



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

**COMPARACIÓN DE TRES TÉCNICAS: UNA
SEMIAUTOMATIZADA Y DOS MANUALES PARA LA
TIPIFICACIÓN DE HONGOS LEVADURIFORMES**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

FLORES OCAMPO CESAR ADRIAN



México D.F.

2014



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:	Profesor: Abel Gutiérrez Ramos
VOCAL:	Profesor: Ruth Edith Martin Fuentes
SECRETARIO:	Profesor: Gerardo García Camacho
1er. SUPLENTE:	Profesor: Vanessa Rebeca Maya Ampudia
2° SUPLENTE:	Profesor: Javier Fernández Torres

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA, LABORATORIO DE PARASITOLOGÍA Y
MICOLOGÍA

ASESOR DEL TEMA:

M en A. Gerardo García Camacho

SUPERVISOR TÉCNICO:

Q.F.B. Dorian Sanchez Figueroa

SUSTENTANTE (S):

Flores Ocampo Cesar Adrian

Índice

Resumen	1
Introducción	3
Género <i>Candida</i>	5
Género <i>Cryptococcus</i>	6
Otros Géneros de Levaduras.....	7
Objetivos	9
Objetivo General	9
Objetivos particulares.....	9
Marco teórico	10
Procedimientos para obtención, transporte y conservación de muestras	11
Muestras para Hemocultivo	11
Muestras de orina para cultivo	12
Muestras de biopsias	13
Muestras de esputo y secreciones bronquiales	13
Muestras de líquido cefalorraquídeo	14
Procedimientos para el diagnóstico micológico.....	16
Examen directo.....	17
Cultivo.....	17
Identificación de levaduras	18
Estudio morfológico	19
Tipificación.....	21
Agar Harina de maíz más Tween 80	21
Medios de cultivos diferenciales	23
CHROMagar <i>Candida</i> ®	25
<i>Candida</i> ID®	26
<i>Candida</i> ID2® (CAN2)	26
Pruebas fisiológicas y bioquímicas	27
Detección de enzimas.....	27
Métodos Automatizados	28

MicroScan Rapid Yeast Identificacion®.....	29
RapID Yeast Plus System®.....	29
Sistema VITEK.....	30
Métodos Inmunológicos.....	30
Estudios de Biología Molecular.....	32
Otras técnicas complementarias.....	32
Candidiosis.....	33
Dosificación pediátrica.....	35
<i>Candida albicans</i> y <i>Candida dubliniensis</i>	36
Criptococcosis.....	37
Diagnóstico por el laboratorio.....	39
Examen directo.....	39
Cultivo.....	39
Pruebas inmunológicas.....	40
Factores de patogenicidad.....	40
Trichosporonosis.....	41
Características.....	43
Factores de virulencia de <i>Trichosporon spp</i>	43
Tratamiento.....	45
<i>Rhodotorula sp</i>	46
Factores de riesgo.....	47
Síntomas y mortalidad.....	47
Diagnostico e identificación microbiológica.....	48
Tratamiento.....	48
Prototecosis.....	48
Diagnóstico de fungemia por <i>Malassezia spp</i>	51
Características morfológicas y fisiológicas.....	53
<i>Malassezia furfur</i>	53
<i>Malassezia pachydermatis</i>	53

<i>Malassezia sympodialis</i>	54
<i>Malassezia globosa</i>	54
<i>Malassezia restricta</i>	55
<i>Malassezia obtusa</i>	55
Material	57
Métodos	60
Resultados	78
Análisis de resultados y Discusión	90
Conclusiones.....	104
Acción de mejora.....	107
Recomendaciones.....	109
Anexos	110
Bibliografía	114

Resumen

El objetivo de este trabajo fue comparar tres sistemas de asimilación de sustratos para la identificación de levaduras de interés médico, con la finalidad de obtener resultados veraces, oportunos y de calidad durante el proceso de tipificación para el apoyo al diagnóstico del clínico. Se evaluaron 37 cepas de muestras biológicas obtenidas de pacientes del Instituto Nacional de Pediatría (INP) y 3 cepas ATCC (American Type Culture Collection) como control de calidad.

Así mismo se buscó destacar la importancia del medio cromogénico CHROMagar Candida® (CA) en el diagnóstico clínico, para la determinación de micosis mixtas, aislamiento, diferenciación y caracterización morfológica, apoyando los resultados obtenidos con el agar harina de maíz (AHM) + tween 80 en el estudio microscópico de las levaduras. Se hace referencia a las principales levaduras patógenas de importancia clínica en paciente pediátricos tales como: *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, y otras especies emergentes como es el caso de *Trichosporon sp.*, *Rhodotorula sp.*, por lo que es necesario recurrir a técnicas que nos permita obtener resultados presuntivos como CA y AHM + tween 80 e inclusive a aquellas metodologías que nos permiten una rápida identificación como es el caso de MriroScan® (MS), RapID® e ID 32 C® considerado el estándar de oro.

Se destaca la importancia que tiene el proceso de aislamiento e identificación a nivel de género y especie, que permite enriquecer, los datos sobre la casuística y epidemiología de las micosis causadas por levaduras, principalmente en el grupo de mayor impacto, referido como “levaduras emergentes”.

Destacando el análisis de los resultados de tipificación del periodo 2006-2012, describiendo las variaciones que ha traído el surgimiento de géneros emergentes en procesos infecciosos tratando de reflejar algunos de los factores que pueden impactar en los resultados obtenidos, como es el empleo de tratamientos

profilácticos, calidad de la muestra, condiciones de desarrollo, los factores de patogenicidad y el cumplimiento de una serie de tres muestras enviadas al laboratorio para completar un esquema que eleve el aislamiento de levaduras.

Introducción

En los últimos años ha incrementado la incidencia de infecciones fúngicas, la relación de los hongos con el hombre es conocido desde hace tiempo, son organismos ubicuos y nos encontramos expuestos a ellos, diversos factores han provocado una mayor predisposición a enfermedades causadas por diversos géneros de levaduras y hongos miceliales. Los avances médicos han mejorado la capacidad preventiva y de diagnóstico de las enfermedades producidas por hongos. Desafortunadamente, ciertas terapias que implican procedimientos quirúrgicos invasivos y materiales protésicos o de agentes quimioterapéuticos, elevan la vulnerabilidad del huésped frente a un amplio espectro de patógenos oportunistas.^{1, 2, 3, 5, 8}

El término levadura etimológicamente significa “organismo unicelular”, algunas levaduras se reproducen por fisión, de forma saprofita puede encontrarse como hifa dependiendo de ciertas condiciones nutricionales, pueden existir en forma unicelular o levaduriforme como forma infectante (dimorfismo).^{3, 5, 17}

Muchas levaduras pueden producir esporas sexuales (ascosporas y basidiosporas *Sporobolomyces*) bajo condiciones ambientales apropiadas, formando parte taxonómicamente de las familias de ascomycetes y basidiomycetes. En otros casos, el estado sexual no ha sido aún descrito y su relación con otros hongos no está suficientemente definida, por lo que son clasificadas dentro de las levaduras imperfectas o deuteromycetes.^{1, 2, 3, 5, 17}

Las levaduras son microorganismos aerobios facultativos que generalmente tienen la capacidad de asimilar azúcares hasta dióxido de carbono o etanol, en función de dos variables, las condiciones de presencia de oxígeno y/o azúcares, para ello adapta su maquinaria enzimática con objeto de seguir un metabolismo u otro. Sin embargo, cuando la presencia de azúcares es muy reducida (menor de 1 g/L) o las condiciones de pH, temperatura, nutrientes, etc. son hostiles, la maquinaria enzimática de

asimilación de azúcares se destruye para fabricar nuevos enzimas como la ureasa, fosfatasa, proteasa que ayuden a proteger a la levadura.^{1, 2, 5, 17}

A pesar de que predominantemente la mayoría de las infecciones fúngicas están producidas por *Candida albicans*, aunque hay que destacar el aislamiento, con una frecuencia cada vez más elevada, de otras especies como *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida famata*, *Candida dubliniensis*, *Trichosporum sp*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus albidus*, *Rhodotorula sp*, y *Prototheca sp*. Las levaduras del género *Candida* pueden causar un gran número de cuadros clínicos, con manifestaciones variadas que van ligadas al lugar de la infección y tipo de paciente. Diferenciar entre colonización e infección es un punto clave a la hora de realizar el diagnóstico microbiológico a partir de las distintas muestras clínicas, a pesar de ser *Aspergillus spp.* el principal organismo de micosis por hongos miceliales, actualmente ha presentado un incremento la incidencia de hongos oportunistas como: *Fusarium spp.*, *Acremonium sp*, *Paecilomyces spp*, *Mucor spp.*, *Rhizopus spp.*^{1, 3, 5, 8, 38}

Auxonograma: está basado en la asimilación de carbohidratos o compuestos nitrogenados en presencia de O₂, los métodos son variantes de la técnica de Beijerinck. Estas pruebas identifican qué fuente de carbono puede utilizar una levadura, la mayoría de los sistemas automáticos como semiautomáticos, emplean principalmente los patrones de asimilación.^{2, 4}

Zimograma: se fundamenta en la fermentación de carbohidratos, se cultiva la levadura en medio líquido con un glúcido y un indicador coloreado, es detectada mediante cambios de pH por medio de un viraje que evidencia el proceso de fermentación (y producción de gas pruebas convencionales). Se emplean tubos de hemólisis Ivan-Hall, con un estrechamiento y una perla de vidrio que opera como válvula.^{2, 4}

La identificación de los agentes etiológicos hasta nivel de especie, desempeña un papel muy importante, ya que algunas levaduras y hongos presentan patologías específicas. La irrupción de nuevas especies en la clínica hace necesario el desarrollo de métodos rápidos, eficaces y simples para la identificación de levaduras. La identificación presuntiva rápida y segura de estos microorganismos asegura la eliminación de periodos de incubación prolongados, aportando la ventaja de una reducción de tiempo, manipulación, material y por ello del coste relativo a cada identificación.^{2, 4, 6, 8}

En cuanto a hongos patógenos en humanos, existen cerca de 200 especies que han sido reconocidas; de estas, alrededor de 30 son levaduras de interés médico.^{5, 6, 60}

La temperatura de crecimiento de la mayoría de las levaduras de interés clínico está comprendida entre 25 y 37° C. El valor óptimo se sitúa a los 28° C. Sin embargo estas temperaturas no son rigurosamente las óptimas de crecimiento de las levaduras cuando se encuentran en sus ambientes naturales, de modo general no son microorganismos termofílicos.^{5, 6, 8, 17}

Género *Candida*

El género *Candida* (el cual pertenece a la microbiota de nuestro organismo) es un grupo de levaduras sumamente ubicuas de características muy diversas, abarca más de 160 especies, de las cuales se considera que sólo 18 son patógenas. El potencial patógeno de las levaduras varía en forma considerable no todas las cepas de una misma especie presentan igual capacidad patogénica, siendo *Candida albicans* el microorganismo con mayor frecuencia aislada como causante de enfermedades mortales en seres humanos.^{1, 2, 5, 6, 7, 8}

Son responsables de la candidosis, micosis oportunista, aguda, subaguda o crónica, de alta incidencia en nuestro medio y a nivel mundial; siendo estos los factores predisponentes del huésped, pueden afectar a individuos de cualquier edad, raza o

sexo en combinación con los factores de virulencia del microorganismo, en conjunto son las causas que favorecen el desarrollo de la infección.^{1, 2, 5, 6, 7, 8}

Se ha observado que alrededor de otras 10 especies del género *Candida* han incrementado su importancia, desde el punto de vista clínico, como agentes causales de infección; entre estas tenemos: *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. famata*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. glabrata*, *C. pelliculosa*, *C. lusitanae*, *C. utilis*.^{1, 2, 5, 6, 8,}

38

Género *Cryptococcus*

El género *Cryptococcus* incluye muchas especies, *C. neoformans* se considera el principal patógeno humano, existen referencias en la literatura de otras especies, como *Cryptococcus laurentii* y *Cryptococcus albidus*, que han producido enfermedad en humanos, especialmente en personas inmunodeprimidas. *Cryptococcus sp* es una levadura capsulada de naturaleza polisacaroídica que le confiere virulencia, además de que lo protege de la fagocitosis, su tamaño varía dependiendo de la cepa y la virulencia, y del estado inmunológico del paciente, posee gran afinidad por el sistema nervioso central, siendo la meningoencefalitis la presentación clínica más habitual.^{2, 6, 11}

Dentro de *C. neoformans*, de acuerdo a la composición de la cápsula, se han descrito al menos cuatro serotipos distintos, denominados A, B, C y D. El serotipo D se identifica como *C. neoformans* var. *neoformans*, mientras que el serotipo A como *C. neoformans* var. *grubii* y los serotipos B y C, como *C. gattii*. Existen diferencias tanto del punto de vista patogénico como de distribución geográfica, de tal forma que *C. neoformans* var. *neoformans* se ha relacionado con la infección en los pacientes inmunodeprimidos, siendo de distribución mundial, mientras que *C. gattii* se ha descrito en infecciones de pacientes inmunocompetentes y su distribución está más restringida a países tropicales y subtropicales. También se diferencian estas

variedades por sus características bioquímicas: los tipos B y C, asimilan los ácidos 1-málico, fumárico y succínico, producen pigmento sobre agar niger, de color verde, y sobre agar con L-cavanina-glicina-azul de bromotimol, y asimilan la glicina como única fuente de carbono. Los serotipos A y D, por el contrario, no presentan estas reacciones. La distribución en la naturaleza es asimismo diferente: los tipos A y D se asocian con las deyecciones de palomas y otros pájaros, mientras que los otros dos tipos C se han encontrado en distintas especies de eucaliptos (*Eucalyptus calmadulensis*, *Eucalyptus rudis*, etc.) y en los koalas de Australia.^{6, 11, 21}

Otros Géneros de Levaduras

Existen otras levaduras de interés médico, como es el caso de las ocho especies del género *Malassezia*, *Geotrichum candidum*, *Trichosporon* spp., *Rhodotorula* spp., *Sporobolomyces* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, y otras. La mayoría de las levaduras antes mencionadas, constituyen en menor o mayor grado, parte de la microbiota normal del organismo. Su incidencia puede variar de acuerdo a la localización clínica y procedencia geográfica. El alga aclorofílica del género *Prototheca*, es estudiada dentro de este grupo, debido a la similitud del cultivo con el género *Candida*, *Prototheca zopfii* y *Prototheca wickerhamii* son las más reportadas.⁶

Las patologías desarrolladas por este tipo de levaduras comunes de la microbiota cutánea, mucosa y gastrointestinal del organismo, pueden abarcar un amplio espectro clínico como son: lesiones superficiales (pitiriasis versicolor, dermatítis, foliculítis, etc), cutáneas (intertrigo, paroniquia, zona pañal, etc), lesiones de mucosa (oral, gástrica, entérica, genital) y lesiones sistémicas (septicemias, endocarditis, casos meníngeos, etc.).^{1, 2, 3, 5, 10}

La causa principal de patogenicidad de estas levaduras está relacionada con alteraciones del sistema inmunológico del huésped, así como con otros factores predisponentes, que puedan interferir en el equilibrio del nicho biológico que mantienen a estas levaduras en estado de comensal. Entre los factores desencadenantes podemos mencionar: embarazo, edades extremas (infancia y vejez), uso prolongado de antibióticos, antineoplásicos, glucocorticoides, drogas, uso de prótesis dentales, etc. ^{1, 2, 3, 5, 7, 10}

En el sentido más estricto, no existen levaduras patógenas por naturaleza; los géneros que están relacionados con enfermedades en el hombre o animales, son incapaces de producir infección en un individuo sano. Se deben mostrar algunas alteraciones en las defensas celulares del huésped, en la fisiología, o en la composición de la flora normal para favorecer una colonización, infección y así se desarrolle una enfermedad por causa de las levaduras. Por otra parte, no todas las cepas de una misma especie presentan igual capacidad patogénica. ^{1, 2, 3, 5, 7, 10}

Múltiples factores han influido en el cambio clínico epidemiológico en las micosis invasivas, las causas predisponente que incrementan la frecuencia de contagios por levaduras son: ^{1, 2, 3, 5, 6, 7, 10, 60}

- Incremento en el empleo de quimioterapia, trasplantes de médula ósea y otros órganos, en conjunto de una inmunosupresión severa.
- Hospitalización prolongada.
- Cateterismo vasculares.
- Suministro prolongado de antibacterianos de amplio espectro.
- Uso profiláctico prolongado de antimicóticos (principal causa de resistencia).

Objetivo General

- Establecer los procedimientos de laboratorio para realizar el aislamiento e identificación de los principales géneros de levaduras de importancia médica mediante tres sistemas de pruebas bioquímicas evaluando sus ventajas y desventajas.

Objetivos particulares

- Determinar la eficacia mediante medios cromógenos para el diagnóstico presuntivo de agentes levaduriformes.
- Determinar la eficacia de las diferentes técnicas (MicroScan®, ID32 C® y RapID®) para la tipificación de levaduras.
- Estudiar la influencia de variables experimentales como son el tiempo y temperatura de incubación sobre el crecimiento de las levaduras procedentes de muestras clínicas.
- Realizar un análisis retrospectivo de los resultados obtenidos en el aislamiento e identificación de levaduras en el laboratorio de parasitología y micología (LPM) del Instituto Nacional de Pediatría (INP) del año 2006 al 2012.
- Realizar un análisis retrospectivo de los resultados obtenidos en el aislamiento e identificación de levaduras de las muestras aisladas en el laboratorio de bacteriología y tipificadas en el LPM del 25 de septiembre de 2012 al 24 de septiembre 2013.

Marco teórico

El estudio de los microorganismos con base a la descripción de la morfología colonial y microscópica, no es suficiente para hacer una identificación satisfactoria, es por ello que se tiene que recurrir al estudio de su comportamiento bioquímico, es decir, cómo utilizan los nutrimentos. Existen un gran número de pruebas metabólicas que nos permiten llegar a la caracterización de especie de una levadura, por ello es de vital importancia contar con técnicas más fáciles, económicas, veraces y de calidad para garantizar un mejor servicio a nuestros usuarios.^{2, 4, 10, 56}

La identificación de las distintas especies de levaduras que se aíslan de muestras biológicas como la sangre, biopsias o cualquier otro líquido corporal estéril es justificada por el aumento de pacientes con padecimientos debilitantes, como pueden ser: diabéticos, inmunosuprimidos, trasplantados, etc., debido a que las levaduras forman parte de la biota normal de piel y mucosas, el aislamiento a partir de hisopos nasofaríngeos, esputo, lavados bronquiales, orina, raspados de uñas, muestras vaginales o heces, hacen que su hallazgo sea cuestionable y minimiza su significado clínico.^{1, 2, 4, 62}

Las pruebas bioquímicas se utilizan para la tipificación de bacterias y levaduras; teniendo como finalidad detectar enzimas, asimilación de aminoácidos, fermentación de carbohidratos, o basándose en el crecimiento que presenta la levadura por asimilación de distintos azúcares.^{4, 6, 10}

La irrupción de nuevas especies en la clínica humana hace necesario el desarrollo de métodos rápidos, eficaces y simples para la identificación de levaduras que puedan ser utilizados en la rutina del laboratorio de Micología Clínica. Algunos métodos de identificación automatizados comerciales pueden requerir un tiempo demasiado elevado antes de ofrecer el resultado, o ser poco asequibles para laboratorios de tipo medio o rutina.^{4, 6, 10}

Los avances diagnósticos y terapéuticos han favorecido el incremento de la supervivencia de pacientes inmunosuprimidos mejorando su calidad de vida y disminuyendo su estancia hospitalaria. Así mismo las infecciones intrahospitalarias atribuidas a infecciones micóticas por levaduras se ha incrementado, por lo que es importante conocer las pruebas diagnósticas de rutina para su tipificación.^{4, 6, 10, 32, 60}

Procedimientos para obtención, transporte y conservación de muestras

Es fundamental un adecuado procedimiento de obtención de muestras biológicas ya que esto permitirá el establecimiento definitivo del diagnóstico por parte del laboratorio, al recuperar e identificar al agente etiológico de forma adecuada. Todas las muestras deben de transportarse en recipientes herméticos que impidan la contaminación del personal, muestra y medio ambiente en caso de derrame, sin embargo, las muestras dermatológicas pueden transportarse en un recipiente seco (placa de Petri, papel de fotografía negro o entre dos portaobjetos). En general, no deben introducirse en medios de transporte, a no ser que sea fácil retirar la muestra del medio.^{12, 14, 21, 62}

Muestras para Hemocultivo

Hoy día, para la recuperación de levaduras de la sangre se recomienda el uso de los mismos sistemas automatizados de monitorización continua utilizados para bacterias. Considerar las medidas de asepsia al obtener la muestra, para evitar contaminaciones en los hemocultivos. En el caso de adultos recoger de dos a tres muestras de 8 a 9 mL de sangre venosa de diferentes punciones y separadas por 30 minutos o una hora entre sí. En el caso de niños, obtener un sólo espécimen de 1 a 5 mL, en lactantes 1 a 2 mL y neonatos de 0,5 a 1 mL, una vez obtenida la muestra de sangre, ésta debe de ser inoculada de inmediato en el sistema de hemocultivo que el

laboratorio trabaja, homogenizando suavemente para evitar la coagulación de la muestra. Los sistemas automatizados integran el sistema de detección, el incubador y el mecanismo de agitación en una sola unidad, cada frasco de hemocultivo se procesa individualmente (Tabla 1).^{12, 14, 21, 61}

Muestras de orina para cultivo.

Se recomienda colectar en un recipiente de boca ancha, con tapa de rosca y estéril un volumen entre los 10 mL (niños) y hasta los 20 o 25 mL (adulto) para un adecuado estudio micológico, la primera parte de la micción se elimina, por contener microbiota de arrastre de la porción distal de la uretra, de la misma forma desechar la parte final, por su escaso contenido microbiano. Se recoge la parte media de la micción matinal, la más representativa del estado de las vías urinarias y la más idónea para el cultivo. Este tipo de procedimiento lo realiza el paciente, quien previamente debe de realizar la limpieza de sus genitales con agua y jabón.^{12, 14, 21, 63}

Para obtener muestra de lactantes se debe usar una bolsa colectora estéril la cual se coloca en los genitales manteniéndola hasta la micción. No olvidar realizar la higiene de la zona incluyendo la región anal. Si no se produce la micción dentro de los 30 minutos posteriores a la colocación de la bolsa, ésta debe de ser sustituida.^{12, 63}

El cateterismo vesical efectuado de manera aséptica, después de un lavado cuidadoso de los genitales, es el procedimiento más adecuado para recoger orina cuando se sospecha una candidiasis urinaria, implica cierto peligro de sobreinfección de vías altas. Se recurre al sondaje ante la imposibilidad de obtener buenos resultados por los métodos directos. En pacientes con sonda permanente, la orina se toma por punción aséptica de la sonda, nunca de la bolsa de recogida.^{12, 63}

Las muestras genitourinarias deben de procesarse inmediatamente después de obtenidas debido a que el rápido desarrollo de las levaduras a temperatura ambiente

puede dar una falsa concentración en la muestra. Si no se puede proceder con el análisis, refrigerar la muestra a 2 a 8 °C por un máximo de 12 horas, (Tabla 1).^{12, 63}

Muestras de biopsias

Se realiza en el quirófano o consultorio bajo las más rigurosas reglas de asepsia. Obtenida la muestra es colocada en un recipiente estéril con tapa de rosca conteniendo solución salina isotónica estéril para el examen micológico y cultivo (una fracción de la muestra es colocada en formol al 10% en solución salina buferada para histopatología). La muestra para el estudio micológico debe de ser remitida de inmediato al laboratorio. Sin embargo, de no ser procesada al momento, conservar a 4 °C por dos a cuatro horas (Tabla 1).^{12, 14, 21, 61}

Muestras de esputo y secreciones bronquiales

Debe preferirse la expectoración espontánea (esputo) como muestra de estudio para el diagnóstico de laboratorio de micosis broncopulmonares. Este es un espécimen representativo y puede repetirse sin inconvenientes. Sin embargo, tiene la desventaja de arrastrar microorganismos colonizantes de boca y faringe. Las muestras deben de transportarse al laboratorio en un plazo no mayor a dos horas desde su obtención. Una vez recibido el espécimen en el laboratorio se deberá procesar de inmediato o conservar en refrigeración a 4 °C de cuatro a seis horas. Para un mejor diagnóstico se recomienda procesar tres muestras diferentes de esputo, siendo lo ideal cinco especímenes emitidos en días sucesivos (Tabla 1).^{12, 21, 64}

El lavado broncoalveolar (LBA) se obtiene por fibrobroncoscopía, reduciendo la presencia de contaminantes de boca y vías respiratorias superiores. Una vez recibido el espécimen en el laboratorio se deberá procesar de inmediato o en su defecto conservar en refrigeración a 4 °C de cuatro a seis horas, (Tabla 1).^{12, 21, 64}

El aspirado bronquial se obtiene mediante un fibrobroncoscopio, se aspira secreciones del árbol bronquial, previa irrigación de 5 a 10 mL de suero fisiológico. El aspirado está indicado cuando el volumen de líquido recuperado en el lavado broncoalveolar es insuficiente y existe sospecha de infección fúngica pulmonar. Una vez recibido el espécimen en el laboratorio se deberá procesar de inmediato o en su defecto conservar en refrigeración a 4 °C de cuatro a seis horas (Tabla 1).^{12, 21, 64}

Muestras de líquido cefalorraquídeo

Desinfectar la zona por punzar con yodopovidona al 2%. El médico debe de realizar la punción en los espacios intervertebrales L3 – L4, L4 – L5 ó L5 – S1, al llegar al espacio subaracnoideo, retirar el estilete y dejar fluir libremente la muestra. Recoger un volumen mínimo del espécimen de 5 mL en un tubo estéril con tapa de rosca. Transportar al laboratorio a temperatura ambiente. De no procesar de inmediato conservar a temperatura ambiente por un máximo de 24 horas, debido a que las bajas temperaturas afectan principalmente a *C. neoformans* (Tabla 1).^{12, 14, 61}

Para alcanzar el éxito en el diagnóstico micológico es fundamental realizar adecuadamente la recolecta de la muestra, su transporte y procesamiento, la siembra de la misma en los medios idóneos y a la temperatura adecuada, así como la identificación e interpretación correcta de los aislamientos. Únicamente con el procesamiento adecuado se puede recuperar el hongo claramente asociado con el proceso infeccioso^{12, 14, 61}

Teniendo siempre presente, a la hora de valorar un crecimiento fúngico, la necesidad de diferenciar un “aislamiento significativo” de otros debidos a hongos contaminantes, ya que es importante conocer la diferencia entre aislar una especie fúngica y el diagnosticar una micosis.^{2, 10, 12, 14, 54}

El diagnóstico de las micosis comienza con la sospecha clínica y una adecuada obtención de la muestra, a partir de la lesión y su correcta manipulación, para mantener la viabilidad del agente etiológico y evitar posibles contaminaciones, son aspectos fundamentales que siempre deben tenerse en cuenta para la obtención de un correcto diagnóstico micológico.^{4, 10, 62}

Tabla 1: Muestras más comunes, etiología más probable recolección y transporte ^{12, 14, 21, 62}

Muestra	Probable hongo	Toma y transporte
Biopsias	Levaduras, hongos filamentosos.	Usar estrictas condiciones de asepsia y tomar la muestra de la zona central de la lesión. Colocar la muestra en un tubo o frasco estéril con suero fisiológico estéril no bacteriostático para prevenir la desecación.
Catéter	<i>Candida spp. Malassezia spp.</i>	Es importante tomar de 3-5 mL, inocular directamente el medio de cultivo
Raspado Corneal	<i>C. albicans, C. neoformans.</i> Hongos filamentosos; <i>Aspergillus spp., Fusarium spp.;</i> <i>Paecilomyces spp., Penicillium</i> <i>spp., hongos dematiáceos</i>	Inocular directamente en el medio tocando con la muestra toda la superficie. Obtención de la muestra por el oftalmólogo en el quirófano; después de raspar varias veces la córnea con un bisturí.
Heces	Sólo se recomienda en caso de candidosis diseminada.	Inocular directamente en el medio distribuyendo toda la muestra por el medio.
Secreción de herida	Levaduras, micetomas, actinomicosis y esporotricosis	Inocular directamente en el medio distribuyendo toda la muestra por el medio mediante hisopado.
Líquidos estériles (LCR, pleural, peritoneal)	<i>Candida spp. H. capsulatum, C. neoformans</i>	Tras la preparación adecuada de la zona, obtener el líquido con jeringa en condiciones de esterilidad. Transferir a tubo estéril. Recoger como para bacterias, al menos 2 ml en contenedor estéril.
Médula ósea	Histoplasmosis, candidosis, criptococosis. (<i>C. neoformans, H. capsulatum</i>)	Obtener el líquido con jeringa en condiciones de esterilidad. Transferir a tubo estéril. Recoger al menos 2 ml en contenedor estéril.
Cavidad oral	<i>Candida spp., Paracoccidioides brasiliensis</i>	Tomar con hisopo de la lesión activa Inocular directamente en el medio distribuyendo toda la muestra por el medio.
Orina	Sospecha de candidosis urinaria, candidosis diseminada y criptococosis. Levaduras <i>C. neoformans, C. immitis, H. capsulatum, B. dermatitidis.</i>	Primera orina de la mañana en contenedor estéril. Orina obtenida por sondaje. Orina. Volumen necesario entre 10 y 50 ml.

