minutos.
2. Ajustar el pH a 2.5.
3. Inocular el medio con una cepa de Clamidosporium carrioni.
4. Incubar a 37 °C.

MEDIOS UTILIZADOS PARA PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Auxonograma del carbono en placa (asimilación de carbohidratos)

Medio base: Se utiliza como sostén de los discos de azúcares y para observar el crecimiento de las levaduras para su posterior identificación.

Composición:

- Extracto de levadura 0.67 gr.
- Agar noble 20 gr.
- Agua destilada 1000 ml.

Procedimiento:

1. Disolver los ingredientes en el agua.
2. Poner en ebullición suave durante 1 minuto.
3. Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.
4. Guardar en refrigeración a 4 °C.

Discos de azúcares para el auxonograma del carbono.

Ingredientes:

- Discos de papel filtro estériles de 5 mm de diámetro.
- Azúcares (glucosa, lactosa, maltosa, sacarosa, rafinosa, galactosa), 20 0 gr. de cada uno.
- Agua destilada, 100 ml por azúcar.

Procedimiento:

1. Disolver cada tipo de azúcar en 100 ml. de agua.
2. Esterilizar por filtración.
3. Sumergir los discos en las distintas soluciones de azúcares durante 24 horas.
4. Colocar los discos de papel en una caja de Petri y ponerlos en la estufa a 37 °C durante 24 horas.
5. Guardar los discos en un frasco estéril de boca ancha

Auxonograma del carbono en tubo (Wickerham)

Composición:

- Extracto de levadura, 3 25 gr por azúcar.
- Carbohidratos (glucosa, lactosa, rafinosa, maltosa, galactosa, celobiosa), 2 50 gr por cada azúcar.

Procedimiento:

1. Disolver el extracto de levadura en 400 ml de agua (preparar una solución para cada azúcar).
2. Esterilizar cada solución a 121 °C durante 15 minutos.
3. Dejar enfriar a temperatura ambiente.
4. Disolver cada azúcar en 100 ml de agua.
5. Esterilizar las soluciones de azúcares por filtración.
6. Agregar 100 ml de la solución de cada azúcar a 400 ml de solución de extracto de levadura.
7. Ajustar el pH de cada solución a 5.6.
8. En condiciones de esterilidad, poner 2.5 ml de solución a tubos estériles de 10 X 75.

Zimograma

Se utiliza para identificar diversos géneros y especies fúngicas, principalmente levaduras y algunas bacterias pertenecientes a los Actinomycetes.

Composición:

- Caldo de infusión - corazón 25 gr.
- Sol. de azul de bromotimol al 1% 3 ml
- Solución de azúcares al 10% (glucosa, lactosa, maltosa, galactosa, rafinosa, sacarosa), 1.0 ml de cada solución por tubo.
- Agua destilada 100 ml.

Procedimiento:

1. Disolver el caldo en el agua destilada.

2. Añadir la solución de azul de bromotimol
3. El azul de bromotimol se prepara mezclando 1 gr de colorante con 20 ml de NaOH al 0.1 N, cuando no haya residuos se agregan 80 ml de agua destilada y se almacena a temperatura ambiente en la oscuridad.
4. Ajustar el pH a 7.2 - 7.3 a temperatura ambiente
5. Añadir 9 ml del medio a cada tubo, los cuales deberán contener un tubo de Durham invertido
6. Esterilizar los tubos a 121 °C durante 15 minutos
7. Añadir a cada tubo 1 ml de solución de azúcares (excepto maltosa, 0.5 ml), esterilizada previamente por filtración
8. Inocular los tubos con 2 gotas de una suspensión de levaduras por estudiar, una concentración aproximada a la del tubo N° 1 de la escala de McFarland.

COLECCIÓN Y CONSERVACIÓN DE CULTIVOS

La colección de cultivos en un laboratorio de micología es una herramienta valiosa y permanente para el micólogo

En ella se conservan los aislamientos clínicos, ambientales, de referencia, típicos, de importancia epidemiológica y todos aquellos que representen la historia micológica de la infección de un paciente

Todos ellos son útiles en la investigación y en la enseñanza

Registro de cultivos

Para mantener un sistema uniforme de registro, se debe de seguir lo siguiente

Todo número debe asignarse una sola vez.

A continuación se lista la información que debe contener el registro de cada cepa

- Número de ingreso, nombre del hongo y fecha de ingreso a la colección
 - Cuándo, dónde y por quien fue aislado el hongo. Para los aislamientos clínicos es útil un resumen clínico.
 - Cuándo y quién envió el aislamiento.
 - Clasificación taxonómica del hongo al ser recibido. La clasificación puede ser o no correcta.
 - Cualquier número de colección, número de diagnóstico u otro nombre de ingreso del aislamiento.
- La información anterior puede ampliarse o modificarse de acuerdo con las necesidades de cada laboratorio.

Recepción de nuevos aislamientos

Al recibirse un nuevo aislamiento para integrarse a la colección, deben de seguirse los pasos que se presentan a continuación:

1. Vaciar inmediatamente los datos del aislamiento en la libreta de ingresos. Escribir el nombre del hongo con lápiz hasta que se confirme su identidad. Si falta algún dato importante del aislamiento, hay que solicitarlo a quién lo envía
2. Realizar un examen directo y las pruebas bioquímicas necesarias para asegurarse de que el cultivo está clasificado adecuadamente
3. Depositar el cultivo original en una placa de medio de agar papa - dextrosa (APD) para asegurarse de que el cultivo está puro.
4. Una vez que se ha confirmado la pureza e identidad, asignar al cultivo un número de ingreso y marcar todos los tubos y placas con el mismo número
5. De la placa con APD inoculada, preparar un examen directo permanente, marcado con el número de ingreso para depositarlo en la colección de cultivos
6. De la placa con APD inoculada, preparar 5 subcultivos en APD
7. Revisar los cultivos a intervalos de 7 días hasta que se observe una buena conidiación y/o esporulación.
8. Conservar los 5 subcultivos distribuyéndolos de la siguiente forma:

- Con un subcultivo preparar una suspensión con agua y almacenarla
- Colocar dos subcultivos en nitrógeno líquido
- Cubrir 2 subcultivos con aceite mineral estéril y almacenarlos

Recuperación de cultivos liofilizados

En ocasiones, los laboratorios reciben cultivos liofilizados. Los cultivos se preparan en leche descremada, suero humano o algún otro medio, y después se liofilizan. Para la recuperación del cultivo, hay que seguir los siguientes pasos:

1. Tener listo un caldo nutritivo, como caldo dextrosa Sabouraud o agua destilada estéril para reconstituir el material liofilizado y medios de cultivo como agar dextrosa - Sabouraud y pipetas Pasteur
2. Con un hilo metálico triangular, hacer una muesca en el tubo que contiene el material liofilizado. Asegurarse de dejar suficiente espacio en los extremos del tubo para que se pueda manejar con seguridad
3. Limpiar el exterior del tubo con una gasa humedecida con alcohol al 70%
4. Sosteniendo el tubo con la gasa humedecida con alcohol, romper el tubo en dos partes a nivel de la muesca
5. En condiciones asepticas, coloque con la pipeta Pasteur unas gotas de caldo o agua destilada en el tubo que contiene el material liofilizado
6. Permita que se suspendan todas las partículas en el caldo o agua. Esto puede requerir de 15 a 20 minutos.
7. Con la pipeta Pasteur, se extrae todo el material reconstituido y se deposita en una placa de agar nutritivo. El material también se puede depositar en caldo en lugar de agar. Las dos técnicas son buenas. Cuando los aislamientos se obtienen de material liofilizado, el hongo tarda aproximadamente el doble de tiempo normal para su desarrollo

TÉCNICAS DE CONSERVACIÓN

Técnica de cultivo en agua

Probablemente esta sea la técnica más simple para mantener los aislamientos fúngicos; la mayoría de los aislamientos se mantienen viable durante años.