Piel lampiña, pitiriasis versicolor	<i>Malassezia</i> spp.	Adherir cinta adhesiva (scotch) de varias zonas de la piel para observación directa al microscopio.
Respiratorias: esputo, aspirado traqueal, aspirado bronquial, lavado broncoalveolar	Micosis profundas (candidosis, coccidiomicosis, aspergilosis, histoplasmosis, mucormicosis) y actinomicosis (actinomicosis, nocardiosis) de localización pulmonar. Levaduras, hongos filamentosos.	Recoger 3 esputos en 3 días consecutivos. Los hongos dimórficos sobreviven poco tiempo. Requieren procesamiento in-mediato. Cuando sea posible lavado broncoalveolar, cepillado bronquial.
Sangre	Cuando se sospecha criptococosis, candidosis, histoplasmosis diseminada y otras fungemias (<i>Fusarium</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp.). <i>Candida</i> spp., <i>Malassezia</i> spp., <i>C. neoformans</i> , <i>H. capsulatum</i> .	Desinfectar la zona con compuesto iodado. Medios líquidos (bifásicos). Extraer de 3-5 mL de sangre. La mayoría de las <i>Candida</i> spp. se puede recuperar en los hemocultivos.
Uñas	Sospecha de onicomicosis. <i>Trichophyton</i> spp. <i>Epidermophyton floccosum</i> <i>Microsporium</i> spp. <i>Candida</i> spp.	Desinfectar con alcohol 70%. Lesiones dorsales: raspar la superficie y desecharla, recoger la parte profunda. Lesiones subungueales o dístales: recoger los residuos de debajo de la uña con bisturí o cucharilla de lecron, eliminando raspar la parte inferior de la uña. Lesiones periungueales: tomar escamas o exudado. Depositar la muestra en placa Petri estéril o entre dos portaobjetos.
Secreción vaginal	<i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>Candida</i> spp	Tomar con hisopo de la lesión activa Inocular directamente en el medio distribuyendo toda la muestra por el medio.

Procedimientos para el diagnóstico micológico

En el análisis clínico de infecciones causadas por hongos se destacan básicamente dos tipos de estudios fundamentales, el examen directo y el cultivo, que permitirán un mejor diagnóstico. Para asegurar una recuperación de hongos a partir de muestras clínicas, éstas deben de procesarse de inmediato mediante su inoculación sobre medios de cultivo que nos permitan su aislamiento.^{6, 10, 12, 18, 21}

Para optimizar tanto la observación microscópica como el cultivo, es necesario preparar la muestra, aunque algunas se pueden inocular directamente sin que sea necesaria su manipulación previa. Todas las muestras deben observarse

macroscópicamente y de ser posible seleccionar la parte más representativa. En muestras como esputo y tejidos deben buscarse las zonas de pus, caseificación, o necrosis.^{4, 6 10, 12, 18, 21, 62}

El diagnóstico definitivo de la mayoría de las micosis requiere el aislamiento e identificación del hongo (levaduras) a partir del cultivo, lo que supone, con frecuencia, varios días o semanas para poder llegar a la tipificación. No obstante, el método más rápido para la detección de estructuras fúngicas en una muestra clínica es el examen microscópico de la misma.^{6, 10, 12, 18, 21, 62}

Examen directo

Este procedimiento no sustituye al cultivo. Brinda información preliminar o presuntiva al ser una técnica rápida que puede ser útil al clínico y en algunos casos llegar a ser diagnóstica como es el caso de la pitiriasis versicolor (PV). Es así, que la presencia de hifas septadas, hifas cenocíticas dicotómicas hialinas, pseudofilamento o blastoconidias, permitirá la toma de decisiones para lograr una mejor evolución del paciente para dar inicio del tratamiento.^{1, 2, 4, 6, 10, 12, 18, 21, 62}

Hidróxido de potasio (KOH): Disuelve rápidamente las células permitiendo digerir material proteico, observando con mayor nitidez los elementos fúngicos, su efecto de clarificar puede incrementarse al calentar al fuego ligeramente la preparación. Adicionalmente, se puede emplear colorante para pigmentar la pared de los hongos y mejorar la visualización. La observación de hifas, permite sugerir la presencia de invasión micótica.^{1, 2, 4, 6, 10, 18, 21, 62}

Cultivo

Se efectúa por siembra del material clínico en medios de cultivo como Sabouraud-Dextrosa agar (SDA), Sabouraud-cloranfenicol, mycosel, alpiste negro, etc. La

mayoría de estas levaduras presentan un crecimiento entre 3-5 días de incubación, cabe destacar que algunas levaduras desarrollan lentamente requiriendo un periodo de incubación más prolongado siendo influenciado por la temperatura. El crecimiento del cultivo nos puede mostrar colonias pastosas compactas o rugosas de color blanco a crema (sugestivas de *Candida*, *Saccharomyces*, *Prototheca*), colonias anaranjadas o coral (*Rhodotorula*), mucoides (*Cryptococcus*), de consistencia dura, superficie rugosa y seca (*Geotrichum*, *Trichosporon*) etc., o se pueden observar colonias algodonosas que indica el crecimiento de un hongo micelial, que podrá ser identificado por sus estructuras de reproducción características dependiendo del género y especie.^{4, 6, 10, 18, 21, 62}

Se debe tomar en cuenta que las levaduras se encuentran como comensales en el organismo y es fundamental confirmar su significado patológico, para lo cual se debe tomar en cuenta la positividad del examen directo y el crecimiento de un número considerable de colonias en el medio de siembra, así como su aislamiento en forma repetida del mismo sitio de la lesión.^{1, 2, 4, 6, 10, 18, 21, 62}

Existen casos en los que en el primocultivo se puede observar el desarrollo de dos tipos de colonias visiblemente diferentes las cual pueden variar en las características morfológicas, consistencia, tamaño, por lo que es importante aislarlas para demostrar que se trata de la misma especie, este suceso se considera como una estrategia patogénica del hongo ante los cambios del microambiente que enfrenta tanto como en su fase comensal como en su estado patógeno. Este fenómeno se denomina “switch” fenotípico que presentan principalmente algunas especies de *Candida*, el cual da como resultado cambios fenotípicos con alta frecuencia.^{4, 6, 10, 12, 18, 21, 62}

Identificación de levaduras

Actualmente se cuenta con diversas metodologías, los cuales varían en tiempo, especificidad, sensibilidad, costos, etc. De esta manera, cada laboratorio puede

acoger las más acordes a su capacidad y disponibilidad. Sin embargo, cabe señalar que es un requisito indispensable para abordar estas metodologías contar con personal bien entrenado para la aplicación e interpretación de las mismas.^{6, 10, 21, 62}

Las técnicas de identificación pueden ser agrupadas en: 1. Estudio morfológico; 2. Estudio fisiológico y bioquímico; 3. Métodos automatizados; 4. Medios diferenciales o de identificación directa; 5. Métodos inmunológicos; 6. Biología molecular.^{4, 6, 10, 21, 62}

Estudio morfológico

Evaluación macroscópica: estos criterios tienen en cuenta examinar en un determinado medio de cultivo las características de la colonia tales como: color, textura, topografía de la superficie y bordes de la colonia. Se ha referido que estos caracteres pueden variar de acuerdo a la fuente de carbono.^{4, 6, 10}

Por lo general las colonias de levaduras no desarrollan micelio aéreo, aunque en ocasiones pueden aparecer prolongaciones aracneiformes en la periferia de las colonias. Si se observa un micelio aéreo definido, debe considerarse la posibilidad de que se trate de un hongo dimórfico o de ciertas especies de levaduras que pueden formar micelio verdadero como *Geotrichum*, *Trichosporon*.^{4, 6}

Pero no todas las colonias blancas y cremosas son levaduras; las especies de algas aclorofílicas del género *Prototheca*, tras incubación a 28 °C durante 3-4 días, desarrollan unas colonias blancas cremosas muy parecidas a las producidas por el género *Candida*.^{4, 6}

Evaluación microscópica: Se observan células redondas u ovaladas de tres a siete micras de diámetro. Ciertas características microscópicas son muy útiles para la identificación presuntiva de algunas especies de levaduras como el caso de *Malassezia sp.* y *Paracoccidioides sp.* levaduras multigemantes.^{4, 6, 21, 62}

Tinciones: El estudio microscópico de los organismos levaduriformes o microorganismos del género *Prototheca* spp se puede llevar a cabo mediante tinciones, ya sea tinción simple o tinción de Gram; con esta tinción, las levaduras suelen comportarse como Gram positivas. Mediante estas tinciones también se puede observar la formación de blastoconidias, artrosporas, hifas, pseudofilamento o endosporas (autoesporas esféricas de 4-11 µm de diámetro incluidas en una teca, que puede visualizarse también vacía); estas últimas son típicas de las especies del género *Prototheca* (Figura 1 a).^{4, 6, 21, 62}

Tinta china Es un método de contraste. Permite visualizar la cápsula de polisacárido de *Cryptococcus neoformans*, mediante la presencia de un halo claro y nítido alrededor de la levadura. Existen artefactos (hematíes, burbujas de aire, leucocitos, gotas de grasa y partículas de talco) que pueden interferir y confundir al analista. La sensibilidad de la técnica es de 50% en pacientes sin VIH y se puede incrementar hasta 88% en pacientes VIH con meningitis criptocócica (Figura 1 d).^{4, 6, 21}

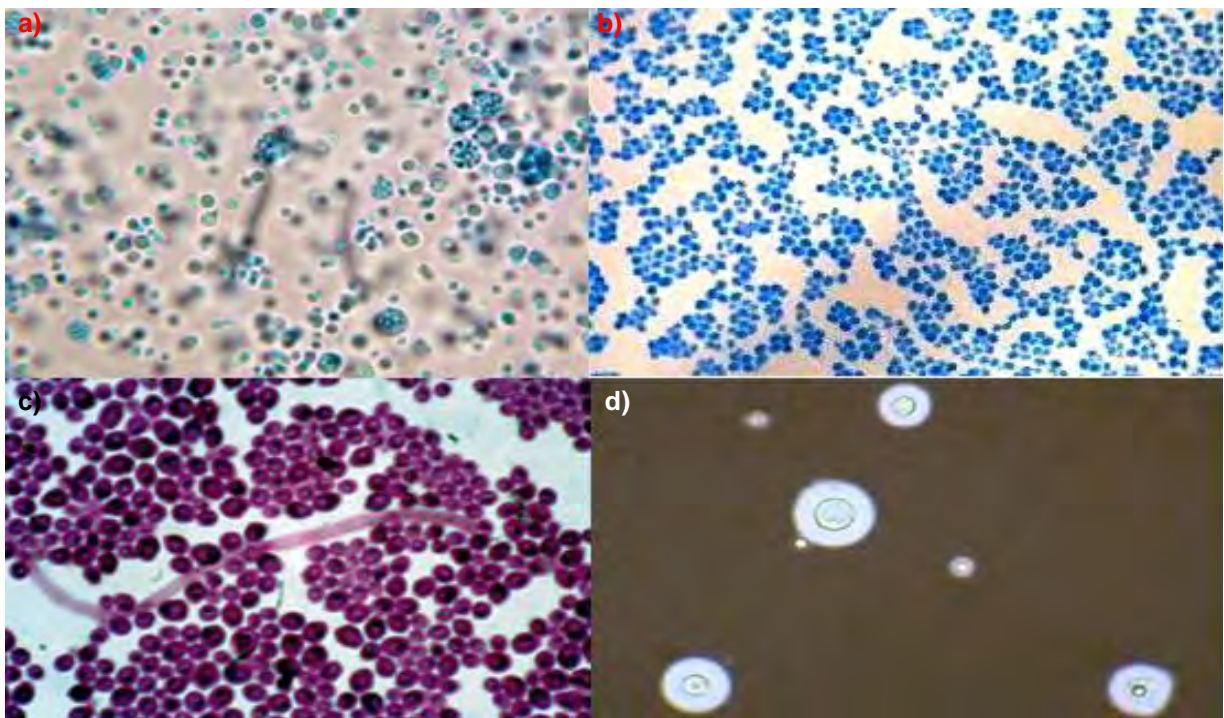


Figura 1 tinciones: a) examen directo con azul de algodón de *Prototheca* sp b) examen directo con azul de lactofenol de un cultivo de levaduras c) tinción de Gram de un cultivo de levaduras y d) examen directo con tinta china de un LCR.

Tipificación

La mayor parte de las pruebas empleadas para evaluar la actividad bioquímica o metabólica de levaduras (por la cual puede hacerse una identificación de la especie), se lleva a cabo mediante el sub-cultivo del aislamiento primario en un medio diferencial, cuyo resultado puede ser interpretado dos días después de incubación. En el laboratorio se cuenta con numerosas técnicas para la caracterización bioquímica de una especie. Estas pruebas se fundamentan en demostrar si el microorganismo es capaz de fermentar azúcares, la presencia de enzimas, la degradación de compuestos, la producción de compuestos coloreados, etc.^{4, 6, 10}

Los paneles para identificación rápida se utilizan para la tipificación de organismos afines (*Prototheca*) y levaduras presentando ciertas limitaciones debido a un determinado número de biotipo le pueden corresponder varios organismos siendo necesario de pruebas suplementarias, dado a que no pueden diferenciar géneros diferentes a su base de datos.^{4, 6, 10}

Un gran número de ensayos han sido desarrollados para identificar rápidamente al patógeno, para que posteriormente el médico, con base al resultado, indique el tratamiento adecuado, o para que los epidemiólogos puedan localizar la fuente de la infección.^{4, 6, 10}

Agar Harina de maíz más Tween 80

La formación de hifas, blastoconidias, clamidosporas o artrosporas por parte de las levaduras constituye una característica morfológica de gran importancia para la identificación de algunas especies de levaduras. Frente la presencia de estructuras con aspecto de hifas, lo primero que hay que determinar es si se trata de pseudofilamento (resultantes del proceso de formación de blastoconidias o, por el contrario, son verdaderas hifas que se fragmentan en artroconidias. Si el desarrollo

en medios especiales revela la presencia de pseudofilamento y blastoconidias la levadura a identificar pertenece al género *Candida* (Figura 2 b).^{3, 4, 18, 38}

En el medio agar harina de maíz más tween 80 (reduce la tensión superficial y favorece la formación de clamidoconidias), se inocula por estría y se incuba a 28 °C durante 48 a 72 horas, para un mejor resultado se coloca un cubre objetos que favoreciera el desarrollo característico de algunas levaduras, para posteriormente revisar al microscopio. Todas las especies oportunistas del género *Candida* presentan pseudofilamento largos, ramificados, con cúmulos de blastoconidios; con excepción de *C. glabrata* que no forma clamidoconidias ni pseudofilamento (Figura 2 a), es muy confiable para la identificación *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*.^{3, 4, 18}

Los aislamientos que no forman pseudofilamento en el agar harina de maíz incluyen especies de *Cryptococcus sp*, *C. glabrata* y especies de *Rhodotorula* y de *Saccharomyces*. El género *Cryptococcus sp* presenta levaduras esféricas, con un tamaño variable y considerablemente separadas por su material capsular. Mientras que *C. glabrata* presenta de una forma más pequeña en racimos compactos. Los géneros de *Geotrichum* y *Trichosporon* producen hifas verdaderas que se fraccionan formando artroconidias (Figura 2 d). *Geotrichum* puede diferenciarse debido a su estructura conformacional produce un solo tubo germinal en un ángulo que semeja un palo de jockey. Mientras *Trichosporon*, típicamente los blastoconidias se forman de ambos ángulos del artroconidias semejando unas orejas de conejo.^{3, 4, 18}

Las **clamidoconidias** son formas de resistencia, redondas u ovales, de 6-12 µm de diámetro y pared gruesa (Figura 2 c), con aspecto de esporas laterales o terminales. Su producción es principalmente característica de *C. albicans*.^{3, 4, 18}

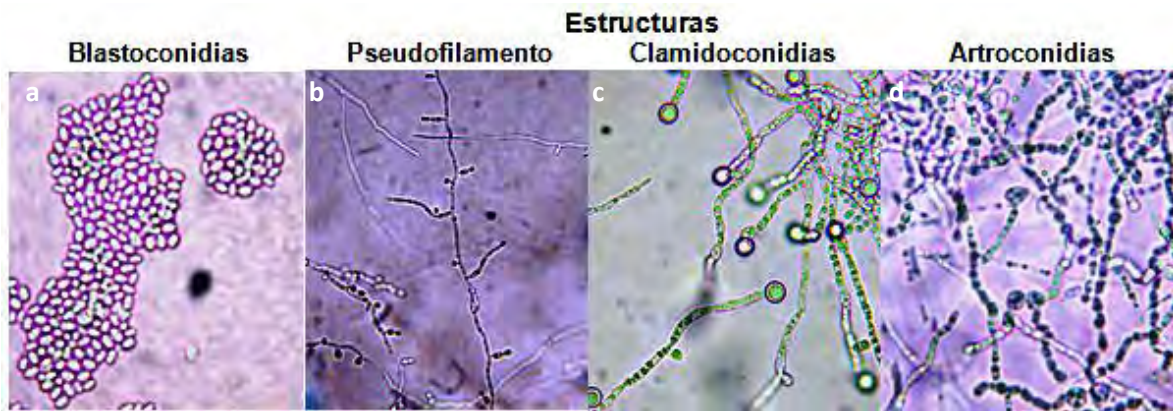


Figura 2 Micromorfología en agar harina de maíz + tween 80: a) blastoconidias, b) pseudofilamento, c) clamidoconidias y d) artroconidias.

Medios de cultivo diferenciales

El fundamento de los mismos se basa en la detección de determinadas actividades enzimáticas por parte de las levaduras mediante la hidrólisis específica de un sustrato cromogénico en presencia de un indicador de la enzima. Una de las principales ventajas de estos medios es permitir diferenciar fácilmente los cultivos mixtos. Estos medios pueden ser utilizados como medios de aislamientos primarios o con fines de identificación, después del aislamiento de los organismos levaduriformes en los medios convencionales. Aunque, podría utilizarse como medio de aislamiento primario en aquellas muestras con alta sospecha de micosis por levaduras.^{4, 10}

Otro método basado en la detección de actividad enzimática. Comprende una serie de medios de cultivo a los cuales se les ha adicionado sustratos cromogénicos o fluorogénicos, que ponen de manifiesto la presencia o no de un grupo de enzimas: L-prolinaaminopeptidasa, N-acetil- β -D-galactosaminidasa, β -Dglucosidasa, pirofosfodiesterasa y fosfatasa ácida. En presencia de sustratos fluorogénicos, la reacción enzimática da lugar a compuestos fluorescentes, que pueden ser leídos con luz UV, mientras que un sustrato cromogénico da lugar a una colonia pigmentada. Por ejemplo, *C. albicans* es L-prolina y β -galactosaminidasa positiva, mientras que en *C.*

tropicalis la segunda enzima es negativa, lo cual hace que en presencia de la mezcla cromogénica, *C. albicans*, desarrolle una colonia color verde y *C. tropicalis* azul.^{4, 10, 18, 19, 22}

Estos medios de cultivo diferenciales, a pesar de arrojar una identificación presuntiva, tienen la gran ventaja de no requerir mucha experiencia técnica, son rápidos y específicos, permiten identificar el agente a partir del cultivo primario y discriminan entre mezclas de levaduras de una misma muestra, sin embargo, sólo pueden identificar unas pocas especies.^{4, 6, 10}

Los medios cromogénicos deben cumplir dos importantes requisitos como son facilitar la diferenciación de especies obtenidos a partir de mezclas de cultivo y permitir la directa y rápida identificación de levaduras, especialmente aquellas resistentes a agentes antifúngicos.^{4, 6, 10, 18}

La buena calidad de los medios es indispensable para conseguir el aislamiento y la identificación Micológica; cuando se utilicen medios comerciales es necesario tener en cuenta la garantía que aporta el proveedor y la calidad de la distribución.^{4, 10, 21, 62}

Cuando se prepara un medio deshidratado deben seguirse rigurosamente las instrucciones del fabricante, evitando errores en la forma de disolverlo o suspenderlo, en la temperatura y/o duración de la esterilización. La esterilización en autoclave es más eficaz si se utilizan frascos de volúmenes inferiores a 500 mL. También hay que tener presente que algunos antibióticos deben añadirse al medio una vez esterilizado y a la temperatura adecuada, para no ser desactivados por las altas temperaturas de la esterilización.^{4, 10, 62}

En la actualidad existen en el mercado una gran variedad de medios diferenciales que pueden diferir en cuanto a su sensibilidad, especificidad y costo, entre estos

tenemos: *Albicans* ID, Chromalbicans Agar (Biolife, Italia), *Candida* ID (BioMerieux, Francia), Fluoroplate *Candida* (Merck, Alemania).^{4, 10, 19, 23}

CHROMagar *Candida*®

El medio CHROMagar *Candida* (Biomedics) descrito por Odds y Barnaerts en 1994, es selectivo y diferencial que permite la identificación presuntiva de levaduras, la siembra se realiza según las técnicas tradicionales y las placas se incuban a 30-37 °C durante 48 h para que las levaduras desarrollen completamente el color, ha mostrado un 100% de sensibilidad y especificidad en la identificación de *C. albicans* y *C. tropicalis*; también ha sido referido la identificación de *C. glabrata* y *C. krusei*, además de la diferenciación de poblaciones por la morfología, el contraste de los colores de las colonias por la reacción de enzimas específicas de distintas especies con un sustrato cromogénico. Facilita el reconocimiento de mezclas de cultivo de levaduras (Figura 3).^{4, 10, 18, 19, 22}

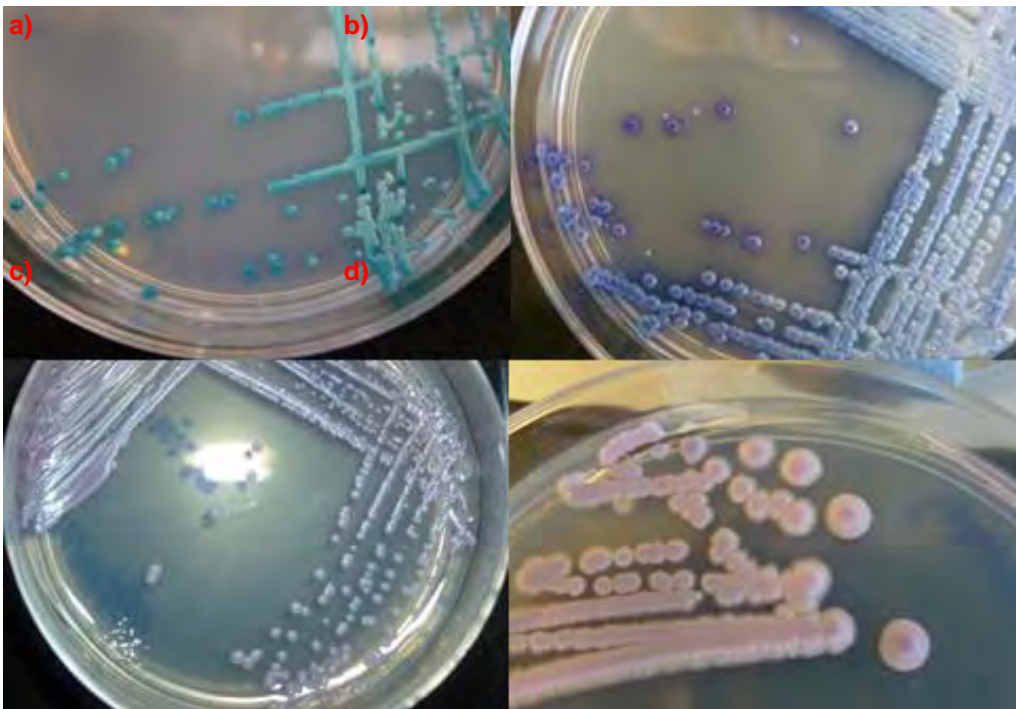


Figura 3: morfología colonial en CHROMagar *Candida*; a) *C. albicans*, b) *C. tropicalis*, c) *C. parapsilosis* y d) *C. krusei*.