Procedimiento:

1. En condiciones asepticas, agregar 2 ml de agua destilada estéril a un tubo con cultivo altamente esporulado crecido en APD
2. Con un asa micológica estéril, desprender los conidios sin desprender el agar
3. Con una pipeta estéril, extraer la suspensión y depositarla en un pequeño frasco estéril marcado con el número de ingreso. Si el aislamiento es una levadura, con una asa micológica transfiera una pequeña cantidad de la colonia directamente a un pequeño frasco estéril que contenga de 2 a 3 ml de agua destilada estéril.
4. Si el volumen de agua es menor de 2 ml añadir agua destilada estéril
5. Cerrar herméticamente el frasco y mantenerlo a temperatura ambiente
6. En cualquier momento se puede adicionar agua destilada estéril

Procedimiento para preparar subcultivos a partir de cultivos de agua:

1. Limpiar el cuello y el tapon del frasco con alcohol al 70%
2. Agitar el cultivo en agua para volver a suspender el hongo
3. Destapar el frasco, flamear la parte superior y con una pipeta, transferir aproximadamente de 0.2 a 0.5 ml de la suspensión a una placa de APD

4. Cerrar herméticamente el frasco y colocarlo en el lugar donde estaba almacenado.
5. Incubar la placa de APD a una temperatura de 25 a 30 °C hasta que aparezca el crecimiento.
6. Preparar los subcultivos necesarios.

Técnicas de congelación

Procedimiento:

1. Cerrar herméticamente el tubo que contenga el tubo por congelar (el tubo debe de ser de vidrio refractario) y que debe de tener un alto grado de conidiación
2. Disminuir gradualmente la temperatura del tubo depositandolo primero en un recipiente que contenga hielo y finalmente en nitrógeno líquido (- 70 °C).

Procedimiento para preparar subcultivos:

1. Sacar el tubo que se encuentra en nitrógeno líquido y depositarlo en un recipiente que contenga hielo para descongelarlo paulatinamente. Destapar el tubo y con una asa micológica romper una colonia del agar congelado. Tapar el tubo nuevamente y colocarlo en el nitrógeno líquido, si el cultivo se deshíela, preparar nuevamente un cultivo patrón
2. Dispersar el inóculo en una placa de APD.
3. Incubar la placa a 30 °C hasta que aparezca crecimiento.
4. Hacer una preparación simple para confirmar la identidad del cultivo.
5. Preparar los subcultivos necesarios.

Nota: Se ha observado que las cepas de *Epidemophyton floccosum* y *Trichophyton tonsurans* disminuyen su viabilidad cuando se conservan a 4 °C. Por ello esta técnica no es recomendable para hongos de este tipo.

Técnica de transferencia periódica y conservación en refrigeración.

En algunos laboratorios, la conservación de hongos se lleva a cabo a través de la transferencia periódica de cada aislamiento, sin embargo, esto tiene el inconveniente de emplear mucho tiempo, además de que algunos hongos, especialmente los dermatofitos, tienden a sufrir pleomorfismo con las resiembas.

Una solución alterna a la transferencia continua de cultivos es depositar los aislamientos recién transferidos en un refrigerador a 4 °C. En general, los hongos solamente necesitan ser transferidos aproximadamente cada seis meses, aunque los cultivos sensibles deben transferirse a intervalos más cortos.

Los cultivos se transfieren uno o dos veces al año, si se conservan en tubos con tapón de rosca. Para los Mucorales, esta medida no es satisfactoria, ya que los tapones de rosca propician la acumulación de CO₂, el cual es tóxico para algunos miembros de este grupo de hongos.

Cuando se utilicen tubos con tapón de algodón, los cultivos deben de sembrarse cada 2 o 4 meses, debido a la rápida deshidratación del medio. Además del problema de la deshidratación, los tubos con tapón de algodón permiten la invasión de ácaros al tubo, para lo cual se deben tomar medidas especiales.

Técnica de cubierta de aceite mineral estéril

Procedimiento:

1. En condiciones asépticas, se vierte aceite mineral estéril a un cultivo con abundante conidiación, previamente crecido en APD. El aceite debe de cubrir todo el cultivo, de tal manera que el nivel quede a 1 cm por debajo del borde del tapón de rosca; de lo contrario, será difícil el manejo del hongo en una fecha posterior.
2. Cerrar el tubo y conservarlo a temperatura ambiente.