Candida ID®

El medio Candida ID (bioMérieux) es un medio cromogénico que permite el aislamiento de organismos levaduriformes, la identificación presuntiva de *C. albicans* y cierta orientación para la identificación de otras especies no *albicans*.^{4, 10}

La inoculación e incubación son similares a las descritas para otros medios cromogénicos. En Candida ID, las colonias de *C. albicans* son redondeadas, ligeramente convexas, lisas, de bordes netos y de color azul (cuya intensidad varía en función del tiempo de incubación). Las colonias de *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii* y *C. kefyr* desarrollan un color rosa a las 48 h de incubación. Otras especies, como *C. famata*, *C. humicola*, y *Cryptococcus neoformans*, pueden originar colonias rosas más o menos intensas. El resto de las especies desarrolla un color blanco-crema, requiriendo una identificación bioquímica posterior.^{4, 10, 25}

Candida ID2® (CAN2)

El medio Candida ID 2 (bioMérieux) es un medio cromogénico destinado al aislamiento selectivo de levaduras, soporta el crecimiento de una de varios generos incluidos *Cryptococcus sp* y *Sacharomyces sp* identificación de la especie *C. albicans* y diferenciación presuntiva de un conjunto de especies como *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* y *C. kefyr*. La inoculación e incubación se llevará a cabo igual que en los casos anteriores, tras 24-48 h. a 30-37°C, se observará el color de las colonias. Azul pálido a azul oscuro es propio de *C. albicans*; rosa es característico de *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* y *C. kefyr*, la identificación de estas especies debe continuarse por pruebas bioquímica y/o inmunológicas. Las colonias de color blanco crema no pueden identificarse de forma presuntiva por lo que deben utilizarse técnicas bioquímicas y/o inmunológicas. La apariencia característica de las colonias, permite la orientación hacia hongos filamentosos y *C. krusei*.^{4, 10}

Pruebas fisiológicas y bioquímicas

Los hongos son organismos quimiotrofos, que degradan los nutrientes del medio exterior, como los complejos de hidrato de carbono a través de enzimas exocelulares (permeasas) en monosacáridos más simples para su absorción. Los estudios de evaluación nutricional sobre sustratos específicos han permitido definir el patrón catabólico que puede presentar un determinado género o especie.^{3, 17}

De este tipo de estudio se han derivado los ensayos de asimilación (auxonograma-degradación aeróbica) y fermentación (zimograma-degradación anaeróbica) de carbohidratos para la identificación de levaduras.^{2, 4, 6, 10}

Nutrición: las levaduras para su crecimiento necesitan fuentes de carbono orgánico y nitrógeno mineral u orgánico. Algunas además necesitan de varias vitaminas (tiamina, biotina, inositol, ácido pentoténico, etc.) entre otros factores de crecimiento. El carbono es el principal compuesto celular de las levaduras; alrededor del 50% del peso, por lo que son metabolizados por las levaduras como fuente de energía.^{2, 4, 10, 17}

Todas las levaduras utilizan la D-glucosa. Aunque el carbono se puede suministrar en forma de azúcares, aldehídos, sales de algunos ácidos orgánicos, glicerina o etanol, o en otro tipo dependiendo el género de levadura. La capacidad de utilizar ciertos compuestos carbonados varía; muchas pueden emplear una amplia gama de compuestos, mientras que otras solamente asimilan un pequeño grupo como pueden ser; hexosas (glucosa), disacáridos y trisacáridos.^{1, 2, 4, 17}

Detección de enzimas

Prueba de ureasa: mide la capacidad de las levaduras para hidrolizar la molécula de urea en dos moléculas de amonio por la acción de la enzima ureasa; esto genera un

incremento del pH del medio y en consecuencia el cambio de color. Esta enzima por lo general está ausente en el grupo de los Ascomycetes, pero está siempre presente en los Basidiomycetes. Es así como permite diferenciar los géneros *Cryptococcus*, *Trichosporon* y *Rhodotorula*, los cuales son ureasa positivos, de *Candida* y *Geotrichum* que son negativos a este ensayo, salvo algunas excepciones, como *C. krusei*, la cual puede o no presentarla.^{4, 6, 11, 21}

Actividad de fenol-oxidasa: se produce en presencia de sustratos orto-fenólicos como ácido caféico o bilis esculina, los cuales son hidrolizados; los productos reaccionan con las sales de hierro (Fe^{+3}) dando como resultado un pigmento oscuro o negro, indicativo de la positividad de la prueba. *C. neoformans*, la especie más patógena de este género, tiene la capacidad de producir esta enzima, sin embargo, esta puede ser variable en las otras especies del género. La asimilación del carbohidrato inositol es común a todas.^{4, 6, 11, 21}

Otras pruebas enzimáticas como la detección de β -galactosidasa y β -glucosidasa, son de gran utilidad en la identificación de levaduras. Por ejemplo, el ensayo de β -glucosidasa: positiva para *C. albicans* y negativa para *C. dubliniensis*. Sin embargo, reportes más recientes han demostrado la ausencia de esta enzima en algunos aislados de *C. albicans*.^{4, 6, 7, 26}

Métodos Automatizados

Son métodos de identificación rápida basados en ensayos de asimilación de carbohidratos y otras pruebas bioquímicas, los cuales se encuentran estandarizados y simplificados en forma de sustratos liofilizados. A diferencia de las pruebas convencionales, que pueden tomar entre 2-20 días, el sistema automatizado permite la identificación de la levadura en un lapso de 24-48 horas y los resultados pueden ser leídos en forma manual o automática a través de un Software. Entre estos sistemas podemos mencionar el API *Candida*, API-ATB, ID 32C, API 20C, Vitek

Systems, Baxter MicroScan System y otros. El Sistema Sensident (Merck) probado en nuestro medio, reportó 75% de levaduras correctamente identificadas. Otro estudio comparativo entre el método convencional y el Sistema ID32C (BioMerieux) mostró 60% de concordancia, la cual se incrementó a 80% cuando se combinó con el estudio morfológico y las pruebas sugeridas por el sistema. También hay sistemas de identificación rápida de levaduras mediante pruebas bioquímicas y enzimáticas, como: *Rapid Yeast Plus System*, *Fungiscreen 4H*.^{4, 6, 10}

Los principales requisitos que deben cumplir los métodos rápidos y automatizados de análisis microbiológico, pueden resumirse en los siguientes puntos: exactitud en la obtención de resultados de acuerdo a los requerimientos establecidos: sensibilidad, límites de detección mínimos, especificidad del sistema, versatilidad, aplicación potencial y comparación con métodos de referencia.^{4, 10}

MicroScan Rapid Yeast Identificacion®

MicroScan® es un sistema enzimático automatizado de identificación de levaduras aisladas en muestras clínicas. Este sistema detecta actividades enzimáticas más que de crecimiento, usando en su mayor parte sustratos cromogénicos e identificando a las levaduras en un promedio de cuatro horas.^{4, 10, 18}

Las pruebas cromogénicas están basadas en la presencia de enzimas preformadas en el organismo desconocido (levadura). De este modo en el medio que ha crecido el organismo influirá en los resultados de la prueba debido a la inducción de diferentes enzimas por diferentes medios.^{4, 10}

RapID Yeast Plus System®

El sistema RapID®, es un micrometodo cualitativo que se basa en reacciones enzimáticas de los sustratos cromogénicos y permite la identificación de levaduras y

organismos relacionados aislados de muestras clínicas después de cuatro horas de incubación previo cultivo de 24 horas.^{4, 10, 25}

Las pruebas usadas en el RapID® están basadas en la degradación microbiana de los sustratos específicos detectados por varios sistemas indicadores. Las reacciones empleadas son una combinación de ensayos tradicionales y pruebas de un solo sustrato cromogénico.^{4, 10, 25}

Sistema VITEK

Es un sistema que utiliza tarjetas con reactivos colorimétricos, las que son inoculadas con la suspensión de un cultivo puro microbiano y el perfil de desarrollo es interpretado de forma automática.^{4, 10}

Las tarjetas reactivas tienen 64 pozos que contienen, cada uno, un sustrato de prueba individual. Con estos sustratos se miden varias actividades metabólicas como acidificación, alcalinización, hidrólisis enzimáticas y desarrollo en presencia de sustancias inhibidoras. Las tarjetas están selladas en ambos lados por una película clara que evita el contacto entre las diferentes mezclas sustrato-microorganismo y a la vez permite la transmisión del nivel de oxígeno apropiada. Cada tarjeta tiene un tubo de transferencia pre-insertado para la inoculación. Estas tarjetas tienen códigos de barras que contienen información sobre el tipo de producto, número de lote, fecha de caducidad y un identificador único que puede ser ligado a la muestra ya sea antes o después de cargar la tarjeta al sistema.^{4, 10}

Métodos Inmunológicos

Las técnicas serológicas siguen siendo una herramienta de gran valor en el diagnóstico de las micosis profundas, para la detección de antígenos o anticuerpos. Estos ensayos, han sido aplicados en el diagnóstico e identificación rápida de

hongos con el uso de anticuerpos monoclonales o monoespecificos por ensayos de Inmunodifusión Doble, inmunofluorescencia, aglutinación, ELISA e inmunoperoxidasa.^{4, 6, 10}

Las metodologías inmunológicas son procedimientos analíticos basados en la visualización objetiva de la interacción entre un antígeno y su correspondiente anticuerpo, y debido a su sensibilidad, especificidad, rapidez y bajo coste, son especialmente útiles en el análisis en el campo del diagnóstico clínico.^{4, 6, 10}

Hoy en día disponemos de pruebas comerciales rápidas y de fácil ejecución como Bicholates Albicans y Krusei color (Francia), consistentes en partículas de latex sensibilizadas con anticuerpos monoclonales que reaccionan en forma específica con antígenos de superficie de la levadura. Otras técnicas también están disponibles en el mercado para diagnóstico e identificación rápida del agente causal.^{4, 10, 21}

Reacciones inmunológicas: puede ayudar al diagnóstico de algunos hongos patógenos, se divide en pruebas de sensibilidad cutánea y reacciones serológicas.¹⁰

Pruebas de sensibilidad cutánea (intradermorreacción): se investiga la inmunidad celular. Se aplica intradérmicamente antígeno obtenido de filtrados de cultivos o extractos de polisacáridos de levaduras o miceliales. Una reacción positiva mide 5 mm diámetro, una induración menor de 5 mm es dudosa y la ausencia es negativa. Estas pruebas son auxiliares en el diagnóstico, el pronóstico o la valoración del estado inmunitario del paciente.¹⁰

Serodiagnóstico pone de manifiesto la presencia de anticuerpos **y detección de antígenos.**¹⁰

Estudios de Biología Molecular

Son herramientas de alto potencial para el diagnóstico como la identificación y clasificación taxonómica de microorganismos. Estos ensayos están basados en el análisis de secuencias de ácido dextrorribonucleico (ADN) genómico, con el uso de secuencias cortas específicas de oligonucleótidos con técnicas de PCR. Hoy en día se han evaluado pruebas de ADN con secuencias especie-específica, derivadas de la región variable de la subunidad mayor 26S ribosomal del DNA para la identificación de las especies de *Candida* por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), así como también secuencias cortas de oligonucleótidos, que identifican y discriminan a través de PCR a *C. albicans* y *C. dubliniensis*.^{6, 10, 21}

Las técnicas de biología molecular tienen la gran ventaja de ser específicas, sensibles y eficientes, permiten diferenciar especies muy relacionadas entre sí desde el punto de vista taxonómico, así como la identificación en un corto período de tiempo, de hongos que desarrollan pocas o ninguna estructura fructífera. Sin embargo, debido a exigencias de costo, infraestructura y experiencia técnica requerida, están en el presente, más disponibles en laboratorios de referencia que de rutina.^{6, 10, 21}

Otras técnicas complementarias

Entre estas tenemos ensayos de termotolerancia a 37, 42 y 45°C, con lo cual se pueden diferenciar las especies termófilas. Se ha descrito que *C. dubliniensis* puede diferenciarse de *C. albicans* por ausencia de crecimiento a 42°C. Sin embargo, hallazgos más recientes demuestran que algunos aislados de *C. dubliniensis* tienen capacidad de crecer a 42 y 45°C. Entre otras técnicas, se contempla la asimilación de nitratos, la cual es básicamente positiva para los generos *Hansenula* y *Rhodotorula*.^{4, 6, 10, 21}

En el ensayo de resistencia a cicloheximida (usando el medio de cultivo Micosel), crecen algunas especies de *Candida*, mientras que *C. neoformans*, *S. cerevisiae*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *G. candidum*, son sensibles. Otras especies de *Candida* y *Rhodotorula* pueden ser variables en su sensibilidad.⁴

Candidiosis

Es una infección primaria o secundaria, causada por levaduras del género *Candida*, con manifestaciones clínicas extremadamente variables de evolución aguda, subaguda, crónica o episódica, en las cuales el hongo puede causar lesiones cutáneas, mucocutáneas, profundas o diseminadas (Tabla 2). El principal agente es *Candida albicans*, pero pueden estar implicadas otras especies como: *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida famata*, *Candida krusei*; *C. lusitaniae*, *Candida dubliniensis*, entre otras.^{1, 2, 3, 10,}

Tabla 2. Clasificación de las candidiasis.^{10, 31, 33, 35}

CANDIDIASIS SUPERFICIALES		CANDIDIASIS PROFUNDAS	
Cutáneas	Intertrigo Foliculitis	Localizadas	Peritonitis Esofagitis Pielitis Endocarditis Síndrome de abuso de drogas Hepatoesplénica Asociada a nutrición parenteral Neonatal
Mucosas	Orofaringeas Vulvovaginal Esofagitis Vegiga urinaria		
Ungeales	Onicomycosis Paraniquia		
Otras	Otitis externas Queratitis		

Las candidiosis superficiales afectan principalmente a la piel y a las mucosas oral y genital. La candidiosis oral se puede presentar en varias formas clínicas, siendo la más común la pseudomembranosa o muguet, que afecta a la mucosa de boca y faringe, y suele producirse en recién nacidos y en ancianos o inmunodeprimidos. La candidiasis genital ocurre principalmente en las mujeres y representa alrededor del 20% de los casos de vaginitis, y si no se trata adecuadamente puede ser recurrente, y ocurre con menos frecuencia en hombres y se denomina balanitis. Las candidiosis

profundas producen lesiones agudas o crónicas que pueden afectar a uno o más órganos, y generalmente terminan en una septicemia, denominándose entonces candidiasis sistémicas o diseminadas. Se observan principalmente en pacientes inmunocomprometidos y suelen ser de pronóstico grave. La mortalidad puede superar el 50%, aunque hay que tener en cuenta que casi siempre aparece como complicación a una enfermedad grave, con lo que el índice de mortalidad aumenta.^{1, 2, 10, 31, 34, 35}

La candidiasis invasiva es, mayormente, una enfermedad de progreso médico, que refleja los enormes adelantos de la tecnología de atención médica ocurridos en las últimas décadas. Los factores de riesgo implicados con más frecuencia incluyen el uso de agentes antibióticos de amplio espectro, el uso de catéteres venosos centrales, la recepción de alimentación parenteral, la recepción de terapia de sustitución renal por parte de pacientes en unidad de cuidados intensivos UCI, neutropenia y la recepción de agentes inmunosupresores (incluidos glucocorticosteroides, agentes quimioterapéuticos e inmunomoduladores). La candidiasis invasiva tiene un impacto relevante sobre los resultados de los pacientes, y se ha calculado que la mortalidad atribuible a la candidiasis invasiva representa un porcentaje tan alto como un 47%, aunque muchas autoridades calculan que la mortalidad atribuible es de 15% a 25% para adultos y de 10% a 15% para recién nacidos y niños.^{1, 2, 10, 31, 36}

A la hora de diagnosticar una candidiasis hay que distinguir entre colonización e infección, ya que muchas especies del género *Candida* suelen estar presentes como comensales, por ello deben evaluarse los datos de laboratorio así como el cuadro clínico. El diagnóstico de las candidiasis superficiales se realiza mediante criterios clínicos, junto con la observación al microscopio de muestras de lesiones o cultivos selectivos. Hay que tener en cuenta que un cultivo positivo demuestra la presencia de *Candida* pero no la infección. En las candidiasis sistémicas resulta más complicado llegar a un diagnóstico seguro. En la actualidad se dispone de una serie

de métodos sensibles y específicos, para el diagnóstico, entre ellos se encuentran: detección de antígenos circulantes, utilización de anticuerpos específicos para la identificación de *Candida spp.* y técnicas de PCR diseñadas especialmente para la detección de especies de *Candida* a partir de aislados clínicos.^{10, 31, 33, 34, 36}

La terapia empírica antifúngica debe ser tomada en cuenta en enfermos críticos con factores de riesgo de candidiasis invasiva y ninguna otra causa conocida de fiebre, y debe basarse en la evaluación clínica de factores de riesgo, marcadores serológicos de candidiasis invasiva y/o datos de cultivos de sitios no estériles.^{31, 32, 36}

Tabla 3. Patrones generales de susceptibilidad de las especies de *Candida*.³²

Especie	Fluconazol	Itraconazol	Voriconazol	Posaconazol	Fluocitosina 5-FC	Anfotericina B	Candinas
<i>Candida albicans</i>	S	S	S	S	S	S	S
<i>Candida tropicalis</i>	S	S	S	S	S	S	S
<i>Candida parapsilosis</i>	S	S	S	S	S	S	S a R ^a
<i>Candida glabrata</i>	S-DD a R	S-DD a R	S-DD a R	S-DD a R	S	S a I	S
<i>Candida krusei</i>	R	S-DD a R	S	S	I a R	S a I	S
<i>Candida lusitanae</i>	S	S	S	S	S	S a R	S

NOTA. I, intermedicamente susceptible; R, resistente; S, susceptible; S-DD: susceptible dependiente de la dosis 5-FC 5 fluorocitosina.

^a La resistencia a las equinocandinas en las cepas aisladas de *C. parapsilosis* es poco frecuente. Guías de tratamiento de la candidiasis • CID 2009:48 (1 March) • T9

Dosificación pediátrica

La farmacocinética de los agentes antifúngicos varía entre pacientes adultos y pediátricos, pero los datos sobre la dosificación de agentes antimicóticos en pacientes pediátricos son limitados. Las propiedades farmacológicas de los agentes en niños y bebés se han revisado detalladamente. La cinética de deoxicolato de anfotericina b AmB-d es similar en recién nacidos y en adultos, hay pocos datos que

describan el uso de formulación de lípidos de anfotericina B (LFAmB) en recién nacidos y en niños.³²

Existen datos anecdóticos que informan sobre el uso exitoso de anfotericina B liposómica (L-AmB) en recién nacidos. La eliminación de fluocitosina es directamente proporcional a la tasa de filtración glomerular, y los neonatos con muy bajo peso al nacer podrían acumular altas concentraciones en plasma debido a una mala función renal a causa de su inmadurez. Por consiguiente, no se fomenta el uso de flucitosina sin un control atento de los niveles del fármaco en suero en este grupo de pacientes.³²

Candida albicans* y *Candida dubliniensis

Fue establecida en 1995 como *C. dubliniensis* por Sullivan y colaboradores, está asociada con casos de candidiasis oral en pacientes infectados con virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Por otro lado, también se ha podido aislar esta nueva especie en pacientes con diabetes mellitus dependientes de insulina. La primera indicación de las diferencias en las colonias de *C. dubliniensis* resultó al hacer la prueba de DNA fingerprinting sonda 27 A. Asimismo pruebas moleculares como el RAPD y la cariotipificación han permitido la detección de esta especie antes desconocida.^{7, 26, 34}

Ambas crecen bien a 37 °C, esta nueva especie crece muy lentamente o no desarrolla a 42 °C y 45 °C. Difieren significativamente en la asimilación de carbohidratos específicos, las colonias de las dos especies son apreciablemente diferenciables al crecer en medios cromogénicos como el CHROMagar *Candida*, mostrando las colonias de *C. dubliniensis* un verde más oscuro que las de *C. albicans*, también pueden ser diferenciadas por la ausencia de colonias fluorescentes en agar de Sabouraud de azul de metilo bajo luz ultravioleta. Otra característica fenotípica específica para *C. dubliniensis* es un resultado negativo en las pruebas

para la actividad β -glucosidasa intracelular. La producción de clamidosporas en *C. dubliniensis* difiere de *C. albicans* en que se aparecen en mayor número y en pares contiguos (racimos), raramente vistas de esta forma en *C. albicans*.^{7, 26}

C. dubliniensis ya se la ha demostrado la capacidad de generar más rápidamente resistencia a la terapia antifúngica (resistencia al fluconazol); principalmente en pacientes con factores predisponentes como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) o VIH positivo, que han recibido múltiples tratamientos contra diversas micosis que se le han establecido, de ahí la importancia del aislamiento e identificación de esta nueva especie.^{7, 26}

Criptococcosis

La criptococcosis (torulosis o blastomycosis europea) es una micosis sistémica causada por una levadura capsulada con amplia distribución mundial denominada *Cryptococcus neoformans*. Sus dos principales especies: *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* (serotipo D) y *Cryptococcus gattii* (serotipo B y C).^{11, 39, 42}

En esta micosis la infección primaria se produce generalmente por la inhalación de esporas de las levaduras desecadas, lo cual hace que el aparato respiratorio sea el órgano de choque inicial de la enfermedad.^{1, 2, 11, 39, 42}

En individuos inmunocompetentes esta infección es autolimitada y poco sintomática. La enfermedad diseminada ocurre en huéspedes con alteraciones inmunológicas o enfermedades debilitantes de base como linfomas, leucemias, lupus eritematoso sistémico, diabetes mellitus descompensada y especialmente con SIDA. La patogenicidad viene determinada por la cápsula que impide la fagocitosis y la actuación del complemento y por la enzima fenil-oxidasa que contribuye al especial neurotropismo del hongo. Cuando llega a los alveolos pulmonares se desencadena

una respuesta de la inmunidad celular y humoral del huésped, que en condiciones normales es suficiente para controlar la infección.^{1, 2, 11, 21}

El microorganismo no es eliminado por los mecanismos de defensa apropiados cuando penetra en las vías respiratorias. Así, progresa hacia el pulmón y se disemina por vía hematogena hasta el sistema nervioso central (SNC), siendo ésta la localización más frecuente, produciendo cuadros de meningitis o meningoencefalitis. Las manifestaciones clínicas variarán en función del tipo de enfermo. La aparición de la enfermedad suele ser aguda en pacientes con sida, en tratamiento con corticoides o que sufren neoplasias hematológicas, mientras que en los restantes suele presentarse de una forma más crónica. La mayoría de los pacientes presenta signos inespecíficos de fiebre, malestar general y cefalea.^{11, 39, 40}

Respecto a la localización pulmonar, en los pacientes no inmunodeprimidos la afectación puede progresar, regresar espontáneamente o permanecer estable durante largos períodos de tiempo, siendo raro que haya síntomas. Suele aparecer sola, aunque puede coexistir con otras manifestaciones extrapulmonares. En los pacientes inmunodeprimidos, la afectación puede ser desde asintomática a grave. Sólo el 5-25% de los enfermos de sida presenta tos y disnea, y en pocas ocasiones existe dolor pleural y alteraciones radiológicas. La mortalidad puede llegar al 42% en este tipo de paciente.^{11, 40, 43}

La afectación cutánea, aparece en el 10% de pacientes con criptococosis diseminada VIH positivo, especialmente en el cuello y la cabeza. Se han descrito casos de endocarditis, endoftalmítis, pielonefritis, artritis, osteomielitis, afectación ganglionar y prostatitis. La próstata puede ser un reservorio de *C. neoformans* y constituir la causa de las recidivas en pacientes aparentemente tratados con éxito con anfotericina B. Menos del 10% de los enfermos con sida presenta fungemias aisladas y, en ocasiones, hay pacientes con todos los cultivos negativos y la detección de antígeno positiva. En raras ocasiones, ciertas lesiones extraneurales pueden estar originadas

por la inoculación directa de esta levadura, incluyendo la linfadenitis esporotricóidea, la queratitis o la peritonitis.^{11, 40, 43}

Diagnóstico por el laboratorio

Examen directo

Se utiliza en la búsqueda de *Cryptococcus sp* en cualquiera de los fluidos corporales, siendo el más frecuente el líquido cefalorraquídeo, también pueden ser utilizados esputo, fluido pleural, biopsia a campo abierto y el lavado broncoalveolar, este último tiene mayor valor predictivo, por el alto porcentaje de aislamientos de *Cryptococcus sp*. En el examen directo, se observa levaduras esféricas unigemantes y a veces con gemaciones múltiples, con inclusiones citoplasmicas y pared gruesa refringente; para la detección de la cápsula es necesario un colorante que no sea tomado por el hongo y permita observarla, tal como la tinta china; la nigrosina, también ha sido utilizada, pero tiene menor sensibilidad.^{4, 6, 11, 21}

Cultivo

Crece en medios simples con o sin antibióticos, siempre y cuando no tengan actividad, sus colonias se observan al cabo de 2 a 10 días, para su reconocimiento no basta la presencia de colonias mucoides, brillantes, de color crema, es necesario hacer pruebas bioquímicas tales como la ureasa, la utilización de carbohidratos, la determinación de la enzima nitrato-reductasa, fenol oxidasa.^{4, 6, 11, 21}

El cultivo de líquido cefalorraquídeo, presenta desarrollo en un 85 a 100% en aquellas personas cuyas manifestaciones clínicas se deben *Cryptococcus*, para favorecer una mejor recuperación de muestras sanguíneas, se debe utilizar el método de lisis-centrifugación, el cual ha presentado más del 70% de sensibilidad en pacientes con SIDA.^{4, 6, 11, 21}

Pruebas inmunológicas

Método utilizado en el pronóstico y seguimiento de los pacientes, es la búsqueda del antígeno, donde se detecta el polisacárido capsular, este es metabolizado lentamente y su título está relacionado con el pronóstico y la respuesta al tratamiento; títulos altos en líquido cefalorraquídeo son de mal pronóstico y títulos en disminución indican buena respuesta al tratamiento y recuperación. El método más utilizado es la aglutinación en látex, aunque también hay métodos inmunoenzimáticos; ambos son altamente sensibles y específicos.¹¹

La detección del antígeno en suero es útil en pacientes con sintomatología meníngea o pulmonar, pero no es útil en pacientes asintomáticos, sobre todo en zonas donde la prevalencia es baja; el valor predictivo positivo de la prueba en suero es del 92%.¹¹

Factores de patogenicidad

Se consideran responsables del poder patogénico de *Cryptococcus* la cápsula, la capacidad de adherencia y las proteínas con actividad enzimática, como las proteinasas, las fosfolipasas, la fenoloxidasa y la ureasa.¹¹

Cápsula: es un polisacárido compuesto de xilosa, manosa y ácido glucorónido, su composición la distingue de otros hongos de interés clínico. Contiene gran variación en la estructura polisacárida, produciendo diferentes reacciones antigénicas.^{2, 6, 11, 21}

Ureasa: es una níquel-metaloenzima, su función es catalizar la hidrólisis de la urea a amoníaco y CO₂. Se ha descrito que puede contribuir al paso de *Cryptococcus* a través de la barrera hematoencefálica, ocurre acompañado del secuestro masivo de levaduras por la vía de los microcapilares.^{2, 6, 11, 21, 67}

Fenoloxidasa: tiene capacidad de producir melanina en presencia de compuestos dihidroxifenólicos o poliaminobencénicos, oxígeno molecular y en condiciones de bajo contenido de glucosa. Se encuentra unida a la pared celular. La melanina resultante de su actividad se le atribuye efectos de protección contra los antioxidantes, da soporte a la integridad de la pared celular, protección frente a temperatura extremas, interferencia con la fagocitosis mediada por anticuerpos y con la respuesta de los linfocitos T, también se le ha considerado una defensa contra diversas proteínas microbicidas, reducción de sensibilidad a algunos antifúngicos como anfotericina B y casofunginas.^{2, 6, 11, 21}

Trichosporonosis

Trichosporon es una levadura presente en el suelo, el agua, vegetales, mamíferos y aves. Así como se presenta como parte de la microbiota de la mucosa bucal, la piel y las uñas, el género *Trichosporon* provoca infecciones localizadas o sistémicas en pacientes inmunodeficientes.^{45, 46, 47, 48, 49, 51}

Las enfermedades producidas en seres humanos habían sido atribuidas a *Trichosporon beigelii* durante mucho tiempo, hasta que en 1992 fue revisada su taxonomía y dividida en seis especies *T. asahii*, *T. mucoides*, *T. asteroides*, *T. ovoides*, *T. cutaneum* y *T. ashii*.^{45, 46, 47, 48, 49, 51}

En general, estas especies se asocian a infecciones benignas superficiales, particularmente a la piedra blanca, la cual, es producida por *T. inkin* (vello púbico) y *T. ovoides* (cabello). Pueden producir onicomycosis (*T. cutaneum*), recuperarse de tinea pedis y de lesiones anales en pacientes con infección por VIH y piedra genitourinaria. Se han descrito cuadros de neumonía alérgica (*T. asahii*) y neumonitis alérgica del verano por inhalación de los artroconidios asociados al calor y la humedad en Japón. Las infecciones invasoras por *Trichosporon* son precedidas,

comúnmente, por una colonización respiratoria o gastrointestinal y con frecuencia se asocian al uso de catéter venoso central.^{45, 46, 47, 48, 49, 51}

Representan la segunda causa de infección fúngica invasora por levaduras en hospederos inmunosuprimidos. Producen fungemia en pacientes con neutropenia y cáncer, en forma similar a la candidiasis. Se ha aislado desde abscesos (cerebral, hepático), endocarditis, peritonitis y asociado a fracaso terapéutico por resistencia de algunas especies a anfotericina B. También se han descrito casos de infecciones oftalmológicas post cirugía, infecciones de prótesis, de peritoneo-diálisis, meningoencefalitis y neumonía en inmunocompetentes, quedando en evidencia un rol patogénico de esta especie.^{45, 46, 47, 48, 49, 51}

Infecciones superficiales y cutáneas	{	<i>Trichosporon cutaneum</i>	45, 46, 47, 48, 49, 51
		<i>Trichosporon asteroides</i>	
Piedra blanca	{	<i>Trichosporon ovoides</i> (cuero cabelludo)	
		<i>Trichosporon inkin</i> (pubis)	
Trichosporonosis diseminada	{	<i>Trichosporon asahii</i>	
		<i>Trichosporon mucoides</i>	

La piedra blanca es una afección poco común, se presenta mayormente en adultos jóvenes; aunque se considera una enfermedad cosmopolita, se observa principalmente en climas tropicales, templados. El modo de infección es desconocido, los principales factores predisponentes son la falta de higiene, la sudoración excesiva, la humedad y el uso de prendas contaminadas, como cepillos y peines. Clínicamente la enfermedad se manifiesta como nódulos pequeños de aproximadamente 1mm de diámetro, de color blanquecino cremoso que se localizan sobre el tallo del pelo, de consistencia blanda, bien delimitados. La infección es asintomática y se presenta en pelos de axilas, pubis, barba y cabeza. Por lo general es una infección asintomática, pero puede ocasionar prurito cuando se localiza en el escroto, suele también estar limitada al pelo aunque en raras ocasiones puede ser diseminada.^{47, 48, 49}

La tricosporosis es una micosis oportunista causada por las diversas especies del género *Trichosporon*. Sus manifestaciones clínicas varían desde las onicomycosis (relacionadas frecuentemente a *T. cutaneum*), otomicosis, queratitis micóticas, coriorretinitis e intertrigos en diabéticos, hasta fungemias caracterizadas por fiebre, lesiones maculopapulares, infiltrados pulmonares, endocarditis, encefalitis, absceso cerebral, hepatitis y daño renal, pudiendo ocasionar la muerte, especialmente en pacientes inmunodeprimidos. Algunos autores consideran al *Trichosporon asahii* como el responsable de los casos diseminados que evolucionan fatalmente en situación de neutropenia y ausencia de fagocitosis.^{46, 47, 48, 49}

Características

Para poder establecer correctamente el diagnóstico es necesario recurrir al examen directo, cultivo y estudio de biología molecular (PCR). En el examen con KOH al 10%, se observa artrosporas y blastospora, en el cultivo en SDA desarrollan rápidamente (cuatro a seis días) a 28 o 37 °C en un inicio se pueden observar colonias cremosas y conforme va envejeciendo el cultivo toma un aspecto seco. *Trichosporon*, al igual que *Geotrichum*, son capaces de formar artroconidios. Una característica que diferencia a ambas especies es la capacidad de hidrolizar la urea; *Trichosporon* la hidroliza. Aunque ambas especies son similares fenotípicamente, difieren mucho genotípicamente. *Trichosporon* es de crecimiento rápido en cultivo y las colonias se presentan con un aspecto seco y blanquecino. La identificación bioquímica de especie es usualmente difícil, con problemas de reproducibilidad y precisión. Algunas pruebas incluyen asimilación de L-arabinosa, sorbitol, melibiosa y mio-inositol, crecimiento a 37°C y en presencia de cicloheximida al 0,1%.^{45, 46, 47, 48, 49}

Factores de virulencia de *Trichosporon spp*

Las levaduras que son patógenas oportunistas conservan diversos factores que permiten su crecimiento y su difusión dentro del huésped para el establecimiento de

la enfermedad. Tales factores suelen estar relacionados con la conmutación morfológica, la capacidad de adherirse a las superficies abióticas, termotolerancia, la expresión de los componentes de la pared celular, y la producción y la secreción de enzima como ureasa protasa. A pesar de que *Trichosporon spp.* representa la segunda o tercera causa por levaduras no *Candida* más habituales causantes de enfermedad invasiva en pacientes con cáncer hematológico y en general en pacientes inmunosuprimidos.⁵¹

Biofilms: Las infecciones invasivas causadas por *Trichosporon spp.* por lo general están asociadas con catéteres venosos, catéteres vesicales, y con catéter peritoneal. La capacidad de adherirse y formar biopelículas en dispositivos implantados puede favorecer la progresión de la tricosporonosis invasiva, ya que puede promover la resistencia a los antimicóticos y desfavorecer las respuestas inmunes del huésped. Di Bonaventura et al. probaron 4 cepas de *T. asahii*, mostrando que de manera similar a las biopelículas de *Candida spp.*, son capaces de adherirse rápidamente a poliestireno. Pueden presentarse en sus dos variedades ya sea como levaduras o formas filamentosas, integradas dentro de un polisacárido extracelular (EPS), matriz que permite conservar la estructura de la biopelícula. Evaluaron perfiles de sensibilidad de las biopelículas de *T. asahii* a diversos tratamientos: anfotericina B, caspofungina, fluconazol y voriconazol presentando resistentes a todos los antifúngicos.⁵¹

Enzimas: Otro importante factor de virulencia es la capacidad de producir y secretar enzimas para la asimilación de nutrientes desde el medio ambiente. Las proteasas y fosfolipasas son enzimas entre las que pueden aumentar la patogenicidad fúngica mediante la ruptura de las proteínas y alterando las membranas celulares, en función de sus niveles de expresión y la respuesta inmune del huésped.⁵¹

Con respecto a *Trichosporon spp.*, son esterasa positiva. Una lipasa alcalina se aisló a partir de *T. asahii* MSR 54 la enzima era activa a temperatura ambiente, pero

presenta actividad máxima a 40° C y en un intervalo de pH de 8,0 a 10,0. Un análisis de la producción de enzimas de *T. asahii* reveló que estas cepas no fueron capaces de producir aspártico proteinasas o fosfolipasas, mientras que fueron capaces de secretar beta-N-acetilhexosaminidasa. Presenta 4 tipos morfológicos diferentes de colonias cultivadas SDA: pulverulento blanco, pustulosa blanco, de color blanco amarillento, y cerebriforme blanco. Además tienen la capacidad de producir ureasa.⁵¹

Componentes de la pared celular: Los miembros de *Trichosporon spp.* expresan ácido glucoronico-xilosa-manosa (GXM) en sus paredes celulares, al igual que *C. neoformans*. GXM es una cadena principal de manosa 1,3-ligado unido a cadenas laterales cortas de manosa 1,4-ligado y 1,2-enlazados restos de xilosa mediante la sustitución de la porción de los residuos de manosa 1,3-vinculados del grupo principal 2 o 4. Este polisacárido puede atenuar la capacidad fagocítica de los neutrófilos y monocitos.⁵¹

Tratamiento

Numerosos estudios de susceptibilidad *in vitro* a los antifúngicos han demostrado que *Trichosporon* es resistente a la anfotericina B. Entre los azoles, el voriconazol es el antifúngico que da concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) más bajas, seguido por el posaconazol e itraconazol. El fluconazol puede arrojar MICs relativamente elevadas para algunas especies de *Trichosporon*. Las equinocandinas (casposfungina, anidulafungina) prácticamente no presentan actividad contra los aislados de *Trichosporon*. El número de antifúngicos disponibles para el tratamiento de las infecciones diseminadas por *Trichosporon* es limitado, por lo que el pronóstico de esta infección es normalmente pobre, con un porcentaje de mortalidad tan alto como 75%.^{48, 51}

Rhodotorula sp

Las infecciones fúngicas invasoras constituyen un problema clínico relevante debido a las dificultades diagnósticas que plantean y a su elevada mortalidad. Aunque la mayoría están causadas por *Candida* y *Aspergillus*, un porcentaje creciente están producidas por hongos menos comunes como son las especies de *Rhodotorula*. Este grupo de hongos, incluido en la familia *Cryptococcaceae*, se encuentra ampliamente distribuido en el medio ambiente (aire, agua, suelo, plantas) y forma parte de la flora cutánea, genital y ocular de las personas sanas. Las especies del género *Rhodotorula* son levaduras pigmentadas de color rojo anaranjado debido a la presencia de pigmentos carotenoides. Son bastantes semejantes a *Cryptococcus* sp., ambos producen ureasa y no fermentan los carbohidratos. Crecen bien en agar sangre, agar chocolate y agar Sabouraud-cloranfenicol, pero su crecimiento es más lento apreciándose colonias aisladas con una ligera pigmentación anaranjada a las 48 horas de incubación. *Rhodotorula mucilaginosa* (también conocida como *R. rubra*) es la especie más frecuentemente identificada en infecciones en humanos seguida por *R. glutinis* y *R. minuta*.^{52, 53. 54}

En 1960 Louria y colaboradores reportaron un caso de fungemia causada por *Rhodotorula* en un paciente con endocarditis bacteriana subaguda. Durante la necropsia se encontraron lesiones causadas por *Rhodotorula* sobre la válvula aórtica, confirmadas posteriormente por el desarrollo en el cultivo.^{52, 53. 54}

Entre las levaduras con capacidad de producir lipasas se resaltan *Candida*, *Rhodotorula* y *Hansenula*. Por otro lado, las levaduras pertenecientes a la especie *Rhodotorula mucilaginosa* demostraron la capacidad de degradar grasas en efluentes de restaurantes y en efluentes de biodiesel.^{52, 53. 54}

Factores de riesgo

En la gran mayoría de las revisiones el único factor de riesgo identificado fue el uso de catéteres venosos centrales por largos períodos de tiempo. Kiehn y colaboradores niegan la importancia de la duración del período de hospitalización, enfermedades de base, edad y sexo como factores predisponentes para el desarrollo de fungemia por *Rhodotorula*. Es un hongo oportunista capaz de producir infecciones localizadas como endoftalmitis y peritonitis en pacientes en diálisis peritoneal, y generalizadas del tipo fungemia, endocarditis y meningitis. Una elevada proporción de infecciones invasoras ha sido descrita en pacientes inmunodeprimidos (oncológicos, trasplantados o VIH). Otros factores de riesgo identificados son los dispositivos percutáneos, la cirugía abdominal, las quemaduras extensas, la cirrosis y las enfermedades autoinmunes.^{52, 53}

La función más importante de los carotenoides, en las levaduras es la protección contra la combinación dañina del oxígeno singulete y la luz visible o UV. Su acción consiste en desactivar los radicales libres que se producen durante el metabolismo normal de las células, tales como el oxígeno singlete (1O_2), hidroxilo (OH-), peróxidos y otros oxidantes mediante un proceso en el que se transfiere energía de altos niveles de excitación a un triplete de la molécula de carotenoide, el cual puede regresar a su estado basal liberando calor.^{52, 53}

Síntomas y mortalidad

Los pacientes suelen ser asintomáticos, siendo el hallazgo de *Rhodotorula* incidental. En algunas ocasiones la presentación fue sintomática, teniendo como signos más frecuentes fiebre, escalofríos, taquicardia y alteraciones en la esfera mental. En un 40% de los casos hubo hipotensión asociada, y en un número similar se consideró la sepsis por Gram negativos como factor acompañante. La mortalidad fue del 50% en los casos más severos. De manera llamativa, sólo en pocas de las autopsias

realizadas se pudo aislar el patógeno descrito. En estos casos el hallazgo se hizo en válvulas cardíacas de pacientes con endocarditis concomitante.^{52, 53}

Diagnostico e identificación microbiológica

El diagnóstico se realiza por aislamiento de la levadura en hemocultivos o en biopsias de tejidos afectados. La identificación es relativamente sencilla, ya que son levaduras pigmentadas, de color rojo-anaranjado, con un perfil bioquímico y una morfología microscópica característica.^{52, 53}

Tratamiento

El control de los factores desencadenantes es vital para la remisión de la enfermedad, y la retirada de catéter infectado puede ser curativa, ya que son especies poco virulentas. El tratamiento de elección es la anfotericina B, pues esta levadura muestra un alto grado de resistencia in vitro a todos los azoles.^{52, 53}

Prototecosis

Es una rara enfermedad con manifestaciones sistémicas o cutáneas. Las infecciones por *Prototheca spp* se han descrito alrededor de todo el mundo y en pacientes de todas las edades. Es un alga de género aclorofílico (no realiza fotosíntesis), ubicada en la naturaleza, se identificó por primera vez en 1894, pero el primer caso de infección humana no se describió hasta 1964. Desde entonces se han comunicado aproximadamente 100 casos de prototecosis humana debido a *Prototheca wickerhamii*. Debido al número limitado de casos, se sabe poco sobre la patogenia de esta infección.^{1, 50}

Si bien se han descrito numerosas especies, sólo tres son miembros reconocidos del género: *Prototheca wickerhamii*, *Prototheca zopfii* y *Prototheca stagnora*. La primera es causante de la mayoría de las infecciones humanas. El primer caso reportado fue en un agricultor de arroz procedente de Sierra Leona, que presentó una úlcera en uno de sus pies. El organismo causal en este caso fue *P. zopfii*. Sin embargo, se han comunicado aproximadamente 100 casos de infección humana con *P. wickerhamii*. Los pacientes inmunocompetentes e inmunodeprimidos pueden verse afectados.^{1, 50}

Los organismos del género *Prototheca* son aeróbicos, aclóricos (carece de pigmentos fotosintéticos, no presentan un color verde), unicelulares y se cree que están relacionados con las algas verdes *Chlorella*. Carecen de cloroplastos, por lo que no son capaces de producir energía mediante la fotosíntesis y deben vivir como saprófitos. Desde que Chodat los clasificó como algas en 1913, varios investigadores han argumentado que el género *Prototheca* debería mejor considerarse como fúngico; sin embargo, la falta de glucosamina y ácido murámico en las paredes celulares así como los estudios filogenéticos han confirmado que están relacionados estrechamente con las algas.^{1, 50}

Clínicamente, la infección puede manifestarse en tres formas: lesiones cutáneas, bursitis del olecranon (parte superior que sobresale del cubito en forma de prisma), que ocurre en el 25% de los casos, y prototecosis sistémica. Las lesiones cutáneas por *P. wickerhamii* pueden presentarse de manera muy variada. Tienden a ser asintomáticas y a menudo están presentes durante meses o años con una lenta progresión. Se han descrito pápulas, nódulos, placas eccematosas, vesículas, úlceras, celulitis, heridas infectadas, tenosinovitis, linfadenitis y lesiones herpetiformes. En pacientes inmunocompetentes, las manifestaciones cutáneas más frecuentes consisten en pápulas y pústulas sobre placas eccematosas ocasionales localizadas en las extremidades y en la cara.^{1, 50}

La susceptibilidad a adquirir la infección está vinculada a menudo con alguna forma de inmunosupresión. Los factores de riesgo incluyen cirugía, diabetes mellitus, tratamiento con corticoides sistémicos, trasplante renal, infección por el VIH y sida y tumores malignos en tratamiento con quimioterapia o radioterapia.^{1, 50}

La infección cutánea y subcutánea localizada y la bursitis del olecranon generalmente no están asociadas a síntomas sistémicos afectado principalmente; hígado, corazón, riñones, ojos y el cerebro, la sintomatología varía de acuerdo con los órganos afectados y la severidad de la lesión provocada.⁵⁰

Se cree que la prototecosis no se transmite de persona a persona, penetra al huésped por trauma cutáneo el cual puede pasar desapercibido. A pesar de que el período de incubación es desconocido, se piensa que puede tardar de semanas a meses. Se ha concluido que el contagio se da por el contacto de la piel con superficies contaminadas, tales como agua, suelo, piscinas, tanques de agua cubiertos de espuma, animales de granja y sitios de trabajo con humedad permanente. En muchos casos se piensa que los organismos consiguen entrar a través de heridas abiertas, sitios quirúrgicos.⁵⁰

Desde el punto de vista histopatológico, una biopsia del tejido infectado revela un infiltrado inflamatorio supurativo y granulomatoso que incluye histiocitos, células gigantes, linfocitos, neutrófilos, células plasmáticas y eosinófilos, que también pueden verse junto a áreas de necrosis. Además, suele hallarse la presencia de muchas tecas (esporas) esféricas solitarias que miden entre 6 y 10 mm de diámetro dentro de las células gigantes o extracelularmente. En algunos casos, la respuesta inflamatoria puede ser mínima.⁵⁰

Los organismos pueden visualizarse con ácido peryodico de Schiff, metanamina de plata y con la tinción de Gridley. A pesar de no tratarse de un hongo es caracterizado como levadura, entre las tecas visualizadas, son de gran tamaño contienen en su

interior endoesporas formadas por fisión. Luego de repetidas subdivisiones, los esporangios creados contienen hasta 50 esporas que forman una estructura tipo mórula propia de *P. wickerhamii*. *P. zopfii* no forma estructuras multiseptadas. Se pueden usar patrones de asimilación de hidratos de carbono o pruebas de inmunofluorescencia para la especiación, desarrolla lentamente en medio de Sabouraud pero a pesar de todo es de vital importancia su aislamiento para iniciar el proceso de identificación, presenta susceptibilidad a la actidiona, desarrollo adecuadamente a temperatura ambiente entre 18 25° C.⁵⁰

Histológicamente, la prototecosis debe diferenciarse de infecciones por otras algas o por otros hongos. Los organismos micóticos por considerar incluyen *Blastomyces dermatitidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Pneumocystis carinii* y *Rhinosporidium seeberi*. *Prototheca spp* difiere de las levaduras en la falta de brotes y pseudofilamento. El esporangio de *Coccidioides* y el del *Rhinosporidium* son más grandes y contienen un poco menos de endosporas. El diagnóstico específico de prototecosis cutánea puede confirmarse mediante el cultivo de la biopsia de piel.^{1, 50}

La anfotericina B intravenosa continúa siendo el fármaco más efectivo para erradicar las infecciones por *Prototheca spp*. Éste debe usarse como agente de primera línea en caso de enfermedad diseminada en pacientes con enfermedades de base, inmunodeprimidos o con inmunosupresión. Los derivados azólicos y la cirugía pueden reservarse para pacientes con enfermedad localizada. El itraconazol parece ser el agente más efectivo en esta clase de fármacos, y debe administrarse a razón de 200mg una vez al día por 2 meses. La escisión quirúrgica debe considerarse de primera elección en los pacientes que presentan bursitis del olecranon.^{1, 50}

Diagnóstico de fungemia por *Malassezia spp*

Las levaduras del género *Malassezia* son organismos lipófilas siendo *M. pachydermatis* la única especie que no es lípido-dependiente, forman parte de la flora cutánea tanto de animales como del humano, siendo aisladas en un 92 a 100% de personas sanas, han ido adquiriendo una importancia considerable por su asociación a procesos infecciosos como agentes de micosis superficiales o de infecciones sistémicas, siendo consideradas como patógenos oportunistas. Son importantes algunos factores endógenos y exógenos que pueden influir en su desarrollo, como es la temperatura y humedad, piel grasa, tratamiento con corticoesteroides y problemas de inmunodeficiencia.^{27, 28, 29, 30}

Durante mucho años se ha venido utilizando el binomio *Malassezia furfur* para designar la fase micelial de las levaduras lipófilas encontradas en la piel humana, en tanto se reservaban los términos *Pityrosporum ovale* y *Pityrosporum orbiculare* para los dos tipos morfológicos de la fase levaduriforme. Los cambios taxonómicos en años recientes obligan a reclasificar a los agentes etiológicos o asociados. Comprende siete especies: *M. furfur*, *M. pachydermatis*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta* y *M. slooffiae*.^{27, 28, 29, 30}

M. furfur y *M. globosa* son agentes causales de la pitiriasis versicolor, dermatitis seborreica y ciertas foliculitis, pero también pueden causar sepsis relacionada con el catéter en neonatos, prematuros y enfermos inmunodeprimidos alimentados con nutrición parenteral enriquecida con lípidos. Los sistemas automatizados de hemocultivos no suelen detectar su crecimiento por lo que, cuando se sospeche una fungemia por especies de este género, para la extracción de sangre (a través del catéter de la nutrición parenteral) y su posterior siembra en medios de cultivo suplementados con ácidos grasos: SDA más aceite de oliva, agar Dixon modificado (ADm) o Leeming-Notman.^{27, 28, 29, 30, 61}

Además de los medios suplementados, también se puede utilizar medios específicos para el aislamiento de las especies de este género, como son el medio ADm y el de Leeming-Nogman. A partir de su crecimiento en estos medios, la identificación de las especies de *Malassezia* se lleva a cabo mediante criterios microscópicos y bioquímicos. Entre estos últimos: perfil de actividad enzimática; producción de catalasa (la mayoría de las especies son positivas), actividad estearasa, estearasa lipasa, N-fosfohidrolasa, fosfatasa ácida y fosfatasa alcalina; crecimiento en SDA no suplementado con lípidos a 32 °C; crecimiento en ADm a 32 °C, 37 °C y 40 °C; utilización de Tween 80, Tween 40 y Tween 20, a diferencia de otras levaduras, las pruebas de fermentación de azúcares son negativas.^{27, 28, 29, 30}

Características morfológicas y fisiológicas

Malassezia furfur

Después de siete días de incubación en ADm las colonias son de color amarillo, opacas, lisas, umbilicadas o ligeramente plegadas convexas. El tamaño y la forma de las células es variable: comprende células ovales, cilíndricas (1.5µm-3µm x 2,5 µm-8 µm) o esféricas (2.5 µm-5 µm, en promedio 6 µm). Los brotes germinativos se forman en una base ancha. Puede formar filamentos en cualquier punto de la superficie celular. Es catalasa y ureasa positivas. Crece en presencia de los Tweens 20, 40, 60 y 80 a porcentajes de 0,1, 0,5, 5 y 10. Tiene buen crecimiento en ADm a 32° C, 37° C y 40° C. No crece SDA. Contenido guanina citosina (% G-C) del ADN: 66,4 ± 0,3%.^{27, 28, 30}

Malassezia pachydermatis

Después de siete días de incubación en ADm, las colonias son mate, pálidas y de color crema, a veces rosado, convexa y algunas veces umbilicadas, de color crema. Las células son pequeñas, ovaladas. Las gemas se forman en una base ancha (la

más grande de todas las especies) dejando una cicatriz de gemación prominente. Es catalasa y ureasa positivas. El Tween 20 al 10% inhibe el crecimiento; tiene buen crecimiento en ADm a 32 ° C, 37° C y 40° C y es la única especie que presenta crecimiento en SDA a 32° C. Contenido % G-C del ADN: 55,6 ± 2%.^{27, 28, 30}

Malassezia sympodialis

En piel humana se aísla con más frecuencia que *M. furfur*. Después de siete días de incubación en ADm a 32° C, las colonias son brillantes, lisas, color crema, planas o con una ligera elevación central. La micromorfología comprende células ovas a globosas (1 µm-2 µm por 2µm). La base de gemación es más estrecha que la célula madre pero igual de ancho que la gema. Presenta gemación repetitiva o simpodial. Catalasa y ureasa positivas. El crecimiento es inhibido por el Tween 20 al 10%, presenta crecimiento en ADm a 32° C, 37° C y 40° C y no crece en SDA a 32° C. Contenido % G-C del ADN: 62,5 ± 0,2%.^{27, 28, 30}

Malassezia globosa

Se encuentra frecuentemente en pacientes que padecen pitiriasis versicolor (PV) y dermatitis seborreica (DS). Después de siete días de incubación en ADm, las colonias son elevadas, con pliegues profundos en su superficie y rugosas de color crema. Las células son esféricas (2 µm). Los brotes se forman en una base estrecha. Las cicatrices de gemación no son prominentes. Algunas veces forma filamentos cortos en el origen de la gemación. Es catalasa y ureasa positivas. Incapaz de utilizar cualquiera de los Tweens como única fuente lipídica pero puede presentarse un anillo de precipitación alrededor del Tween 40 y del Tween 60; tiene buen crecimiento en ADm a 32° C; no crece a 37° C o su crecimiento es muy débil, pero no crece a 40° C ni en SDA a 32° C. Contenido % G-C del ADN: 53,5%.^{27, 28, 30}

Malassezia restricta

Después de siete días de incubación en ADm, las colonias son opacas, rugosas o lisas en los bordes (3 mm de diámetro). Sus células son esféricas u ovals (1.5 μm -2 μm x 2 μm). Las yemas se forman en una base relativamente estrecha. Catalasa negativa, ureasa positiva. Es incapaz de utilizar cualquiera de los Tweens como única fuente de lípidos y tampoco crece en SDA a 32° C. Contenido % G-C del ADN: 59,9 \pm 0,1%.^{27, 28, 30}

Malassezia obtusa

Es poco frecuente en la piel humana. Después de siete días de incubación en ADm a 32° C, las colonias son lisas y planas (4 mm en promedio). Las células son grandes y cilíndricas (1.5 μm -2 μm x 4 μm). Las gemas se forman en una base ancha. Puede formar filamentos en cualquier punto de la célula madre. Catalasa y ureasa positivas. Es incapaz de utilizar cualquiera de los Tweens como única fuente de lípidos. Crece bien en ADm a 32° C y puede o no crecer a 37° C. No presenta crecimiento en SDA a 32° C. Contenido % G-C del ADN: 60,7%.^{27, 28, 30}

Un rasgo fisiológico que presentan es el empleo de lípidos como única fuente de carbono. Esta afinidad por los lípidos varía entre las especies del género, pudiéndose de las especies lipodependientes aquellas que necesitan ácidos grasos de cadena larga (C₁₂ a C₂₄) y de levaduras no lipodependientes que pueden desarrollarse en presencia de ácidos grasos de cadena corta. Comúnmente las levaduras lipodependientes son causantes de pitiriasis versicolor y se asocian con patologías cutáneas como la dermatitis seborreica, foliculitis y dermatitis atópica. También se han asociado con infecciones sistémica principalmente en personas inmunosuprimidas y en neonatos prematuros que han recibido alimentación parenteral rica en lípidos. Por el contrario las levaduras no lipodependientes se han

asociado con dermatitis y otitis externas crónicas principalmente en animales domésticos.^{27, 28, 30}

El género *Malassezia* agrupa levaduras del tipo mitospórico que hasta el momento no se ha podido establecer su fase sexual. La relación con los basidiomicetos se indujo por la presencia de una pared celular gruesa y multilaminar además de la tinción positiva de azul de diazo B. Conjuntamente se apoya esta aseveración, por la capacidad de hidrolizar la urea, el crecimiento en ciclohexamida, la formación de Q-9, la ausencia de xilosa en los hidrolizados de sus paredes, la ausencia de lisis de la pared celular por la enzima β -(1-3)-D-glucanasa.^{27, 28, 30}

Material

Las infecciones hospitalarias por hongos oportunistas son cada vez más frecuentes. Aunque *Candida* sea el agente responsable de la mayoría de estas micosis, en los últimos años otras levaduras han sido descritas como agentes patógenos emergentes por lo que es importante la tipificación del agente causal debido a la gran diversidad de levaduras que pueden causar infección, en un mismo género esta importancia está sustentada en su capacidades de patogenicidad y por la resistencia a antimicóticos que puede presentar cada una de las especies y en otros géneros.

A pesar de que *Prototheca sp.* es un alga su diferenciación es de vital importancia, a pesar de tener una micromorfología tan característica en cultivos jóvenes con el paso del tiempo las tecas se van separando dando el aspecto de levaduras esféricas, es de vital importancia identificarla por su capacidad de causar infecciones en el hombre, cabe destacar que a pesar de no ser una hongo responde perfectamente bien a tratamientos antifúngicos como la anfotericina B.

Actualmente han surgidos nuevos géneros que a pesar de ser comensales han adquirido la capacidad de producir enfermedad bajo ciertas circunstancias como es el caso de pacientes inmunosuprimidos, leucemia, VIH, como son el caso de *Trichosporon sp.*, *Rhodotorula sp.*, y *Cryptococcus sp.*, debido sus factores de patogenicidad que les permiten causar cuadros sistémicos y la resistencia a antifúngicos.

Recordando que un punto de vital importancia es la consideración de tratamientos profilácticos, ya que esto le permite desarrollar una resistencia secundaria o ser dosis dependientes.

Determinación por RapID

Kit RapID 20 placas	2
Pipetas pasteurizadas esterilizadas	45
bulbos	1
Asa bacteriológica	15
Incubadora a 30 °C	1
Incubadora a 28 °C	1
Agar sabouraud dextrosa	80
Medio de inoculación rapID 2mL	40
Mechero	1
Encendedor	2
Gradilla	1
Guantes	1 caja
Cubre bocas	1 caja
Recipiente de residuos	1
Bandeja para transportar muestras	1
Gasas	1 paquete
CROMOagar	40
Bolsa para esterilizar gas y vapor	2

Determinación por MicroScan

Kit de MicroScan con 20 placas	2
puntas 2-200µL	60
Aguas de inóculo para MicroScan	40
Micropipeta 5-50µL	1
Patrón de turbidez	1
Frasco de peptidasa	1
Frasco de NaOH 0,05N	1
Agar Sabouraud dextrosa	60
Tijeras	1
Pipetas Pasteur	10
Lector de MicroScan Autoscan 4	1
Incubadora a 37 °C	1
Hojas blancas tamaño carta	100
Impresora	1
Placa Protectora	1

Determinación por ID 32 C

puntas 100-1000µL	90
puntas 2-200µL	96
Micropipeta 100-1000µL	1
Micropipeta 20-200µL	1
Medio de suspensión ID32	40
Agar sabouraud dextrosa	40
Incubadora a 28 °C	1
Placa/C médium ID32	40
Tubo 2 de Mcfarlan	1
Impresora	1

Recuperación de cepas ATCC

Caldo de Sabouraud dextrosa	3
Agar Sabouraud dextrosa	12
Incubadora a 37 o 28 °C	1
CROMOagar	3
ATCC:66028 <i>C. tropicalis</i>	1
ATCC: MYA-654 <i>C. dubliniensis</i> *	1
ATCC:66031 <i>C. neoformans</i>	1

*cepa proporcionada por el laboratorio de micología Hospital general

Estudio microscópico AHM

Agar Sabouraud dextrosa	40
Incubadora a 28 °C	1
AHM + tween 80 al 1%	40
Cubre objetos	80
Microscopio	1

Métodos

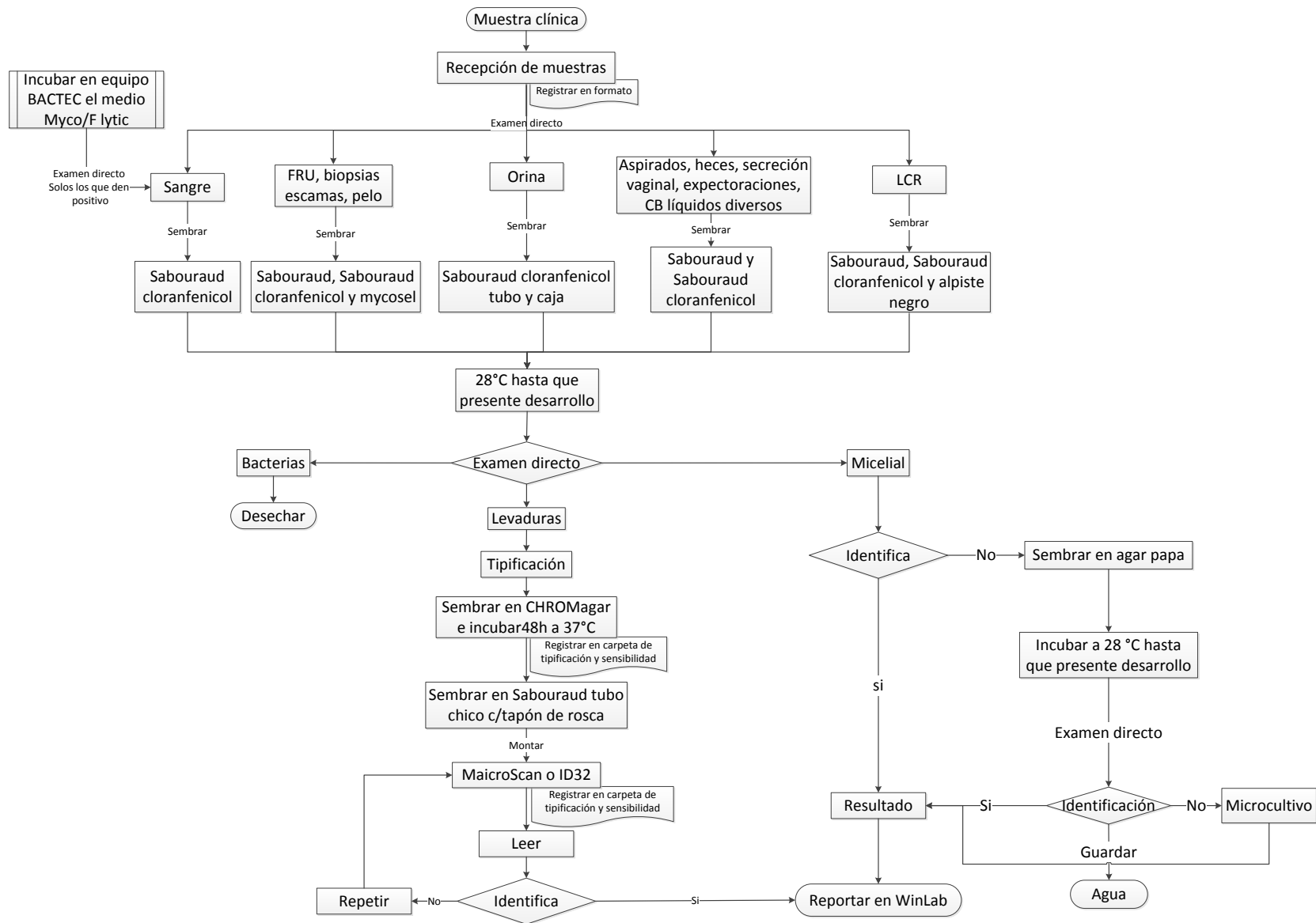


Diagrama 9: procesamiento de muestras clínicas en el INP.