Procedimientos para la preparación de subcultivos:

1. Limpiar el cuello y el tapón del tubo con alcohol al 70%
2. Abrir el tubo, flamear la boca del mismo y extraer un fragmento de la colonia con una asa micrológica. Evitar extraer filamentos que se encuentren flotando en el aceite pues éstos generalmente dan como resultado, subcultivos negativos
3. Retirar todo el aceite mineral posible del inoculo, tapar el tubo nuevamente y volver a almacenarlo.
4. Transferir el inoculo a un tubo con caldo dextrosa Sabouraud
5. Incubar a 30 °C hasta que aparezca crecimiento
6. Subcultivar en tubos con APD.
7. Hacer una preparación en fresco para comprobar la identidad del hongo

Técnica de conservación permanente de cultivos

Procedimiento:

1. Cultivar el hongo que se va a conservar en tubos con APD, hasta la madurez del cultivo. El tubo debe de tener tapón de algodón.
2. Impregnar totalmente el tapón de algodón con formalina al 10% (sin destapar el tubo) y mantenerlo así durante tres días.
3. Introducir el tapón de algodón hacia el interior del tubo de tal manera que quede un espacio de aproximadamente 1 cm entre el tapón y el borde del tubo.
4. Colocar una tapa de vaselina - parafina al 50% (VAS - PAR) de aproximadamente 0.5 cm de espesor sobre el tapón de algodón y permitir que se solidifique.
5. Agregar una capa de resina sintética sobre la capa de VAS - PAR hasta el borde del tubo. Mantener el tubo en posición vertical hasta que se seque completamente la resina. Conservar el tubo a temperatura ambiente.

Recuperación de cultivos aparentemente no viables

Los cultivos que parecen no ser ya viables, ocasionalmente pueden reactivarse. Se pueden intentar varias técnicas antes de considerar que los cultivos están muertos.

Procedimientos para intentar reactivar cultivos con caldo:

1. En condiciones asépticas, agregar 2 a 3 ml de caldo dextrosa Sabouraud a un tubo de cultivo con un aislamiento aparentemente no viable.
2. Incubar el cultivo a 30 °C y reviselo periódicamente para observar cualquier crecimiento nuevo.
3. Con una asa micrológica transferir el nuevo crecimiento a un tubo que contenga APD con extracto de levadura al 1%.
4. Si no hay crecimiento después de 3 a 4 semanas, desechar el cultivo y anotar el resultado en la libreta de colección de cultivos.

Procedimiento para intentar reactivar cultivos con capas de agar.

1. En condiciones asepticas, con una pipeta se deposita de 2 a 3 ml de agar dextrosa Sabouraud fundido (50 °C) en el tubo del aislamiento aparentemente no viable. Cubrir exactamente la cima de la colonia con el agar fundido.
2. Incubar el cultivo a 30 °C y revisarlo periódicamente para observar cualquier crecimiento nuevo que emerja a través de la fina capa de agar.
3. Transferir el nuevo crecimiento a un tubo que contenga APD con extracto de levadura al 1%.
4. Si no se presenta crecimiento nuevo en 3 a 4 semanas, desechar el tubo y anotar en la libreta.

Procedimiento para intentar reactivar cultivos por homogenización:

1. En un tubo que contenga 1 ml de agua destilada, depositar tanta cantidad como sea posible de un aislamiento aparentemente no viable.
2. Con el asa micológica fragmentar el hongo.
3. Transferir todo el contenido del tubo a una caja de Petri que contenga APD con extracto de levadura al 1%. Cubrir el borde de la caja con parafilm para retardar la deshidratación.
4. Incubar la caja de Petri a 30 °C y revisarla periódicamente para observar cualquier crecimiento nuevo.
5. Si no se observa crecimiento en 3 a 4 semanas desechar el cultivo y anotar en la libreta.