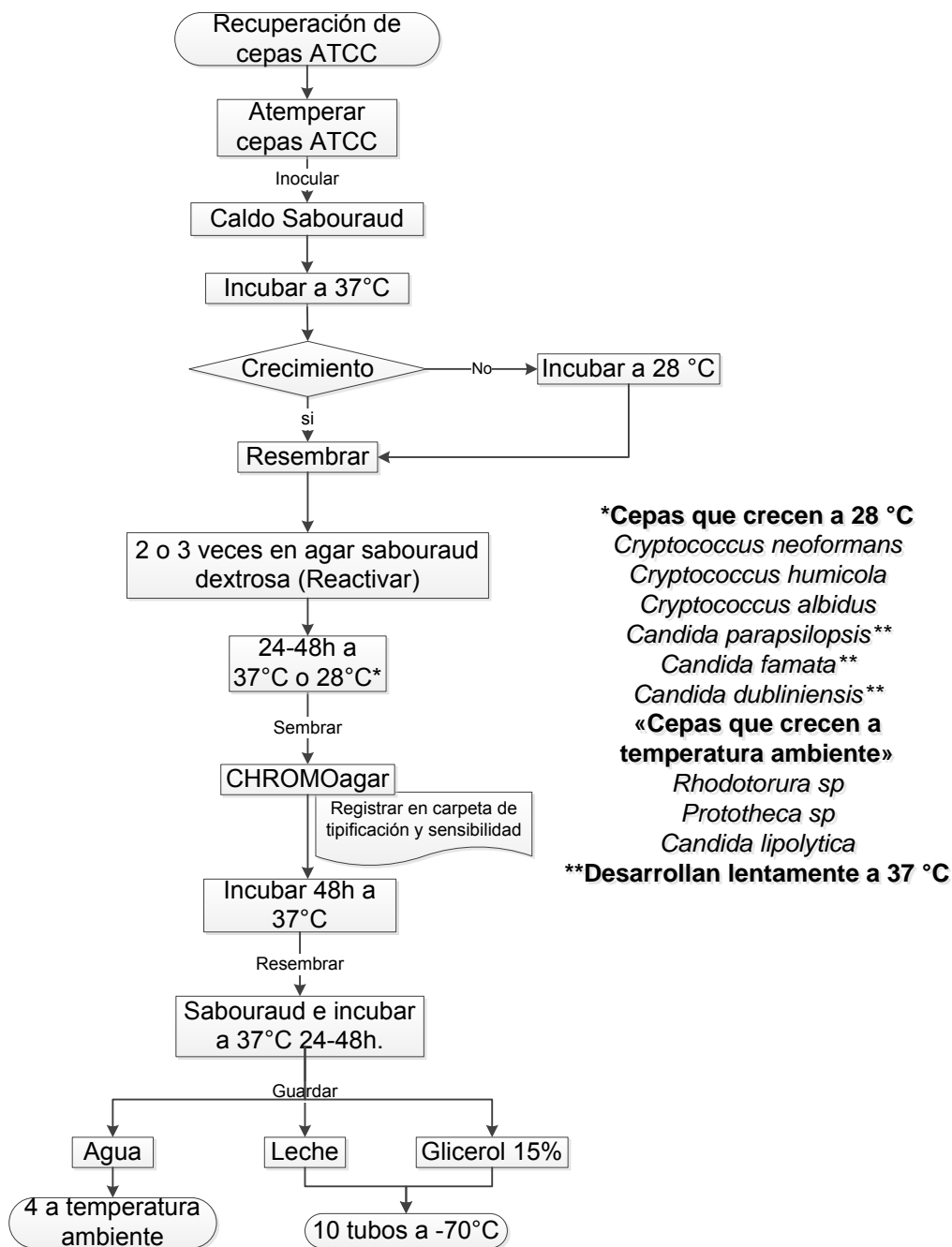


Diagrama 2: proceso de recuperación de cepas ATCC para control de calidad interno.

Se seleccionaron e incorporaron 36 cepas de pacientes que cursaban con una infección causa por levadura confirmada mediante examen directo (pseudohifas y/o blastoconidias) o por el desarrollo de levaduras en primo aislamiento: agar Sabouraud dextrosa (ASD), agar Sabouraud dextrosa cloranfenicol, agar Sabouraud

dextrosa cloranfenicol ciclohexamida (Mycosel), los especímenes fueron obtenidos en Instituto Nacional de Pediatría (INP) y se trabajó con 3 cepas ATCC como control (Tabla 4) y una cepa de control de calidad externo PACAL. Las muestras fueron resembradas en tubos de ASD para su recuperación en el transcurso del proyecto.

A cada cepa se le realizó las siguientes pruebas: tinción con azul de lactofenol, caracterización colonial por CHROMagar Candida®, producción de pseudohifas y clamidoconidias en agar harina de maíz + tween 80 e identificación mediante tres kits MricroScan®, ID 32 C® y RapID®.

Metodología para el CHROMagar Candida®: las cepas fueron sembradas por la técnica de estría en agotamiento, las placas fueron incubadas 48 horas a 37° C o 28° C las cepas de *Rhodotorula mucilaginosa* y *Prototheca wikerhamii* se incubaron a temperatura ambiente en un intervalo de 18 a 25° C por un periodo 72 a 96 horas, para posteriormente observar la morfología y coloración de las colonias.

En el medio agar harina de maíz + tween 80 en caja Petri se sembró por estríado y se incubó a 28° C durante 48-72 horas, para hacer la observación se colocó un cubreobjetos sobre las estrías y en otra parte fue incubada y posteriormente se colocó un cubreobjetos las colonias y enseguida la placa fue colocada sobre la platina del microscopio para su observación microscópica a un objetivo de 40X y tomaron fotos de la microscopia de cada una de las cepas evaluadas, se evaluó la influencia de agregar el Tween 80 antes y después de esterilizar el medio de cultivo.

La preparación de los inóculos y los paneles para los sistemas de MicroScan®, ID 32 C® y RapID® fueron realizados de acuerdo a los insertos de cada kit.

Tabla 4: cepas seleccionadas para tipificar con MicroScan, ID32, RapID

Cepas	No.	Cepas	No.
<i>Candida albicans</i>	5	<i>Cryptococcus neoformans</i>	3
<i>Candida tropicalis</i>	5	<i>Cryptococcus albidus</i>	2
<i>Candida parapsilopsis</i>	5	<i>Candida dubliniensis</i>	1

<i>Candida glabrata</i>	5	<i>Prototheca sp</i>	1
<i>Trichosporun sp</i>	5	<i>Cryptococcus laurenti</i>	1
<i>Candida krusei</i>	3	<i>Rhodotorula sp</i>	1
<i>Candida famata</i>	3		

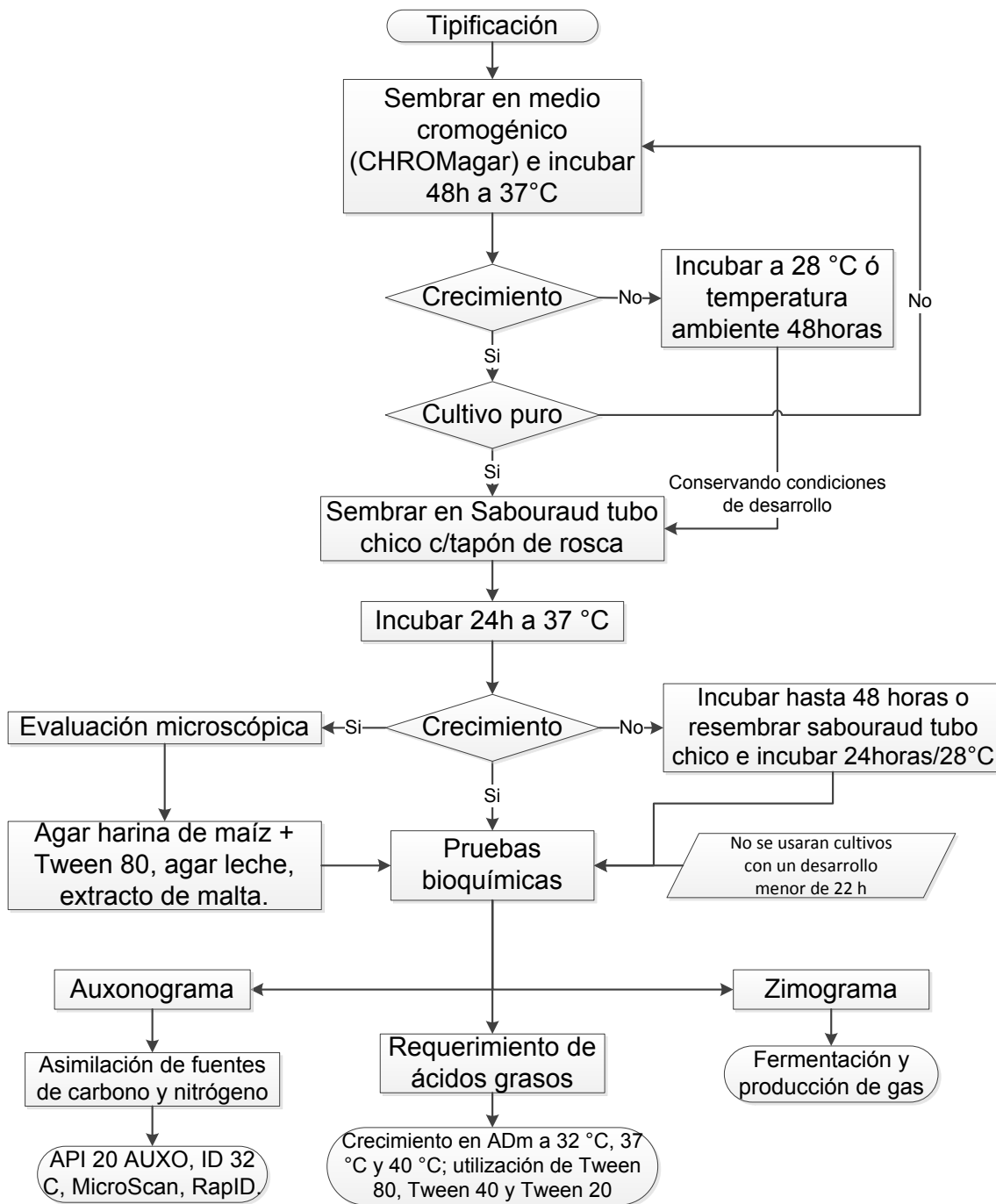
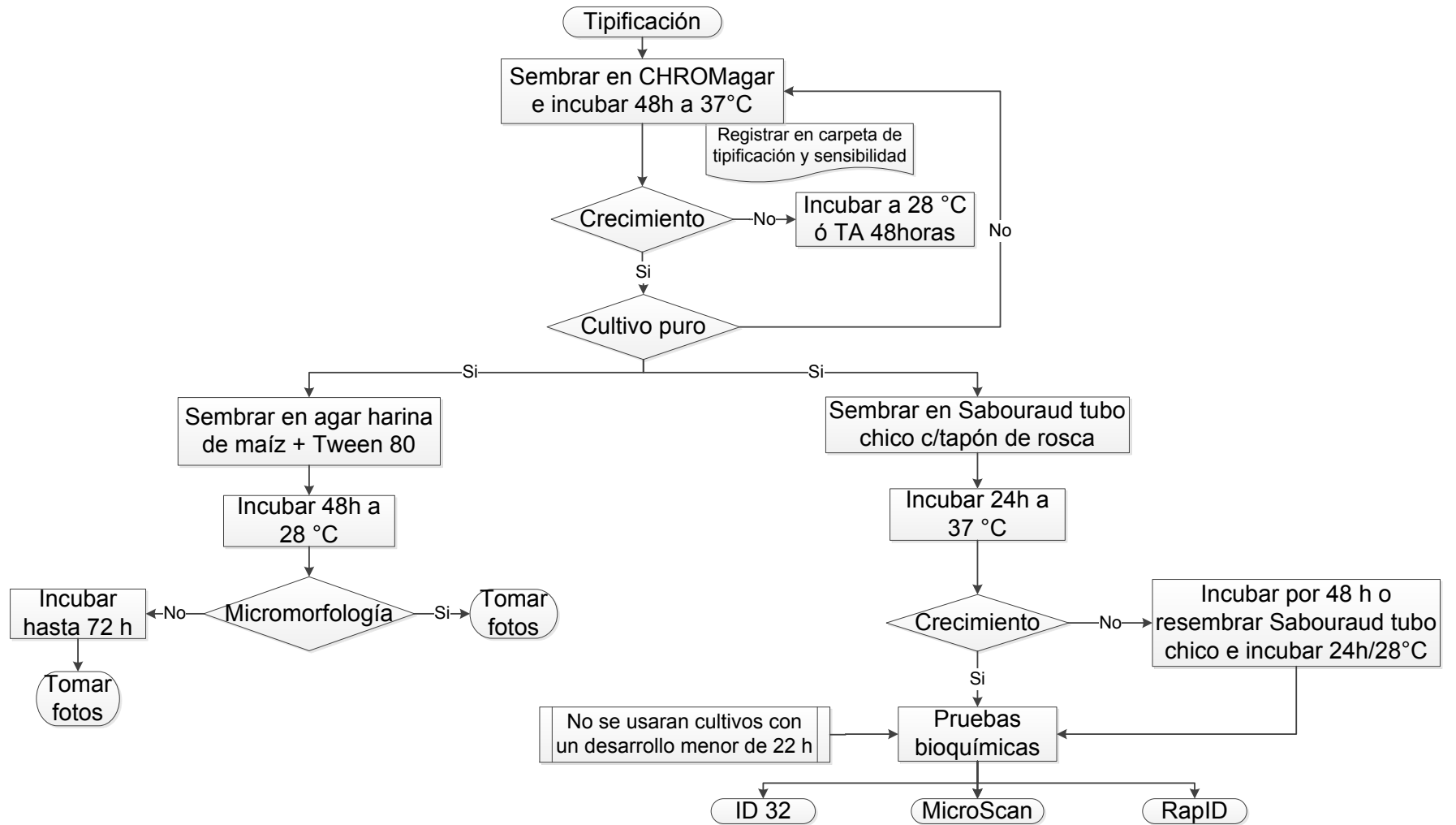


Diagrama 1: Proceso de tipificación de levaduras

Diagrama 2: Metodología empleada para la tipificación de las muestras problemas y cepas ATCC.



RapID Yeast Plus System®

La placa de RapID Yeast Plus System (Remel) es un sistema cualitativo que utiliza sustratos convencionales y cromogénicos para identificar microorganismos de importancia medica como las levaduras.

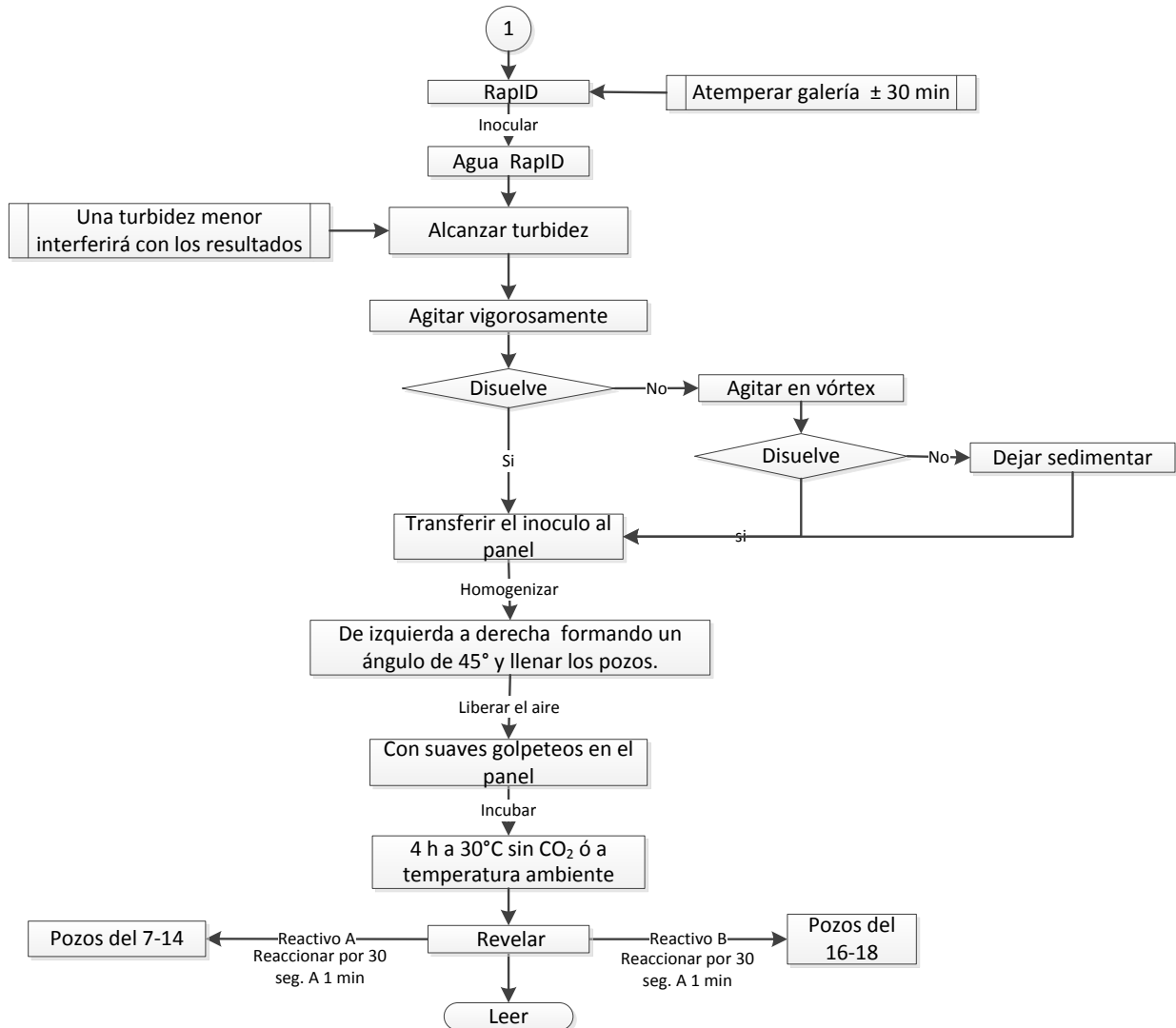


Diagrama 3: paso para identificar levaduras con el panel de RapID yeast plus system.

Está compuesto por un panel de 18 pocillos; cada uno contiene un sustrato deshidratado que detecta la asimilación de carbohidratos, aminoácidos, así como la hidrólisis de la urea y de ácidos grasos:

Glucosa (GLU)

Maltosa (MAL) sacarosa (SUC)

Trehalosa (TRE)

rafinosa (RAF)

Éster de ácido graso (LIP)

p-nitrofenil-N-acetil- β -D-galactosaminida (NAGA)

p-nitrofenil- α -D-glucosido (aGLU)

p-nitrofenil- β -D-glucosido (BGLU)

o-nitro-fenil β -D-galactosido (ONPG)

p-nitrofenil- α -D-galactosido (aGAL)

p-nitrofenil- β -D-fucosido (BFUC)

p-nitrofenil-fosfato (PHS)

p-nitrofenil-fosforilcolina (PCHO)

Urea (URE)

prolina β -naftilamida (PRO)

histidina β - naftilamida (HIS)

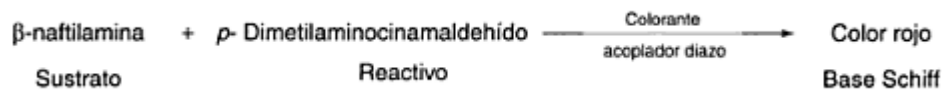
leucilglicil β - naftilamida (LGY)

Permite identificar hasta 43 especies de levaduras, con ciertas limitaciones y ventajas.

Después de inocular el panel es incubado por cuatro horas, para examinar la reactividad de cada pocillo, en algunos casos se adiciona un reactivo para evidenciar un cambio de color, el patrón obtenido de puntuaciones positivas y negativas se emplean para identificar el aislamiento en estudio.

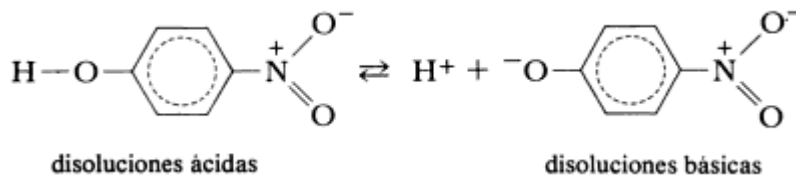
Fundamentos de las reacciones de identificación

Sustratos aminoácido-naftilamida: ρ -dimetilamino-cinamaldehído (DMACA) reactivo que se encuentra disponible comercialmente, es un revelador, un análogo es ρ -dimetilaminobenzaldehído (DMABA); se acopla con la β -naftilamina para formar una base de Schiff que actúa como un colorante acoplador diazo de color rojo cereza a rojo púrpura.



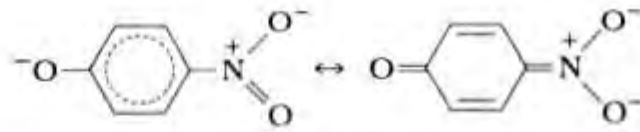
Sustratos Nitrofenilo: si se metaboliza el sustrato por la enzima correspondiente se libera paranitrofenol. A pH alcalino estos compuestos son amarillos, si la reacción ocurre en pH ácido debe añadirse hidróxido de potasio (KOH).

El paranitrofenol en disoluciones básicas es amarillo intenso, con una absorción máxima a una longitud de 400 nm. En la forma básica, el átomo de oxígeno y el grupo nitro pueden combinarse con el anillo aromático un amplio sistema de deslocalización. En su forma acida el paranitrofenol al oxígeno le falta la carga negativa, presentando una absorción máxima en el ultravioleta a 320 nm, presenta una coloración amarillo verdoso débil.





para-nitrofenol.
pH Ácido color amarillo
verdoso débil



pH Alcalino color amarillo intenso

MicroScan

El panel de Rapid Yeast Identification Panel MicroScan es un método automatizado para la identificación rápida de 40 especies de levaduras y otros microorganismos afines.

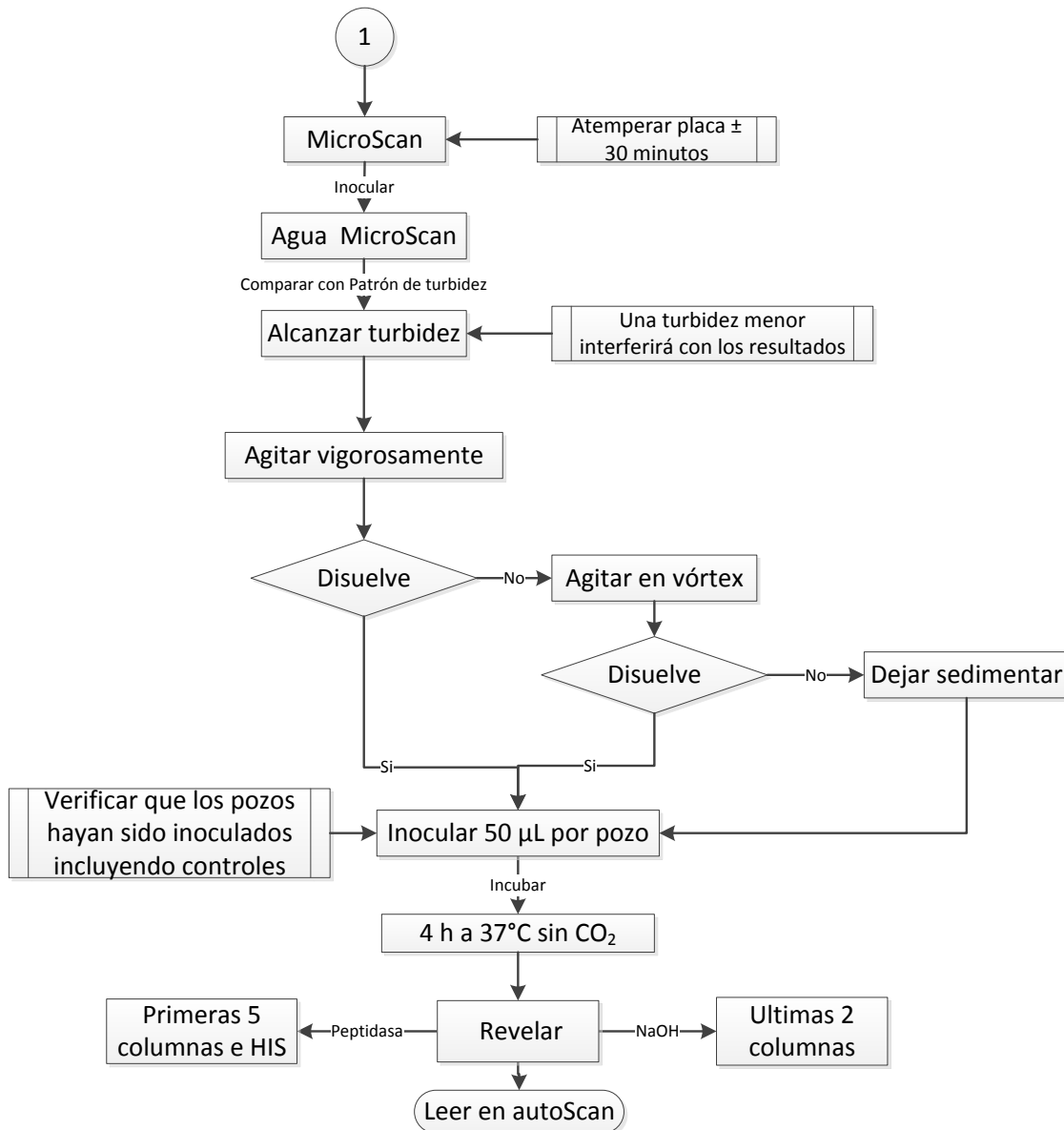


Diagrama 4: paso para identificar levaduras con el panel de MicroScan.

Este sistema detecta la asimilación de sustratos por su crecimiento, se basa en la utilización de pruebas convencionales y cromogénicas para la identificación de aislamientos en muestras clínicas, en una placa de microdilución de 96 pocillos que utiliza 27 sustratos deshidratados contiene 13 aminoácidos β -naftalamida, tres carbohidratos, nueve sustratos nitrofenilos y la detección de dos enzimas:

Hidroxi prolina- β -naftalamida (HPR)
L-isoleucina- β -naftalamida (ILE)
L-prolina- β -naftalamida (PRO)
L-tirosina- β -naftalamida (TYR)
Glicina- β -naftalamida (GLY)
Glicilglicina- β -naftalamida (GGLY)
Glicil-L-arginina- β -naftalamida (GLAR)
Glicil-L-prolina-4-metoxi- β -naftalamida (GLPR)
L-arginil-L-arginina- β -naftalamida (AARG)
L-lisina-L-alanina- β -naftalamida (LYAL)
L-alanina-4metoxi- β -naftalamida (ALA)
L-seril-L-tirosina- β -naftalamida (STY)
L-histidina- β -naftalamida (HIS)
Sacarosa* (SUC1 y SUC2)
Trehalosa (TRE)
Urea (URE)
3-indoxil fosfato (IDX)
 ρ -nitrofenil- α -D-glucopiranosido* (AGL1 y AGL2)
 ρ -nitrofenil- β -D-glucopiranosido (BGL)
o-nitrofenil- α -D-galactopiranosido (BGAL)
 ρ -nitrofenil- β -D-fucopiranosido (BDF)
AGAL (ρ -nitrofenil- α -D-galactopiranosido)
 ρ -nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosamida (NAG)

ρ -nitrofenil- α -D-celobiosa (CEL)

ρ -nitrofenil-N-acetil- β -D-galatosaminida (NGAL)

*El mismo sustrato puede formularse de varias formas

Se rehidratan con una suspensión concentrada en agua estéril y después de una incubación de cuatro horas a 37 °C. La fiabilidad de los sustratos puede determinarse con organismos puros como cepas ATCC, que presentan reacciones conocidas.

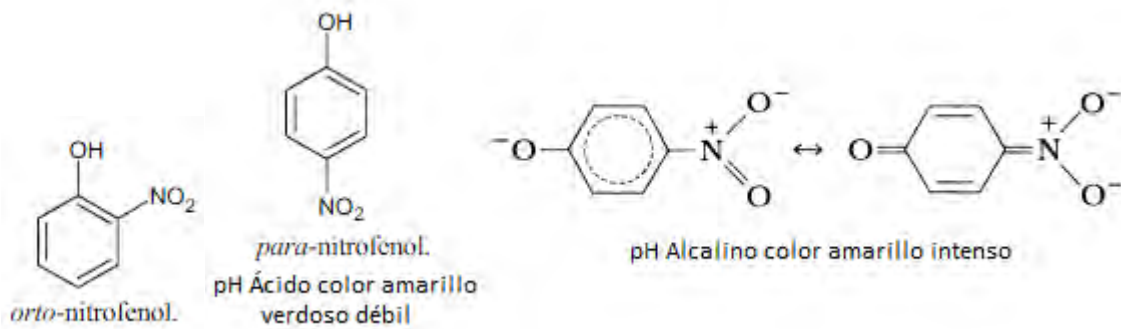
LabPro software proporciona un manejo exclusivo para los sistemas MICROSCAN proporcionando soluciones simples para aerodinamizar el flujo de trabajo. El windows del sistema operativo es fácil de usar y de aprender con un mínimo de entrenamiento, El sistema autoSCAN-4 procesa cada panel en pocos segundos basado en un método colorimétrico y turbidimétrico, simplificando la obtención de resultados dándonos la oportunidad de realizar una lectura manual para corroborar resultados. La excepcional fiabilidad del instrumento y la alta calidad hacen del AutoSCAN-4 un excelente sistema complementario.

Fundamentos de las reacciones de identificación

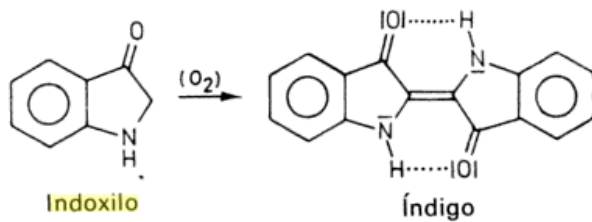
Peptidasa (sustratos aminoácido-naftilamida): cuando la enzima, generalmente un aminoácido arilamidasa hidroliza al sustrato se libera β -naftilamina la cual se detecta añadiendo ρ -dimetilamino-cinamaldehido el cual produce una coloración rosa-purpura.

Carbohidratos: la utilización de sacarosa o trehalosa produce un descenso en el pH, el indicador rojo clorofenol cambia de púrpura a amarillo.

Sustratos Nitrofenilo: si se metaboliza el sustrato por la enzima correspondiente se libera orto o paranitrofenol. A pH alcalino estos compuestos son amarillos, si la reacción ocurre en pH ácido debe añadirse hidróxido de sodio (NaOH).



Indoxil Fosfato (IDX): es escindido mediante una fosfatasa liberando indoxilo, el cual se combina con el oxígeno para formar azul índigo, en presencia de un precipitado azul.



Urea: la ureasa escinde la urea en amoníaco y dióxido de carbono, el amoníaco (en forma de carbonato amónico) produciendo un incremento en el pH el cual se detecta por el rojo de fenol que vira de amarillo a rosa-rojo.

Galería ID 32C

La galería ID 32 C (bioMérieux) es un sistema estandarizado; está compuesta por diferentes pruebas de asimilación y por una base de datos especialmente adaptada. Permite identificar 62 diferentes organismos levaduriformes o relacionados y puede ser utilizada manualmente o bien de forma automatizada mediante los sistemas ATB Expression o mini API.

La galería se compone de 32 cúpulas: 29 contienen un sustrato carbonado deshidratado, un control negativo, uno para determinar sensibilidad a la cicloheximida y la última es una prueba colorimétrica para la esculina.

Sustratos:

	Compuesto
ID 32 C	
GAL	Disacárido
ACT	Actividad antifúngica (levaduras)
SAC	Disacárido
NAG	Glucósido
LAT	Acido carboxílico
ARA	Carbohidrato
CEL	Carbohidrato
RAF	Carbohidrato
MAL	Disacárido
TRE	Carbohidrato
2KG	
MDG	Glucósido
MAN	Polialcohol obtenido de la hidrogenación del azúcar manosa
LAC	Carbohidrato
INO	Miembro de la vitamina B polialcohol
CONTROL -	-----
SOR	polialcohol o alcohol polihidrico de azúcar
XYL	Carbohidrato
RIB	Carbohidrato
GLY	Alcohol; base de los aceites
RHA	Carbohidrato
PLE	Carbohidrato
ERY	Polialcohol (alcohol de aucaar)
MEL	Carbohidrato
GRT	Derivado de la glucosa

MLZ
GNT
LVT
GLU
SBE
GLN
ESC

Glúcido trisacárido
Mineral ácido orgánico
Derivado de la levulosa (fructosa) cetoácido
Carbohidrato
Carbohidrato
Gluco-aminoácido

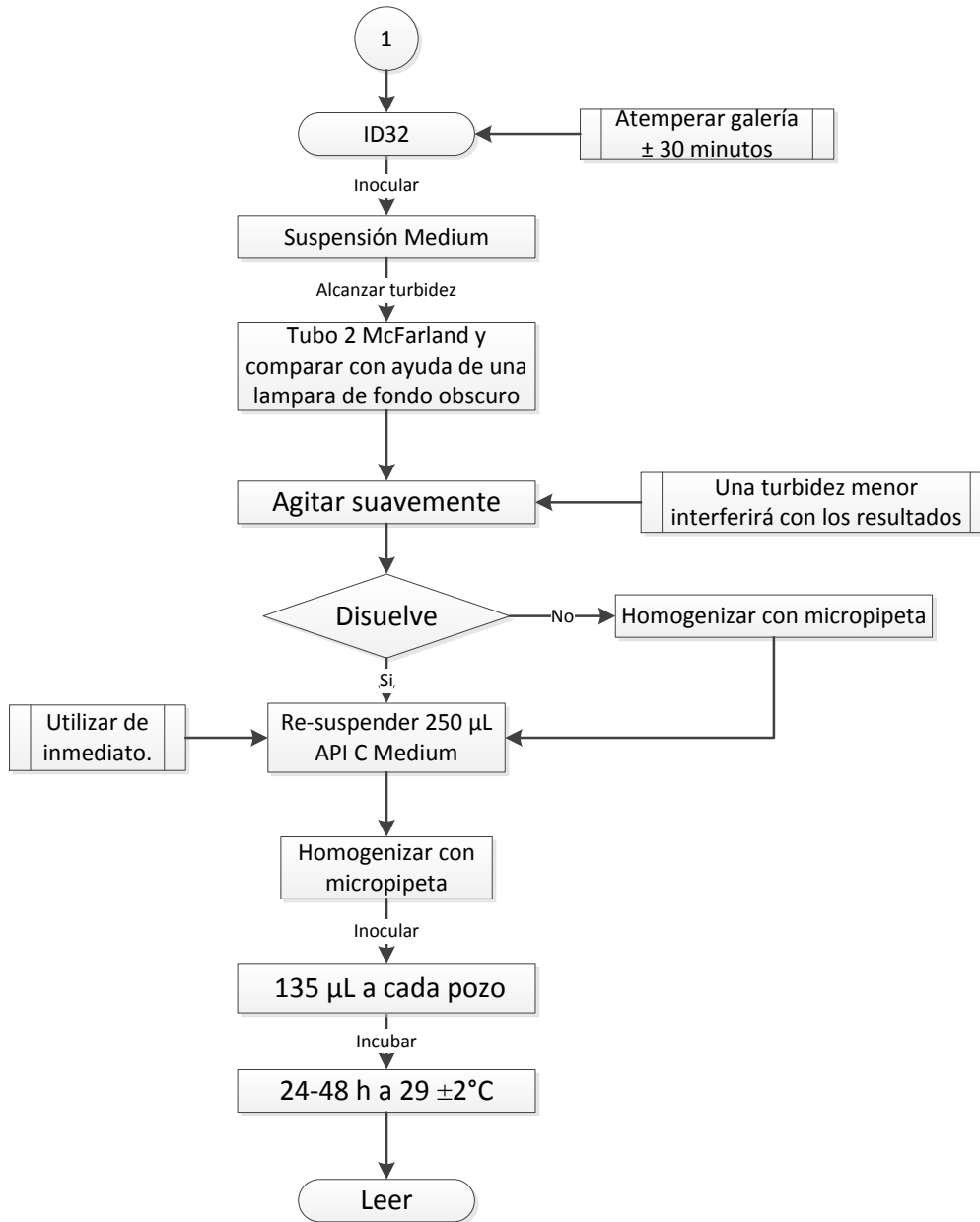


Diagrama 5: paso para identificar levaduras con el panel de ID 32 C.

Se han realizado otros ensayos que permiten diferenciar *C. dubliniensis* de *C. albicans* por la ausencia de crecimiento a 42 ° C y la actividad de α -D-glucosidasa asimilación de D-xilosa, pero falsos positivos se pueden obtener debido a cepas atípicas de *C. albicans* son capaces de mostrar estos aspectos fenotípicos.

Las propiedades fisiológicas de las levaduras en gran medida son de utilidad para identificar géneros y en menor medida las especies. Las pruebas más usadas son la asimilación de carbohidratos y de diferentes fuentes de nitrógeno basada en la habilidad de las levaduras de crecer aeróbicamente sobre determinados sustratos, crecimiento a diferentes temperaturas, hidrolisis de la urea y resistencia a antimicóticos; las levaduras presentan la habilidad de fermentar azúcares y producir dióxido de carbono siendo una herramienta para la tipificación.

Se realizó un análisis estadístico; se revisaron las bitácoras del laboratorio de parasitología y micología del periodo 2006-2012, de las muestras recibidas para búsquedas de hongos, se hizo registro tomando en cuenta, edad, sexo, servicio, registro, tipo de muestra, examen directo, cultivo y tipificación, se sacaron porcentajes de todas las cepas identificadas por año.

Control de calidad de pruebas bioquímicas

Los programas de control de calidad en el laboratorio de Micología tienen como misión asegurar que la información generada por el laboratorio sea precisa, fiable y reproducible. La consecución de estos objetivos se logra valorando la calidad de las muestras clínicas recibidas, controlando la realización de los procedimientos diagnósticos, los reactivos, medios e instrumentos utilizados, así como la formación y conocimientos del personal del laboratorio. También es necesario revisar y validar los resultados obtenidos.

Todos los lotes de pruebas bioquímicas, sean sistemas manuales, automatizados, o semiautomatizados, debe demostrarse la fiabilidad de los patrones de asimilación de los sustratos de identificación, puede comprobarse estudiando patrones de microorganismos conocidos como son las cepas ATCC, obteniendo reacciones positivas o negativas para cada uno de los sustratos de identificación. El control de calidad en general se lleva a cabo de la misma manera que una muestra, obteniendo las reacciones esperadas de las diferentes pruebas, tras un adecuado periodo de incubación bajo las condiciones de temperatura óptima de desarrollo. Este proceso debe llevarse a cabo cada vez que se inicie lote nuevo.

Las cepas de control de calidad deben conservarse congeladas, liofilizadas o en tubo de agar Sabouraud dextrosa a una temperatura de 2 a 8 °C (Para recobrar los especímenes liofilizados de levaduras, inocule un tubo de caldo no selectivo e incube la suspensión durante 24 a 48 horas a 37 °C o 28 °C), antes de ser empleadas las cepas deben ser reactivadas es decir deben de sembrarse de 2 a 3 veces en agar Sabouraud dextrosa. La composición del medio de cultivo puede diferir entre cada fabricante y como consecuencia puede influir en la actividad enzimática de las cepas de control de calidad seleccionadas. En consecuencia, el medio de cultivo puede influir en la actividad enzimática constitutiva de las cepas de control de calidad elegidas. La aceptación del funcionamiento del sistema de pruebas bioquímicas,

debe determinarse por comparación de los resultados del ensayo con los de otro fabricante, no solamente por la identificación.

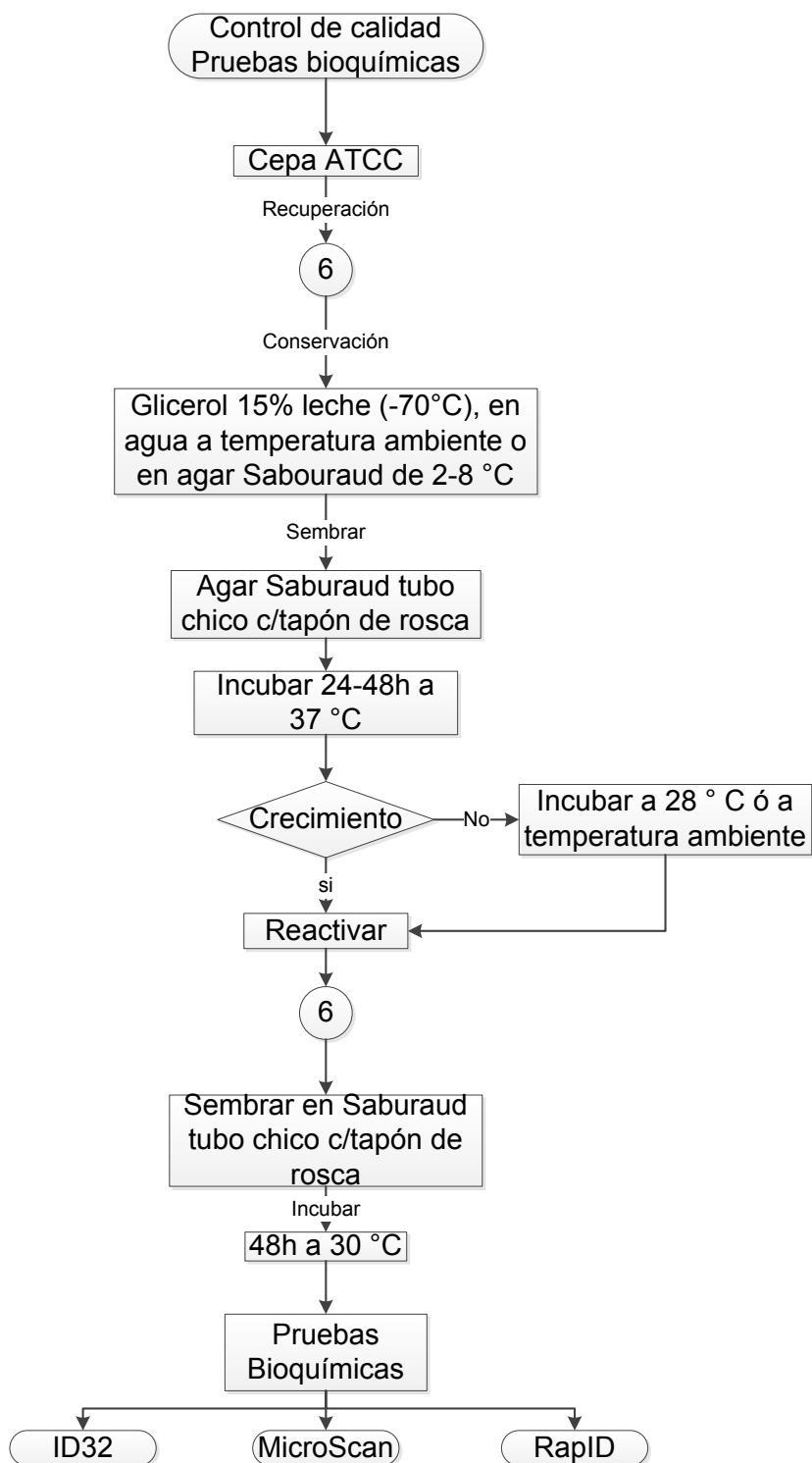


Diagrama 6: proceso de control de calidad para pruebas bioquímicas.

Resultados

Tabla 5: Resultados de tipificación MicroScan, ID 32 C, RapID.

Cepas*	ED	Muestras	CHROMagar Candida	Tipificación		
				MicroScan	ID 32 C	RapID
10171 (2009)	Positivo	Biopsia	Colonias rosas planas secas borde blanco	<i>C. kruseii</i>	<i>C. kruseii</i>	<i>C. kruseii</i>
12147 (2009)	Positivo	Orina	Colonias rosas planas secas borde blanco	<i>C. kruseii</i>	<i>C. kruseii</i>	<i>C. kruseii</i>
06052 (2011)	Negativo	AB	Colonias blancas a rosa pálido, mucoides, crece a 28 °C	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
05020	Negativo	Orina	Colonias amarillo paja secas bordes irregulares	<i>C. zeylanoides</i> (57.44% 12/06/12) <i>Prototheca sp</i> cuidando puntos críticos	<i>Prototheca wickerhamii</i> (se emplea tabla de API 20C AUX y directo)	<i>Prototheca wickerhamii</i>
06047	Negativo	CO	Colonias beige cremosas convexas	<i>C. famata</i> (cuidando puntos críticos)	<i>C. famata</i>	<i>C. famata</i>
06102	Negativo	Escamas	Colonias lila cremosas convexas (creció a TA)	<i>Cryptococcus albidus</i> 16/08/12	<i>Cryptococcus albidus</i>	<i>Cryptococcus albidus</i>
08089 (2)	Positivo	Heces	Colonias naranjas puntiformes crece a TA	<i>Rhodotorula rubra</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Rhodotorula rubra</i>

Cepas*	ED	Muestras	CHROMagar Candida	Tipificación		
				MicroScan	ID32	RapID
09029	Positivo	Secreción vaginal	Colonias verde oscuro cremosas puntiformes	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
09036	Positivo	Orina	Colonias verdes bandera cremosas	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
09105	Negativo	Orina	Colonias verde oscuras secas puntiformes	<i>Trichosporon beigelii</i>	<i>Trichosporon inkin</i>	<i>Trichosporon beigelii</i> (metaboliza glucosa)
10015	Positivo	Orina	Colonias lilas cremosas convexas	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
10038	Positivo	ANF	Colonias verde claro cremosas	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
10048	Negativo	FRU	Colonias blancas puntiformes crece a 28 °C)	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
10050	Positivo	Orina	Colonias verdes secas rugosas	<i>Trichosporon beigelii</i>	<i>Trichosporium inkin</i>	<i>Trichosporon beigelii</i> (no metaboliza glucosa)
10091	Negativo	FRU	Colonias beige puntiformes cremosas desarrollo a 28 °C	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. famata</i>	<i>C. famata</i>
10135	Positivo	Orina	Colonias moradas cremosas	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
11067	Positivo	CO	Colonias verde claro cremosas bordes blancos	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>

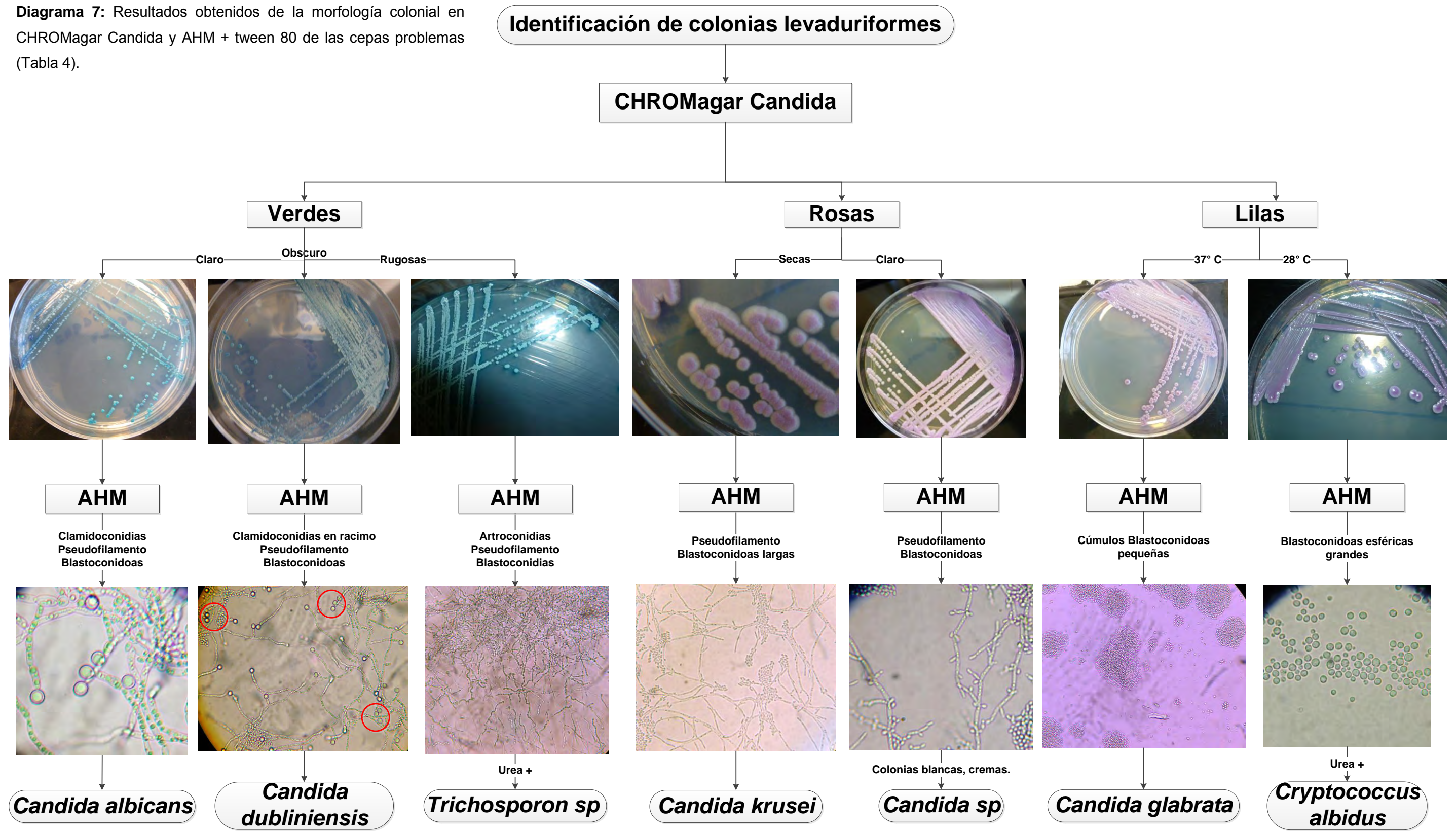
Cepas*	ED	Muestras	CHROMagar Candida	Tipificación		
				MicroScan	ID32	RapID
12029	Positivo	Orina	Colonias verde oscuras secas puntiformes (rugosas)	<i>Trichosporon beigelii</i>	<i>Trichosporon inkin</i>	<i>Trichosporon beigelii</i> baja probabilidad (metaboliza glucosa)
01002	Positivo	Orina	Colonias verde oscuras secas puntiformes (rugosas)	<i>Trichosporon beigelii</i>	<i>Trichosporon inkin</i>	<i>Trichosporon beigelii</i>
01017	Positivo	Orina	Colonias azul metálico con fondo morado cremosas	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
01060 (2)	Positivo	Orina	Colonias rosas a lila cremosas	<i>C. famata</i>	<i>C. famata</i>	<i>C. famata</i>
01072	Positivo	Orina	Colonias lila cremosas	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
01073	Positivo	Líquido peritoneal	Colonias blancas, puntiformes cremosas	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
01134	Negativo	Escamas	Colonias verde azulado con matices rosas, cremosas	<i>Cryptococcus laurenti</i>	<i>Cryptococcus laurenti</i>	<i>Cryptococcus laurenti</i>
02071	Positivo	Sangre	Colonias rosa pálido a blancas cremosas	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
09/05	Positivo	Sangre	Colonias lila cremosas	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
10/05	Positivo	Sangre	Colonias azul metálico borde morado	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>

Cepas	ED	Muestras	CHROMagar Candida	Tipificación		
				MicroScan	ID32	RapID
10/17	Positivo	Sangre	Colonias blancas cremosas	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
10/51	Negativo	Líquido peritoneal	Colonias lila cremosas desarrolla a TA	<i>Cryptococcus albidus</i>	<i>Cryptococcus albidus</i>	<i>Cryptococcus albidus</i>
10/62	Positivo	Catéter	Colonias verde claro bordes blancos, cremosas	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
11/21	Negativo	Orina	Colonias lila cremosas	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
11/28	Positivo	Sangre	Colonias blancas, cremosas	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
11/37	Negativo	Orina	Colonias lila cremosas	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
12/27	Positivo	Sangre	Colonias azul metálico bordes moras, cremosas.	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
03/06	Negativo	Orina	Colonias verdes butirosas desarrolla a 28 °C presencia de filamento	<i>Trichosporon beigeli</i>	<i>Trichosporon mucoides</i>	<i>Trichosporon beigeli</i>
01121 ATCC:66028	Control	Control + BACTEC	Colonia cremosa, azul metálico	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i> baja probabilidad
ATCC: MYA-654 <i>C. dubliniensis</i>	Control	Control	Colonias verde oscuro puntiformes cremosas	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. albicans</i>

Cepas*	ED	Muestras	CHROMagar Candida	Tipificación		
				MicroScan	ID32	RapID
ATCC:66031 <i>C. neoformans</i>	Control	Control	Colonias blancas mucoides puntiforme a las 72 horas toma un color rosa pálido	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
C. N 2	Positivo	LCR	Colonias blancas a rosa pálido mucoides puntiformes	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Cryptococcus albidus</i> baja probabilidad (placa mal sellada)
F-03	Control	<i>C. kruseii</i>	Colonias planas grandes, seca rosa con halo blanco	<i>C. kruseii</i>	<i>C. kruseii</i>	<i>C. kruseii</i>

TA: temperatura ambiente, ED: Examen directo, * Número micológico asignado por el laboratorio primero dos números representa mes y las siguientes tres cifras el número de muestra, F-03: muestra de control de calidad externo del laboratorio de Micología, C. N 2: muestra de apoyo hospitalario (ED positivo), CO: Cavidad oral, FRU: Fragmentos y/o residuos de uñas, AB: Aspirado bronquial ANF: Aspirado nasofaríngeo.

Diagrama 7: Resultados obtenidos de la morfología colonial en CHROMagar Candida y AHM + tween 80 de las cepas problemáticas (Tabla 4).