Procedimiento para reactivar hongos en medios enriquecidos:

1. Agregar a los tubos con cultivos, aparentemente no viables, 5 ml de caldo de infusión cerebro - corazón (BHI) o de Sabouraud líquido con extracto de levadura al 2%.
2. Agitar y desprender los fragmentos de la colonia de tal forma que queden suspendidos en la fase líquida.
3. Incubar a 30 °C y revisar periódicamente para observar cualquier crecimiento nuevo.
4. Si no se observa crecimiento de 3 a 4 semanas, desechar el cultivo y anotar en la libreta.

Fijación y sellado de cultivos para demostración y enseñanza

Los hongos peligrosos como *B. dermatitidis*, *C. immitis*, *H. capsulatum* y *P. brasiliensis*, deben fijarse antes de ser utilizados como materiales de enseñanza. Un método satisfactorio consiste en utilizar formalina al 10%. se introduce un algodón totalmente impregnado con formalina en el tubo que contiene el cultivo o se puede utilizar el tapón de algodón del mismo tubo. Este algodón se mantiene en el interior del tubo durante 3 días. Después de este tiempo y bajo medidas de precaución extremas, se recomienda intentar un subcultivo de la colonia para corroborar su no viabilidad. En caso de ser necesario, se recomienda aumentar el número de días con la impregnación con formalina (14).

GLOSARIO

- Actinomiceto**: Bacteria filamentosa Gram positiva que pertenece a la orden de los Actinomycetales.
- Acuminado**: Que tiene una protuberancia o elevación cerca o en el centro de la colonia.
- Aeróbico**: Que crece en presencia de oxígeno molecular.
- Anaeróbico**: Que crece en ausencia de oxígeno molecular.
- Antropofílico**: Hongo cuyo hábitat natural es el hombre.
- Artroconidio**: Conidio tálco producido por fragmentación de la hifa y que se libera por un proceso de xerólisis o de esquizolisis.
- Asca**: Estructura en forma de saco que contiene ascosporas que se forman como resultado de cariogamia y meiosis.
- Ascocarpo**: Cuerpo fructífero complejo que contiene ascas.
- Ascomycetes**: Grupo de hongos que se reproduce por medio de ascosporas.
- Ascomycotina**: Categoría taxonómica de los hongos (subdivisión) en la cual la reproducción es de tipo sexual formándose ascas con ascosporas.
- Ascospora**: Espora haploide producida generalmente dentro de un ascas.
- Autótrofo**: Microorganismo que puede crecer sin utilizar sustratos orgánicos como fuente de energía.
- Auxonograma**: Método para determinar la capacidad de utilizar diversas fuentes de carbono o nitrógeno para su crecimiento.
- Auxotrofo**: Hongo que para su desarrollo en un medio requiere de sustancias específicas.
- Basidio**: Estructura a partir de la cual se forman las basidiosporas como resultado de la cariogamia y meiosis; los basidios son característicos de los Basidiomycetes.
- Basidiospora**: Espora haploide producida sobre el basio.
- Candelabro fávico**: Hifas ramificadas e hinchadas en los extremos, que se observan principalmente en *Trichophyton schoenleinii*.
- Carpóforo**: Cuerpo fructífero de los Basidiomycetes que contiene a los basidios y basidiosporas.
- Cerebriforme**: Que tiene pliegues como el cerebro.
- Células fumagoides**: Células dematiáceas, redondas, de pared gruesa, en ocasiones septadas. Estas células son diagnósticas de la cromomicosis.
- Columnella**: Estructura en forma de domo, estéril, localizada en el extremo distal del esporangióforo.
- Conidio**: Propágulo originado por un proceso de reproducción asexual.
- Conidióforo**: Hifa especializada sobre la cual se originan directa o indirectamente los conidios.
- Dematiáceo**: Hongo provisto de pigmento marrón, oscuro o negro, de la familia Dematiaceae.
- Dermatofito**: Hongo queratinófilo que pertenece a uno de los géneros siguientes: *Trichophyton*, *Epidermophyton* o *Microsporum*.
- Dimorfismo**: Propiedad que tienen algunos hongos patógenos de presentar una morfología en vida libre y otra diferente, en la fase parasitaria.
- Ectotrix**: Tipo de parasitación dermatofítica en donde las esporas forman una cubierta en la parte externa del pelo.
- Endo-ectotrix**: Infección del pelo en la cual las esporas y filamentos de dermatofitos se encuentran tanto dentro como fuera del pelo.
- Endospora**: Espora producida en el interior de una esférula o de un esporangio cerrado.
- Endotrix**: tipo de parasitación dermatofítica en la cual las esporas se encuentran en el interior del pelo.
- Equinulado**: Que posee equinulas o pequeñas espinas.
- Espora**: En micología estructura producida por un proceso sexual o asexual. La cual es una forma de resistencia.
- 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.

Esquizólisis: Proceso enzimático de separación conidial conidio-célula conidiógena o conidio-conidio, a través de la fisión de un septo doble.

Estado imperfecto: Condición de los hongos que presenta reproducción asexual (anamorfismo)

Estado perfecto: Condición de los hongos que presenta reproducción sexual (telomorfo).

Esterigma: Punto de estrechamiento que origina una basidiospora sobre un talismo.

Fermentación: Capacidad de algunos hongos de utilizar diversos azúcares como fuente de energía con producción de ácido y gas

Fungi imperfecti: Denominación del grupo taxonómico de hongos de los cuales no se conoce su fase sexual o estado perfecto

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

Geofílico: Hongo cuyo hábitat natural es el suelo

Glabroso: Liso

Godetes fávicos: depresiones observadas en la piel cabelluda producidas por la infección de *Trichophyton schoenleium*.

Hábitat: Nicho ecológico donde el hongo crece y se desarrolla normalmente

Hialino: Incoloro, transparente

Hifa: Elemento estructural fundamental de los hongos, puede ser unicelular como las levaduras o pluricelular tomando la forma de filamento septado o aseptado. El conjunto de hifas forma el micelio

Hifa en espiral: Hifa torcida en espiras

Hifa en raqueta: Filamento fúngico formado por una sucesión de células piriformes

Holoárctica: Reproducción sexual por artroconidios que involucra a todas las capas de la pared celular y donde la fragmentación se lleva a cabo por un proceso de esquizólisis

Holoblástica: Reproducción asexual por blastoconidios que involucra a toda la pared fúngica a través de un proceso blástico

Holotática: Tipo de conidiación en donde los conidios se originan a partir de las dos capas de la célula conidiógena a través de un proceso telico

Hongo: Organismo eucariote, perteneciente al reino Fungi

Hongos superiores: Agrupa a los Deuteromycetes, Zygomycetes, Basidiomycetes y Ascomycetes.

Ide: Manifestación cutánea a distancia de hipersensibilidad a los productos fúngicos liberados durante la infección.

Imbricata: Con referencia a un tipo de tiña, que presenta un patrón regular de sobrecapas.

Intertriginosa: Que ocurre entre dos superficies opuestas de piel

Levadura: Hongo unicelular redondeado u ovoides que se reproduce sexual o asexualmente

Levaduriforme: Célula fúngica que tiene forma de levadura

Macroconidio: Conidio que presenta un tamaño mayor de cinco micras y que generalmente presenta septos.

Megaspórica: Término empleado por Sabouraud para describir la tiña de la cabeza de tipo ectotrix en donde se observan grandes esporas en la superficie del pelo.

Micelio: Conjunto de hifas que constituye el cuerpo de un hongo.

Micelio aéreo: Micelio que se desarrolla sobre el sustrato y en el cual se encuentran las estructuras reproductoras.

Micelio cenocítico: Micelio cuyas hifas no presentan septos (micelio continuo) y en donde los núcleos y demás organelos circulan libremente.

Micelio estéril: Micelio que no forma estructuras de reproducción.

Micelio septado: Micelio en donde las hifas presentan tabicaciones dispuestas en forma más o menos regular, cada tabicación presenta uno o varios poros que permiten la comunicación citoplasmática intercelular.

Micelio vegetativo: Conjunto de hifas que se desarrollan en el interior del sustrato y su función principal es nutricional.