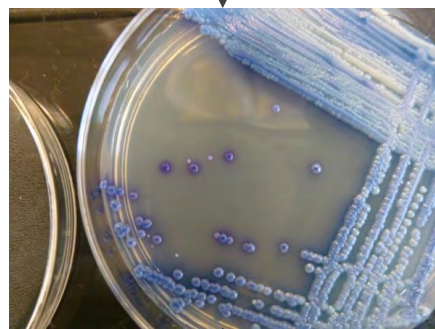


Identificación de colonias levaduriformes

CHROMagar Candida

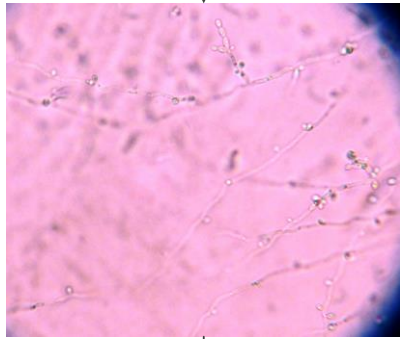
Azul

Púrpura



AHM

Pseudofilamento
Blastoconidoas terminales



Candida tropicalis

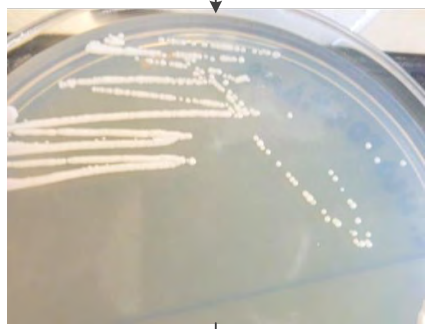
Blancas

28° C

28° C crema

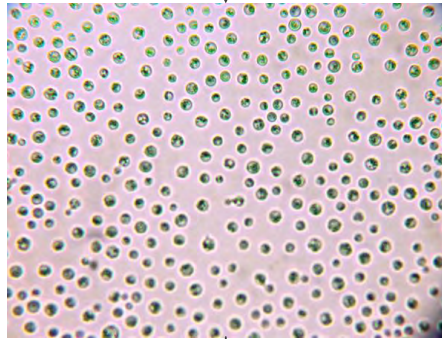
37° C

Rugosa, seca

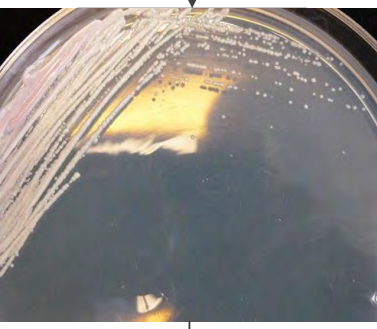


AHM

Blastoconidoas esféricas
grandes con capsula

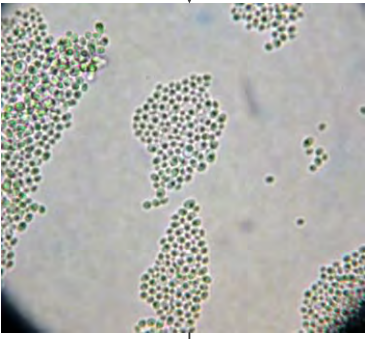


Cryptococcus neoformans



AHM

Cúmulos Blastoconidoas
medianas

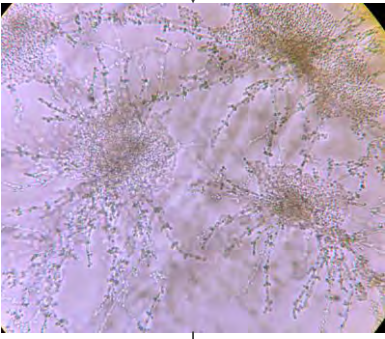


Candida famata



AHM

Pseudofilamento y
Blastoconidoas en
forma satelital

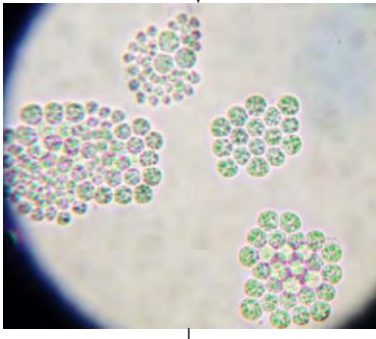


Candida parapsilosis



AHM

Cúmulos de tecas
esféricas



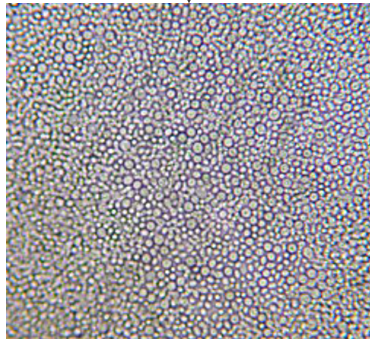
Prototheca wickerhamii

Anaranjadas



AHM

Cúmulos de Blastoconidoas
esféricas



Rhodotorula rubra

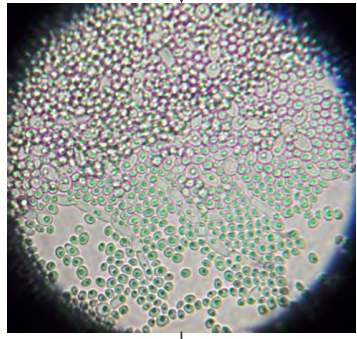
Púrpura

Rosa

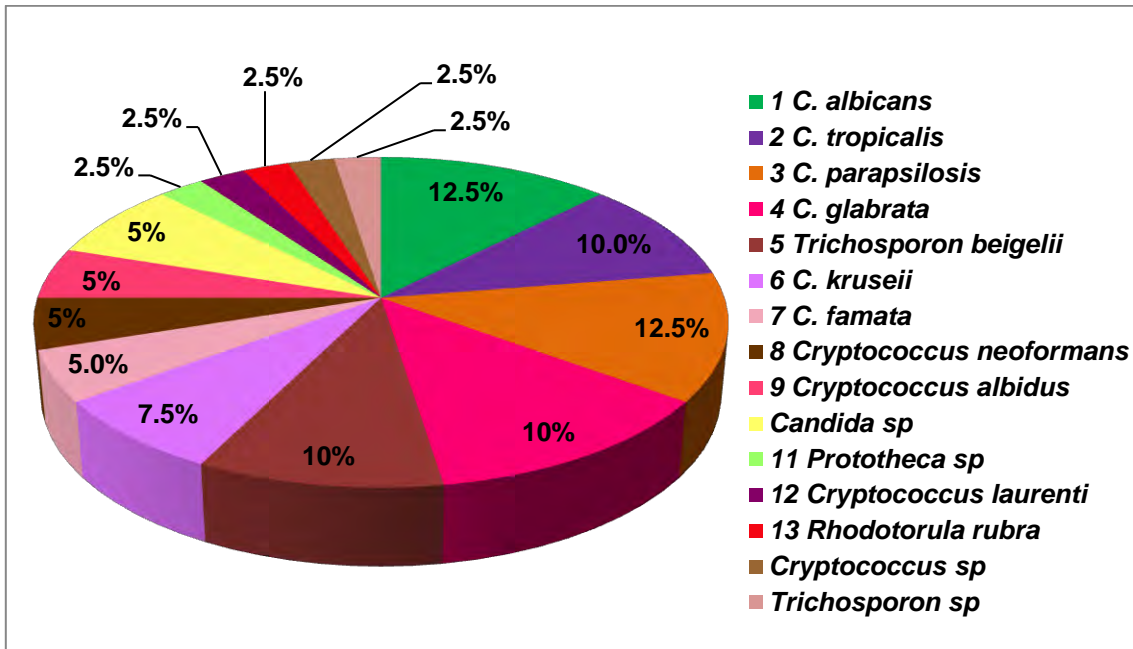


AHM

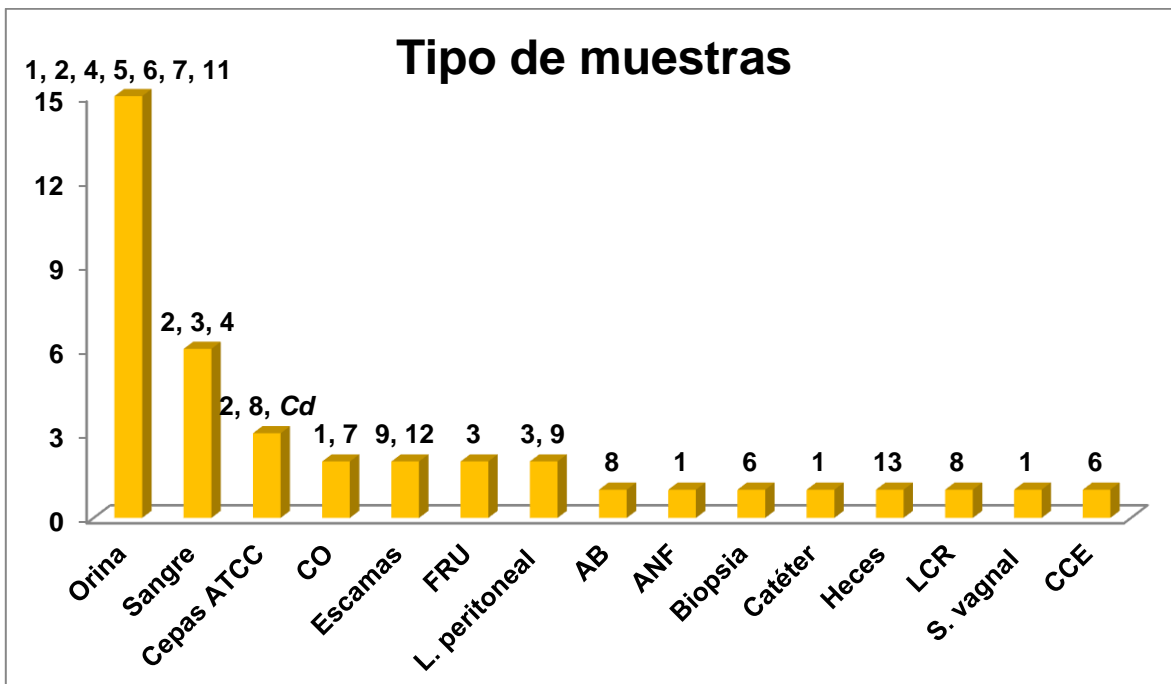
Cúmulos de Blastoconidoas
Esféricas y pseudofilamento



Cryptococcus laurentii



Grafica 1: Porcentajes de muestras seleccionadas y muestras no identificadas (MNI) por las técnicas evaluadas para la tipificación de levaduras.



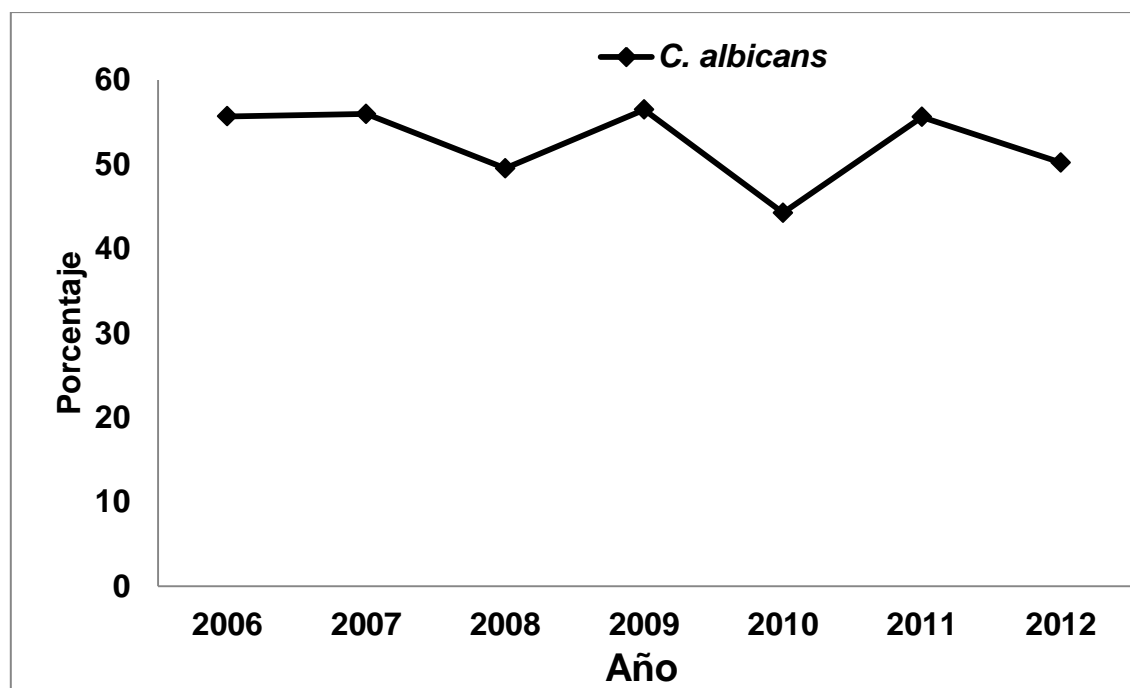
Grafica 2: Tipo de muestras de las cepas problemas empleadas para la comparación de las metodologías.

CCE: Control de calidad externo, L. peritoneal: Líquido peritoneal Cd: *Candida dubliniensis*

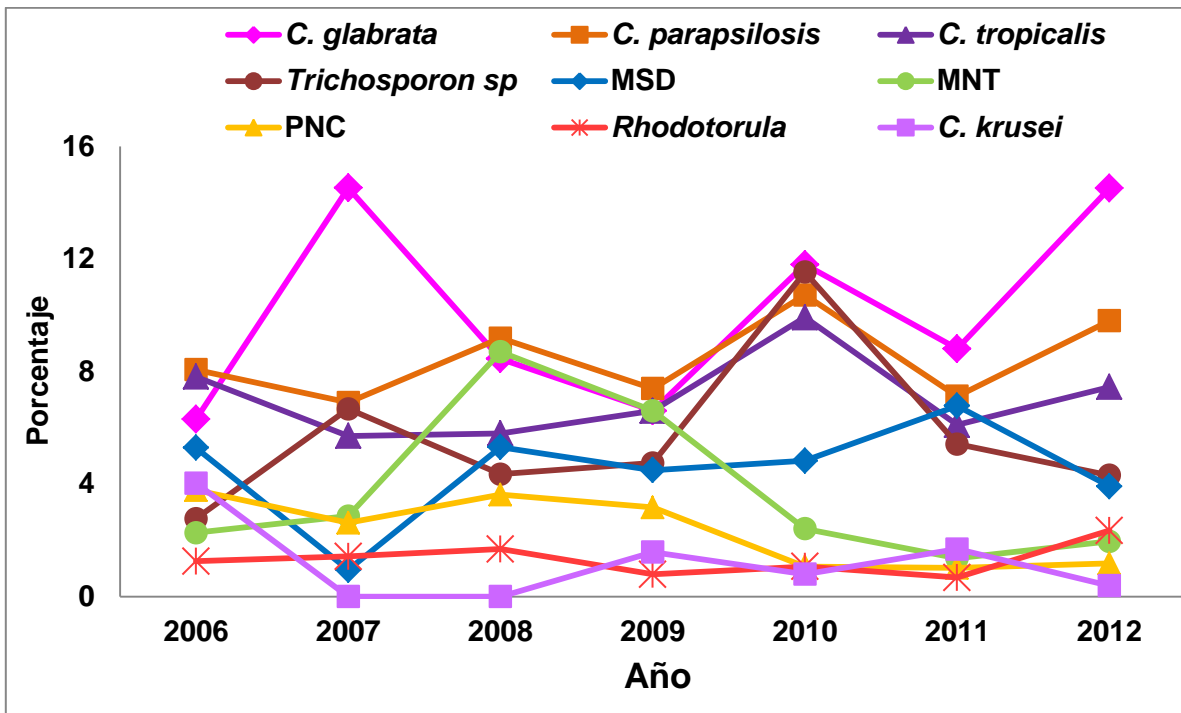
Tabla 6: porcentajes de tipificación, MSD, MNT y PNC del periodo 2006-2012 en el INP

	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
<i>C. albicans</i>	55.67	55.95	49.52	56.46	44.24	55.59	50.20
<i>C. glabrata</i>	6.30	14.52	8.45	6.60	11.80	8.81	14.51
<i>C. parapsilosis</i>	8.06	6.9	9.18	7.39	10.72	7.12	9.80
<i>C. tropicalis</i>	7.81	5.71	5.80	6.60	9.92	6.1	7.45
<i>Trichosporon sp</i>	2.77	6.67	4.35	4.75	11.53	5.42	4.31
MSD	5.29	0.95	5.31	4.49	4.83	6.78	3.92
MNT	2.27	2.86	8.70	6.60	2.41	1.36	1.96
PNC	3.78	2.62	3.62	3.17	1.07	1.02	1.18
<i>Rhodotorula sp</i>	1.26	1.43	1.69	0.79	1.07	0.68	2.35
<i>C. kruseii</i>	4.03	0.00	0.00	1.58	0.80	1.69	0.39
<i>C. guilliermondii</i>	1.51	0.48	0.00	0.00	0.80	1.69	0.39
<i>Candida sp</i>	0.25	1.67	2.90	0.26	0.81	1.02	1.97
<i>Cryptococcus sp</i>	0.75	0	0.24	0.79	0.00	0.34	0.39
Otros generos	0.25	0.24	0.24	0.52	0.00	2.38	1.18

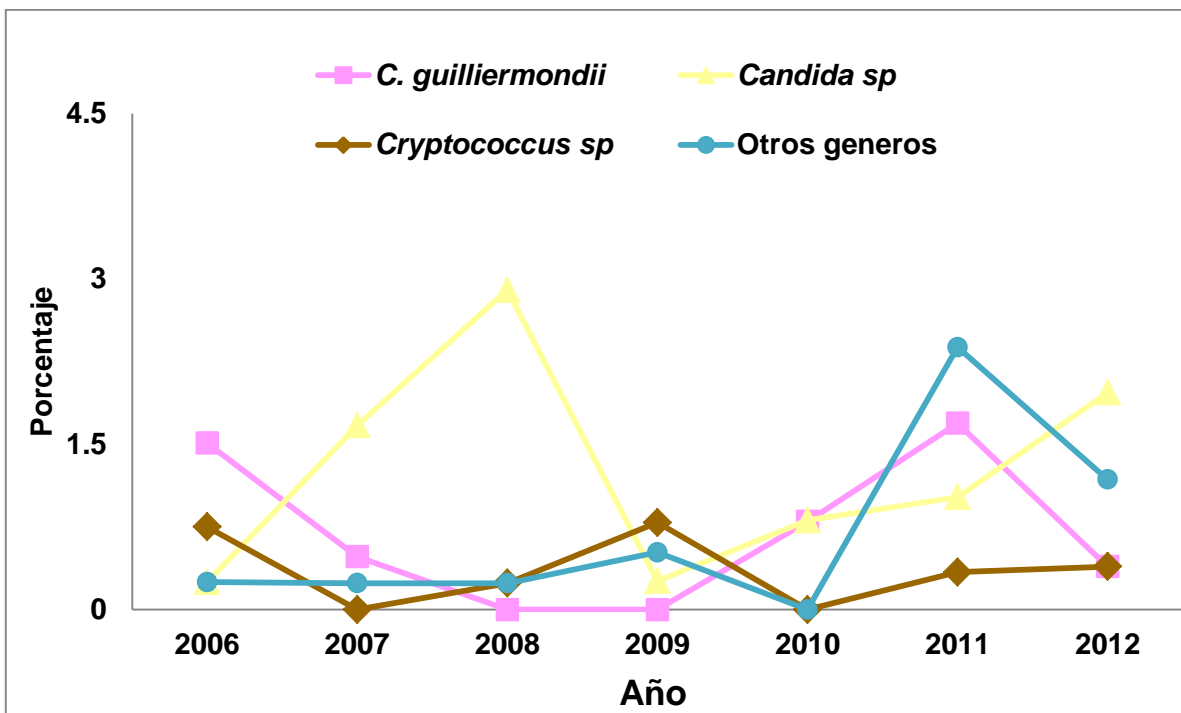
MSD: muestra sin desarrollo (examen directo positivo) MNT: muestra no tipificada PNC: producto no conforme (muestras que no cumplían con las condiciones mínimas para un estudio micológico: cantidad, hora de recepción respecto a hora de toma, condiciones de transporte, tratamiento previo, higiene etc.)



Grafica 3: porcentaje de tipificación de *C. albicans* del periodo 2006-2012 en el INP.



Grafica 4: porcentaje de tipificación de *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *Trichosporon sp.*, *Rhodotorula sp.*, *C. krusei*, MSD, MNT y PNC del periodo 2006-2012 en el INP.

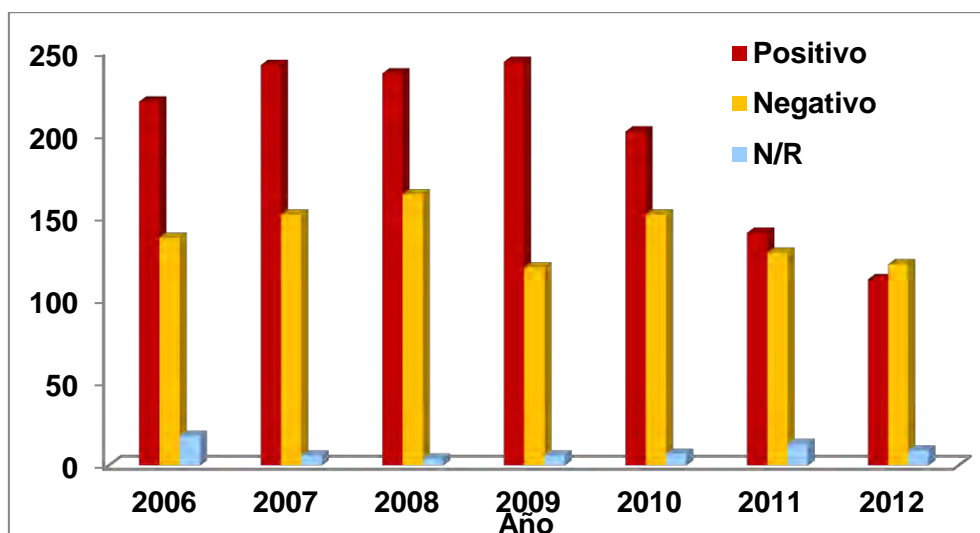


Grafica 5: porcentaje de tipificación de *C. guilliermondii*, *Candida sp*, *Cryptococcus sp.* y otros generos del periodo 2006-2012 en el INP.

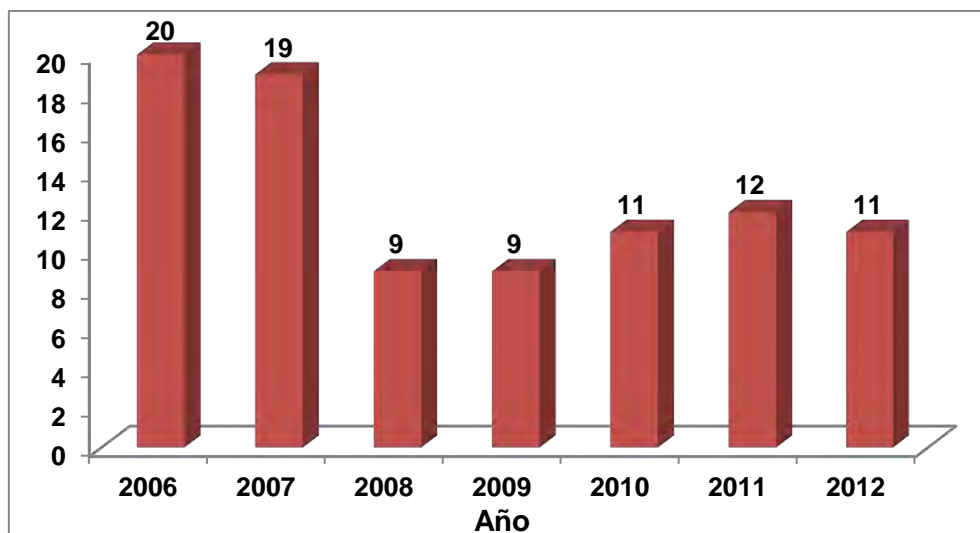
Tabla 7: porcentaje y numero de muestras con ED positivo, negativo y N/R, y micosis mixtas durante el periodo 2006-2012 en el INP.

Año	Total	Positivo	Negativo	N/R	% positivo	% Negativo	% N/R	Micosis mixtas	
								Número	%
2006	397	220	138	18	58.51	36.70	4.79	20	5.32
2007	420	242	152	6	64.36	40.43	1.60	19	4.75
2008	414	237	164	4	63.03	43.62	1.06	9	2.22
2009	379	244	120	6	64.89	31.91	1.60	9	2.43
2010	373	202	152	7	53.72	40.43	1.86	11	3.05
2011	295	141	129	13	37.50	34.31	3.46	12	4.24
2012	255	113	122	9	30.05	32.45	2.39	11	4.51

N/R: no realizado



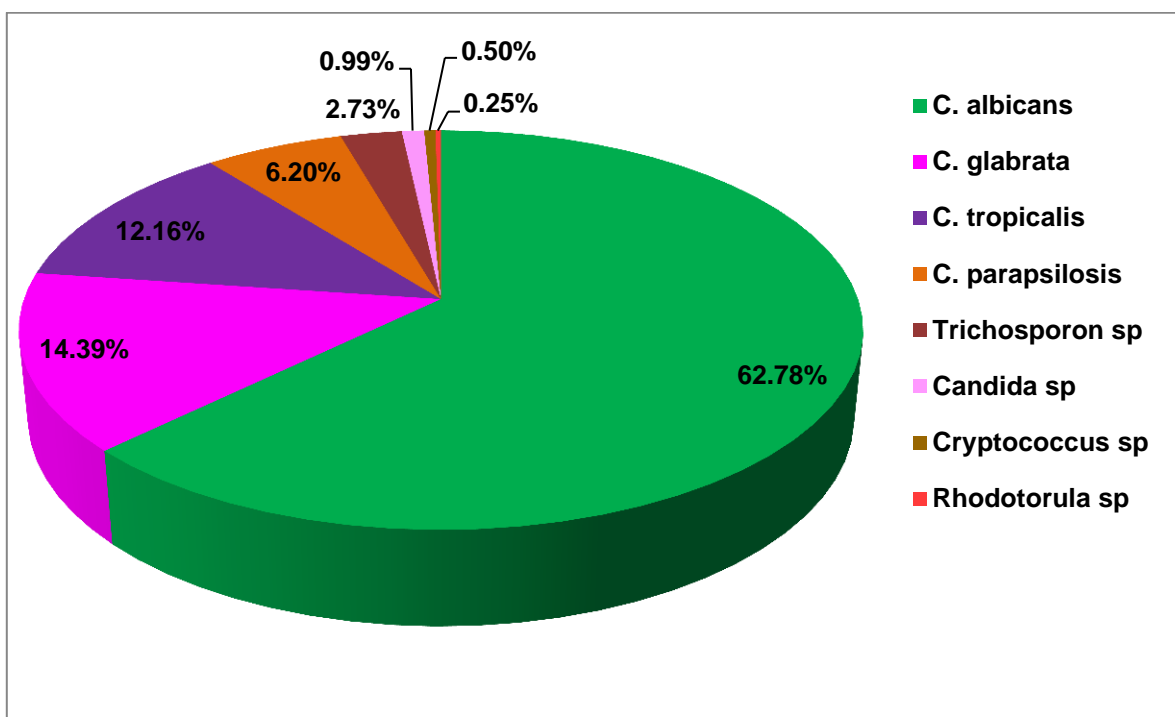
Grafica 6: Número de muestras con ED positivo, negativo y N/R por año del periodo 2006 al 2012 en el INP.



Grafica 7: Número de micosis mixtas por levaduras durante el periodo 2006-2012

Tabla 8: Tipificación de muestras enviadas por el Laboratorio de Bacteriología durante el periodo de sep-12 a sep-13

	Total	%
<i>C. albicans</i>	253	62.78
<i>C. glabrata</i>	58	14.39
<i>C. tropicalis</i>	49	12.16
<i>C. parapsilosis</i>	25	6.20
<i>Trichosporon sp</i>	11	2.73
<i>Candida sp</i>	4	0.99
<i>Cryptococcus sp</i>	2	0.50
<i>Rhodotorula sp</i>	1	0.25



Grafica 8: Porcentajes tipificación de muestras enviadas por el Laboratorio de Bacteriología sep-12 a sep-13.

Análisis de resultados y Discusión

Al realizar la selección de cepas para el estudio de identificación, el principal criterio a tomar en cuenta fue la observación de pseudofilamento y blastoconidias en el examen directo, un resultado considerado como positivo, nos permitiría asegurar la presencia de una infección micótica causada por levaduras; esta observación representa una valiosa información durante el proceso de diagnóstico. En la tabla 5 se puede observar que de las cepas seleccionadas para el estudio son 24 muestras que presentaron un examen directo positivo, 3 cepas ATCC y una cepa de control de calidad externo, además se incluyeron 12 muestras con examen directo negativo, que presentaron desarrollo en el cultivo en medio de Sabouraud.

El origen de las muestras es diverso, así como la toma de muestra, la cantidad de la misma, las condiciones de almacenamiento y transporte al laboratorio, por lo que es importante controlar todos los factores externos que pudiesen alterar los resultados de tipificación.

El examen directo a pesar de su sencillez es de vital importancia realizarlo a cada una de las muestras que lleguen al laboratorio, desafortunadamente en ocasiones no cumplen con los criterios necesarios para un adecuado estudio micológico por lo que es importante sugerir al médico cumpla una serie de tres de las muestras para así brindar un mejor servicio, la cantidad de muestra, la hora de toma, las condiciones de almacenamiento y transporte al laboratorio influyen directamente en los resultados del examen directo y en el cultivo.