Microconidio: Conidio de un tamaño menor de tres micras, generalmente unicelular.

Microide: Término usado por Sabouraud para referirse a las esporas pequeñas en la invasión ectotrix del pelo.

Oportunista: Microorganismo que habitualmente no causa enfermedad, pero que al producirse algún fenómeno de inmunodepresión en el huésped, lo puede infectar.

Oospora: Espora de pared gruesa que se forma por la unión de gametos de los Oomycetes.

Pectinado: En forma de peine.

Piriforme: En forma de pera.

Pleomórfico: Que tiene más de una forma. Se utiliza también para referirse a pérdida de las estructuras reproductoras características que permiten identificar a algunos hongos, este fenómeno es frecuente en los dermatofitos.

Queratinofílico: Que prefiere la queratina.

Querión: Inflamación postulosa de la piel cabelluda que involucra el folículo piloso.

Reproducción asexual: Multiplicación celular por mitosis y que en los hongos da por resultado la producción de conidios.

Reproducción sexual: Involucra la fusión de dos núcleos haploides compatibles y en los hongos da por resultado la producción de esporas.

Saprobio: Ser heterótrofo que se nutre por materia orgánica muerta.

Zigospora: Espora que resulta de la fusión de dos gametangios compatibles. Característica de los zigomycetes.

Zoofílico: Hongos cuyo hábitat natural son los animales inferiores.

Bibliografía

1. Instalación de un Puesto de Trabajo para Micología
2. Arenas Dermatología Atlas, Diagnóstico y Tratamiento Mc Graw Hill México D F (1988).
3. Arenas Micología Médica Ilustrada México D F (1993)
4. Casos de Dermatofitosis y dermatomicosis en los estados Unidos Mexicanos I.N.D.R.E., CODICE CIE 9a. revision (1993)
5. Conant, Micología Ed Interamericana. Mexico D. F (1972)
6. Culture media for Growing dermatophytes J. Am. Acad. Dermatol S107 - S108, 1994.31.
7. Diario Oficial. Secretaria de desarrollo Social. Agosto México D.F (1994)
8. Incidencia de las Micosis en el Servicio de Micología del Centro Dermatológico Pascua en el Año de 1991. Revista del Centro dermatológico Pascua (1993) Vol 2 No. 2 Mayo - Agosto. Dermatophytoses in México City Micosys PP 37, 49 - 52 (1994)
9. Jawetz. Manual de Microbiología Médica 9a edición Ed El manual moderno México D.F. (1981).
10. La reacción del Acido peryodico de Shiff mas Dimetilsulfoxido para el Diagnóstico de Micosis Superficiales y de Eritrasma en raspaduras de la Piel y Uñas Dermatología revista Mexicana 38 (6) PP. 403 - 408 (1994)
11. Martinez, L. J. Mendez, F. H. Hernandez, R. C. Oliva. Micología Médica Procedimientos para el diagnóstico de Laboratorio Ed Trillas México D F (1995)
12. Okkin and H I Marback Dermatología Ed El manual moderno Mexico D F (1992).
13. Pelczar. Microbiología 4a edición Mc Graw Hill Mexico D F (1982)
14. Pompa, J.M. Gutierrez Biología Compañía editorial continenta. México D F (1970)
15. Prácticas Adecuadas de Laboratorio. 2a edición México D F (1993)
16. Rippon. Tratado de Micología Médica 3a edición. Ed Interamericana Mexico D.F. (1990).
17. Validación de Medios de Cultivo. Comité Nacional de Validación México D F (1990).
18. Henry. Diagnóstico y Tratamiento Clínico por el Laboratorio Tood-Sanford-Davidsohn. 7a edición Ed Salvat España 1984
19. M.J. Linch Métodos de Laboratorio 2a edición. Ed Interamericana. Mexico D F. (1980)
20. Davise H. Larone. Medically Important Fungi (A guide to identification) 3a Edition American Society Microbiology Press Washington D.C 1995
21. F.J. Carleton, J.P. Agalloco. Validation Aseptics Process Pharmaceutics. Marcel Dekker inc. De. New York E.U.A (1986).