La toma de muestra es otro factor que puede afectar los resultados de examen directo e inclusive del cultivo, por lo que en muestras de escamas es importante realizar la recolección de muestra de zonas eritematosas, con edema, o alguna característica que nos dé el indicio de la presencia de infección, en el caso de las expectoraciones o aspirados se deben recolectar de la zona de afección evitando la

contaminación o la presencia de sangre, lo que implicaría daño al paciente, siendo necesario contar con la cantidad adecuada de muestra para así poder elegir la más representativa para un estudio micológico. Las muestras que pueden ser tomadas por el personal de laboratorio son muy pocas por lo que es importante orientar al clínico para obtener una muestra adecuada.

CHROMagar

La presencia de células levaduriformes e inclusive pseudofilamentos confirmó el crecimiento de levaduras, fueron resembradas a CHROMagar Candida. En la tabla 5 se observa los detalles del crecimiento de las levaduras en CHROMagar Candida.

Para las levaduras identificadas del género *Candida*; *C. kruseii*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis*, desarrollaron de acuerdo a las características reportadas por el fabricante (diagrama 7), sin embargo de acuerdo a lo observado en *C. albicans* aunque el fabricante indica que el color de las colonias debe presentarse como verde claro, estas desarrollaron en diversas tonalidades de verde, pudiéndose confundir con *C. dubliniensis* que está reportada con crecimiento de colonias verde oscuro, lo mismo se presentó en las colonias de *C. tropicalis* que desarrollaron de color blanco con halo púrpura, que pueden ser consideradas como *Candida* sp., en *C. famata* que desarrollo colonias lilas en lugar de las reportadas como blanco o beige.¹⁹

A pesar de ser un medio para el estudio del género *Candida* permite el desarrollo de otros géneros siendo característico para *Trichosporon* sp. las cuales desarrollan de un color verde intenso o verde azulado rugosas y secas, se ha observado que con el paso del tiempo las levaduras van perdiendo la coloración característica en medios cromogénicos cabe destacar que otra factor son las condiciones en las cuales se encuentra la cepas, en pacientes con un tratamiento profiláctico o específico las cepas van perdiendo actividad enzimática y por ende su coloración característica por

ejemplo *C. tropicalis* de un color azul metálico comienza a tomar una coloración púrpura, después morada a lila e inclusive blancas.

Agar harina de maíz + Tween 80 al 1 %

El estudio de la morfología microscópica de las levaduras es un aspecto relevante que nos puede permitir la identificación presuntiva de algunos géneros o respaldar el resultado de tipificación; el empleo de agar harina de maíz + Tween 80 al 1 %, es una técnica en la cual se debe de tener cuidado debido a las características del medio, es una herramienta de gran utilidad que nos permite “identificar” adecuadamente a *C. albicans* que produce pseudofilamento, clamidoconidias y blastoconidias, a pesar de este desarrollo característico se puede presentar alguna dificultad debido a que la producción de clamidoconidias puede ser muy escasa, *C. glabrata* se observa cúmulos definidos de blastoconidias de tamaño pequeño, de acuerdo a lo observado *Cryptococcus sp* presenta blastoconidias esféricas de diferente tamaño, en algunos casos puede formar pseudofilamento pero a pesar de esto microscópicamente es difícil diferenciarla de *Rhodotorula sp* que de igual manera presenta blastoconidias esféricas, *C. parapsilosis* forma cúmulos de blastoconidias y pseudofilamento dando un aspecto aracnoide o satelital (diagrama 7), en general requiere de experiencia para su caracterización y de un adecuado tiempo de incubación debido a que no siempre se observan sus estructuras características.

Recordando que un punto crítico en el estudio de la micromorfología con agar harina de maíz + Tween 80 está desde su preparación, es importante adicionar el Tween 80 después de esterilizar debido a que comienza a descomponerse a altas temperaturas, trayendo como resultado una producción nula o escasas de clamidoconidias estructuras producidas por *C. albicans* y *C. dubliniensis*. La morfología característica de cada una de las especies se aprecian mejor cuando se emplean cultivos jóvenes y en algunos casos es más apreciable a las 72 horas, *C.*

kruseii presenta una mejor morfología a las 48 horas, a pesar de todo esta técnica presenta limitantes debido a que en ocasiones no es posible observar las estructuras y morfología característica debido a un desarrollo excesivo, escasa producción de clamidoconidias o formación de filamento verdadero.

Pruebas bioquímicas

Los perfiles bioquímicos son una herramienta que nos permiten la identificación de levaduras debido a que son únicos para cada organismo, los sistemas de pruebas bioquímicas empleados tienen el fundamento de ser un auxonograma nos brindan patrones que nos permitieron identificar a las cepas seleccionadas. La mayoría de pruebas se evidenciaban por un indicador que por cambios de pH nos permitía determinar la asimilación de un sustrato en específico (MicroScan y RapID) o como el caso de ID 32 el desarrollo del microorganismo nos indicaba la utilización de los sustratos. Las pruebas adicionales como es el caso de actividad enzimática son de gran utilidad debido a que en algunos casos nos permiten darnos idea de la capacidad patogénica de la cepa en estudio.

El proceso de tipificación abarca una serie de pasos; desde la observación de levaduras en el primer cultivo y el aislamiento en medio cromogénico para el aislamiento y obtención de colonias puras que nos permitirán emplear algún tipo de pruebas bioquímicas que acorten el tiempo de tipificación, cada sistema nos brindará ventajas pero como en todo presentará limitantes por lo que es importante ser cuidadosos y trabajar en condiciones óptimas.

En la gráfica 1 se puede observar la correlación que presentaron entre los tres diferentes kits comparados en los resultados de tipificación obtenidos, en algunos casos se observó una variación debido a que no emplean la misma nomenclatura como es el caso de *Trichosporon sp.* o de *Rhodotorula rubra* y *Rhodotorula mucilaginosa* que representan la misma especie, en general son muchos los factores

que pueden modificar un resultado, es importante ser cuidadosos en el proceso de identificación ya que una adecuada caracterización es de vital importancia para el paciente.

MricroScan®

Es una herramienta de gran utilidad con ciertas ventajas, lamentablemente presenta algunas desventajas (Tabla 9), entre las que destacan: la dificultad para detectar la asimilación de algunos sustratos como es el caso de histidina o sacarosa, y la dificultad para diferenciar *Trichosporon sp* de *Cryptococcus sp*. a pesar de estos aspectos es de fácil manejo, nos brinda resultados en cuatro horas, tiene una gran reproducibilidad, nos permite identificar casos aislados de cepas poco comunes como *Prototheca sp*. (alga que presenta un comportamiento al de las levaduras) y algunas especies del género *Cryptococcus sp*. Sus principales desventajas con la experiencia del analista se va reduciendo la incidencia de los inconvenientes mencionados en la Tabla 9, gracias a una mejora en el proceso de inoculación de cada prueba bioquímica, mejorando los resultados y disminuyendo los costos, a pesar de ser un método semiautomatizado al realizar la lectura se debe tener cuidado ya que al poseer dos fundamentos (colorimétrico y turbidométrico) puede ser que requiera de la interpretación visual del operador para mejorar los resultados debido a que en ocasiones se puede observar un precipitado que demuestre la utilización del sustrato como es en el caso de la asimilación de aminoácidos o en el caso de la metabolización de glucósidos en donde la reacción que se lleva a cabo es la liberación de orto o paranitrofenol compuesto que presenta una coloración amarilla a pH alcalino la cuál suele ser en ocasiones muy débil y difícil de ser detectada por el equipo de MicroScan autoSCAN4.

Al obtener una identificación con un porcentaje menor al 90% la prueba es invalida y debe repetirse por lo que es necesario revisar la metodología para así cuidar las condiciones de trabajo, tomando en cuenta que en muchos casos el microorganismo

en estudio proviene de muestras biológicas y quizás el microorganismo se encuentren bajo un estrés que limite su desarrollo y los resultados sean inadecuados a causa de la pérdida de actividad enzimática. Recordando que la asimilación de ciertos sustratos son específicos para cada especie permitiendo más rápida su identificación, los patrones pueden ser muy diversos y a pesar de tratarse de cepas que presentan asimilación de sustratos parecidos el resultado será definido por el consumo de dos o más sustratos que sean característicos de una sola especie.

Debido a que un determinado número de biotipo le puede corresponder varios organismos como es el caso de *Trichosporon beigellii*, esta circunstancia puede dificultar su interpretación por lo que en algunas ocasiones será de vital importancia recurrir a pruebas adicionales como es la fermentación de sustratos o inclusive se deberá realizar su caracterización microscópico para sustentar y asegurarnos de que el resultados es correcto.

Se observó que presenta dificultad para diferenciar a *C. famata* de *C. guilliermondii* esto debido a la estrecha relación que presentan y por ser muy pocas las pruebas bioquímicas que nos permiten su diferenciación como es el caso de la asimilación de GGLY y GLAR principalmente asimilados por *C. guilliermondii*, una adecuada turbidez del medio de inculo es de vital importancia debido a esto será una de las principales limitantes en aquellas cepas que presenten una asimilación de sustratos muy parecida.

Tabla 9: análisis de MicroScan Yeast Plus System®.

Ventajas	Desventajas
Resultados en 4 horas.	Requiere de insumos adicionales para su lectura.
Reproducibilidad.	Dificultad para dar indicio de la metabolización de IDX y en ocasiones HIS
Técnica semiautomática con 2 principios colorimétrico y turbidez	Tiene problemas para la tipificación del genero <i>Cryptococcus sp</i> ; debido a que los confunde con <i>Trichosporon beigellii</i> , este efecto se observa cuando el cultivo para la tipificación tiene 24 horas de incubación.
Fácil manejo: inoculación, incubación, interpretación.	Dificultad para diferenciar genero por ejemplo <i>C. famata</i> y <i>C. parapsilosis</i> a pesar de que los patrones son diferentes
Permite la identificación de	Requiere de pruebas adicionales para diferenciar <i>C. albicans</i> de <i>C.</i>

casos aislados (cepas poco frecuentes)	<i>dublinskiensis</i> .
Puede realizarse lectura visual o automática	Al revelar las pacas se tiene 30 min para realizar la lectura antes de observar algún cambio en el patrón.
Brinda un fácil manejo de información y entrega de resultados	Sólo identifica a <i>Trichosporon beigellii</i> complejo que en la actualidad se conoce como <i>Trichosporon mucoide</i> principal especie de importancia clínica.
Adecuada caducidad.	Algunos lotes presentan problemas con el pozo SUCC2 presentando una coloración pálida.

RapID®

Es una herramienta con ciertas ventajas y desventajas (Tabla 10), entre las que destacan es la dificultad para detectar la asimilación de algunos sustratos como es el caso de *p*-nitrofenil fosfato o *p*-nitrofenil fosforilcolina, y el problema de diferenciar *Trichosporon sp.* debido a que la asimilación de glucosa no concuerda con lo reportado en la literatura y principalmente que el proveedor (inserto) para realizar la prueba indica el empleo ASD medio rico en glucosa, a pesar de estos aspectos es de fácil manejo, nos brinda resultados en cuatro horas. Sus principales desventajas se observan desde su presentación debido a que el manejo se ve limitado trayendo como consecuencia una dificultad al momento de realizar el llenado de los pocillos debido a un bloqueo de los canales de inóculo y principalmente esta condición puede llegar a causar una contaminación entre pozos produciendo una lectura errónea (Figura 4), los valores de asimilación de algunos sustratos para cada cepa dificultan su interpretación ya que el porcentaje reportado suele ser poco representativo debido a que no nos permite asegurar si asimila o no el sustrato, es una técnica que presenta los mismos principios de reacción de MicroScan® (asimilación de aminoácidos y de glucósidos) por lo que al leer las bioquímicas presenta las mismas dificultades. A pesar de que la inoculación de cada una de las prueba se realizarse en un menor tiempo no es una ventaja representativa debido a que sus principales desventajas pueden llegar a producir un mayor costo.

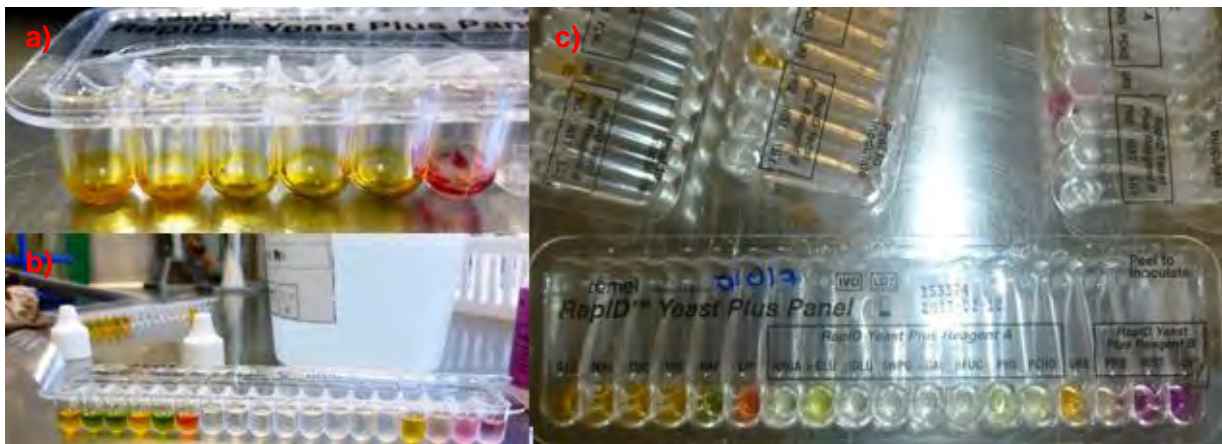


Figura 4: a) placa mal sellada, b) placa en la cual se puede observar como el medio de inoculo sublimo c) placas de RapID inoculadas.

Tabla 10: análisis de RapID Yeast Plus System®.

Ventajas	Desventajas
Diseño de placa más practico; menor tiempo de inoculación y fácil manejo.	Algunas placas vienen mal selladas lo cual puede producir una probable contaminación debido a que se observaron patrones inconsistentes, dejando en duda la interpretación al realizar la lectura (3 muestras no fueron identificadas por este aspecto).
	La plaquita está diseñada para ser inoculada únicamente de la forma indicada en el inserto limitando el empleo de material como puntas debido al diseño del agua de inoculo, causando un mayor error en las placas mal selladas.
	La placa protectora se pega en la superficie de los canales causando que el inoculo se distribuya en los pocillos adyacentes produciendo un mal llenado en por lo menos 3 pozos por bloqueo
	El medio de suspensión presento un precipitado negro en el 20% de cada kit, no se observó algún inconveniente pero puede poner en duda los resultados por alguna interferencia.
	No maneja un intervalo de temperatura adecuado en el cual sea viable incubar las placas; pero las cepas que desarrollan lentamente a 30°C presentan un mejor resultado cuando se incuban a temperatura ambiente, el mismo inconveniente se presenta al momento de incubar las cepas para realizar la tipificación.
Resultados en 4 horas.	El empleo de la tarjeta de inoculación dificulta alcanzar la turbidez de la suspensión debido a que es subjetivo de cada persona que prepare la suspensión.
	Los porcentajes de positividad de cada prueba en algunos casos son inadecuados debido a que las pruebas pueden ser consideradas positiva o negativa causando dudas en la identificación.
Una caducidad adecuada.	Sólo identifica a <i>Trichosporon beigellii</i> complejo que en la actualidad se conoce como <i>Trichosporon mucoide</i> principal especie de importancia clínica.
	Requiere de pruebas adicionales para diferenciar <i>C. albicans</i> de <i>C. dubliniensis</i> .
Menor número de reactivos adicionales.	"El empleo de glucosa por algunas levaduras no coinciden con lo reportado en la literatura y los resultados reportados por otras pruebas

	bioquímicas” debido a que se trata de un auxonograma. El medio de inóculo sublima al incubar las placas, causando probables contaminaciones y un patrón poco claro, además de que en muchos casos se almacena en la tarja de inoculación.
Reproducibilidad.	El tiempo para leer las pruebas es limitado en un minuto como menciona el inserto la coloración cambia drásticamente para una persona poco experta complica la interpretación, en el laboratorio es de poca utilidad debido a que no siempre el mismo personal se encarga de la lectura y el resultado es muy subjetivo.

ID 32 C®

Al igual que todos los sistemáticas de pruebas bioquímicas, presenta ventajas y desventajas (Tabla 11), de las cuales destaca un mayor tiempo de incubación y en ocasiones al asimilar algunos sustratos presenta desarrollo inconsistentes, al realizar la lectura se debe tener cuidado ya que es importante tener un conocimiento y un adecuado criterio para realizar una apropiada interpretación de los resultados debido a variaciones en empleo de alguna de las fuentes de carbono, es de fácil manejo, posee un alto grado de sensibilidad y reproducibilidad, tiene una amplia batería de cepas que puede identificar (63 especies). Es una excelente herramienta para la tipificación de levaduras a pesar de esto su gran variedad de cepas que diferencia es un kit de gran utilidad en el proceso de tipificación.

Tabla 11: análisis de ID 32 C®.

Ventajas	Desventajas
Mayor número de pruebas bioquímica, lo cual nos permite una mejor identificación.	Presentación de los medios de inoculación y semisólido inadecuada ya que dificulta la homogenización de algunas cepas (<i>Rhodotorula sp</i> y <i>Tricosporum sp</i>).
Lectura automática ATB expresión o Mini API aumenente a 63 especies de identificación (requiere de internet).	
Reproducibilidad	No trae interpretación de la prueba de la esculina.
Diferencia ha <i>C. albicans</i> de <i>C. dubliniensis</i> .	
Fácil manejo: inoculación, incubación, interpretación.	
Caducidad adecuada	Periodo de incubación más largo cause que se deshidraten algunos pozos este efecto se observa cuando el kit está próximo a caducar.
Se puede realizar lectura manual fácilmente (la tabla indica de cuando es positiva o negativa o inclusive variable cada resultado).	
Presenta una prueba adicional de la esculina.	No identifica <i>Prothoteca Sp</i> (lectura manual).
Permite la identificación de casos aislados (cepas poco frecuentes)	

En general las pruebas bioquímicas dependen mucho del manejo del personal y de un criterio propio que permita tomar una adecuada decisión, al realizar una prueba bioquímica y al momento de interpretar los resultados finales. Cada género es diferente, cuidando sus condiciones de desarrollo nos permitirá tener un mejor resultado. Cabe destacar que *Trichosporon sp.* es una cepa de difícil manejo debido a que a sus características de desarrollo dificulta su re-suspensión en cualquiera de los medios de inoculación por presentar una consistencia seca y rugosa.

En ciertos casos se ha podido observar que algunas cepas son de difícil identificación debido a que los patrones en ocasiones no son claros principalmente se observa esta situación en *Trichosporon sp.* debido a que en ocasiones algunas bioquímicas no coinciden esta situación puede ser causa de una contaminación, una inadecuada inoculación, corrientes de aire a factores externos de difícil control. Recordando que las cepas a identificar pueden estar sometidas a situaciones desfavorables, esta circunstancias influye en gran medida en las características fisiológicas de las levaduras.

El empleo de una gran diversidad de herramientas para la tipificación de levaduras es de utilidad ya que nos permitirá una identificación más precisa del agente causal del proceso infeccioso, permitiendo al médico tomar una decisión adecuada para dar el mejor tratamiento para el paciente. Las tres técnicas nos proporcionan beneficios pero para un mejor proceso de tipificación lo ideal es el empleo de dos técnicas que nos permita conseguir un mejor resultado, ya que la batería de especies identificadas por cada kit es diferente y un poco limitada.

MicroScan®, de las cepas empleadas se observó dificultad para identificar a *C. famata* presentando un patrón más característico al de *C. parapsilosis*, en general logro identificar a todos los géneros elegidos. Algunos géneros por sus condiciones de desarrollo presentan cierta dificultad para realizar su lectura como el caso de *Prototheca sp.*, sin olvidar que no nos permite la diferenciación de *C. albicans* de *C.*

dublinsiensis. A pesar de lo observado identifico correctamente el 95% de las cepas seleccionadas.

RapID® mostro dificultades para la interpretación de *C. tropicalis* (una de las principales especie de interés clínico) por alguna variación en las pruebas bioquímicas; *T. beigellii* (a partir de 1992 se emplea *T. cutaneum*) en estos dos casos no fue posible asignar algún género, además se identifico una cepa de *Cryptococcus neoformans* como *Cryptococcus albidus*, entre la batería de cepas identificadas no nos permite caracterizar a *C. dublinsiensis*, caracterizo adecuadamente un 90% de las cepas y en otras casos presento por lo menos una variación de sustrato respecto a lo indicado en el inserto.

ID 32 C® presento dificultades principalmente con la tipificación de *Cryptococcus neoformans* debido a sus condiciones de desarrollo y al ser una cepa sensible a los cambios de temperatura (la refrigeración puede inhibir su desarrollo). La identificación fue del 100% resultados respaldados con los resultados obtenidos con los otros kits y por la micromorfología observada en el agar harina de maíz + tween 80%. La principal diferencia con RapID® y MicroScan® esta con el género *Trichosporon sp.* debido a que identifica 3 especies.

La identificación presuntiva y segura de las levaduras asegura la eliminación de períodos de incubación prolongados y la posterior realización de pruebas adicionales, aportando la ventaja de una reducción del tiempo, manipulación, material y por ello del coste relativo a cada identificación. Teniendo en cuenta la amplia gama de sistemas de identificación de levaduras introducidas por las distintas compañías comerciales es de gran interés conocer su utilidad, ventajas y desventajas a la hora de elegir el sistema más idóneo en función de sus características y necesidades.

Estadística

En el análisis retrospectivo de la identificación de levaduras del periodo 2006 al 2012 en el laboratorio de micología del INP (Tabla 6), en las gráficas 3, 4 y 5 se puede observar evidentes cambios por año en los porcentajes de tipificación obtenidos para las principales especies de interés médico y el surgimiento de nuevos géneros emergentes como son *Trichosporon sp.* y *Rhodotorula sp.*, diversos factores internos y externos pueden interferir con el desarrollo del microorganismo en estudio como es el caso de las levaduras, destacan con un gran peso: cumplimiento de una serie de tres, calidad de la muestra, condiciones de incubación principalmente.

Condiciones de incubación: para lograr obtener un óptimo desarrollo en cada especie puede variar drásticamente debido a sus condiciones de desarrollo, al comenzar el proceso de tipificación es importante no quedarnos con la idea de no crece, en la Tabla 6 y la Gráfica 4 se puede observar que una importante cantidad de las muestras con examen directo positivo no presentan desarrollo después de un mes de incubación a 28° C, en ocasiones algunos géneros necesitan un periodo de desarrollo mayor o inclusive se ve favorecido a una temperatura que puede fluctuar entre 25 a 37° C o TA (18 a 25° C) por lo que sería importante variar este parámetro para así determinar si el microorganismo no desarrolla en estos rangos de temperatura, o como en el caso de *Malassezia sp.* la cual requiere de medios enriquecidos con ácidos grasos para su óptimo desarrollo, recordando que su temperatura óptima generalmente es a los 32° C presentando un escaso o nulo desarrollo a 28° C.

En la Grafica 4 se puede observar una tendencia en los porcentajes de tipificación obtenidos, nuevas especies están adquiriendo gran importancia como agentes causales de procesos infecciosos con una disminución apreciable de *C. albicans*, dato de gran relevancia debido a la dificultad de respuesta a los tratamientos de los medicamentos del cuadro básico, teniendo un gran impacto infecciones producidas

por *C. glabrata* seguida y superada en algunos casos por *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y sin olvidar a *T. beigeli*, por lo que es importante realizar una adecuada identificación en el menor tiempo posible, debido a que las condiciones del paciente también son un factor que influyen en el desarrollo de una micosis, como son: inmunosupresión, trasplantes, el empleo de tratamiento prolongados, pacientes con leucemia entre otras condiciones. A pesar de que algunos géneros forman parte de la microbiota normal son comensales y es importante dar un tratamiento adecuado en tiempo y forma para favorecer su recuperación por lo que además de identificar correctamente al agente causal es fundamental realizar pruebas de sensibilidad para poder brindar un mejor resultado.

Hay una gran variedad de factores que pueden interferir en el proceso de tipificación de levadura, durante el periodo del 2006-2012 (Tabla 7) se puede observar en la Gráfica 6 que el número de exámenes directos positivos es superior al número de exámenes directos negativos condición que se invierte en año 2012, diversos factores han ido cambiando esta proporción entre los que se puede destacar; higiene, calidad de la muestra, el empleo de tratamiento profilácticos (los diversos servicios del INP cuentan con un esquema de tratamiento antifúngico de primer elección en lo que se lleva a cabo el proceso de tipificación) el cual en ocasiones es de vital importancia por la sensibilidad de algunas cepas.

Un punto relevante son las micosis mixtas (Tabla 7 y Grafica 7), a pesar de presentarse en un porcentaje del 2 al 5 %, es un valor importante debido a que en este tipo de infecciones el tratamiento en ocasiones será necesario cambiarlo debido a la resistencia que pueda presentar alguna de las cepas causantes de la enfermedad micótica o inclusive requerirá el empleo de dos antimicóticos, es importante mencionar que en muchos casos se ha observado que durante el transcurso del tiempo en el medio cromogénico desarrolla otro tipo de colonias dificultando determinar si en realidad se trata de una infección mixta o simplemente se trate de alguna contaminación, por lo que es importante monitorear

periódicamente los cultivos para tomar una adecuada decisión y brindar un mejor servicio, debido a que en algunos casos la temperatura óptima de desarrollo se encuentra entre 18 y 25° C (TA).

A partir del 24 de septiembre del 2012 todas las muestras del laboratorio de Bacteriología con un desarrollo de levaduras fueron enviadas al laboratorio de Parasitología y Micología para ser tipificadas, esta circunstancia es de gran relevancia debido la gran cantidad de muestra recibidas (Tabla 8) en la Gráfica 8 se puede observar los porcentajes obtenidos, a pesar del impacto que tiene estos resultados hay una gran cantidad de datos que se desconocen, como es la calidad de la muestra, hora de toma y en ocasiones la procedencia de la muestra y con mayor importancia los resultados obtenidos en el examen directo, entre otras medidas, a pesar de que en el laboratorio de Bacteriología se trabaja en óptimas condiciones cumpliendo un control de calidad interno son medidas que aún se tienen que controlar debido a la influencia que tienen durante el proceso de tipificación de levaduras.

Conclusiones

- CHROMagar Candida® es una gran herramienta que nos facilita detectar infecciones mixtas, la identificación presuntiva de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. kruseii*, *Trichosporon sp.* Tiene una gran importancia en el proceso de diagnóstico clínico ya que permite la reducción de costos, debido al gran número de muestras clínicas y el alto porcentaje de infecciones causadas por *C. albicans* por año del 40 al 60 por ciento de micosis producidas por levaduras, haciendo imposible el empleo de una prueba bioquímica.
- Existen un gran número de pruebas bioquímicas que nos permiten llegar a la caracterización de un microorganismo dado, sin embargo no siempre se obtendrá un 100% de eficacia en la tipificación de especies, por ello es de vital importancia contar con técnicas de fácil manejo, económicas, veraces y de calidad para garantizar un mejor servicio, para un resultado rápido es adecuado el empleo de **MicroScan®** aunque ID32 C® posee una mayor eficacia y precisión.
- El proceso de tipificación requiere de varias herramientas iniciando con un medio cromogénico que nos permite la obtención de colonias puras y la diferenciación de acuerdo a su morfología colonial, hasta el empleo de sistemas de pruebas bioquímicas, desafortunadamente en muchos casos cuando exista duda será necesario el empleo de dos técnicas que nos permitan colaborar la identificación del agente causal, como es el caso de MicroScan® e ID 32® que en conjunto permiten conseguir excelentes resultados, los kit de pruebas bioquímicas nos brindan ventajas que los hacen una óptima elección, pero la mejor opción será aquella que tenga un menor costo y brinde un mayor beneficio para la realización del diagnóstico.

- La tipificación de las 40 cepas del proyecto fue de un 100% con el kit ID 32® (recordando que para la tipificación de *Prototheca wickerhamii* se confirmó con examen directo y se empleó la tabla de ID 20®), para MicroScan® fue del 95%, mientras que para RapID® fue del 90%.
- El control de calidad es un punto crítico debido a que nos permite demostrar la eficacia y calidad de las pruebas bioquímicas empleadas para la identificación de levaduras, este proceso nos permite asegurar que las condiciones de trabajo son óptimas y adecuadas, debido a que es un proceso en cadena que nos permite evaluar cada etapa del proceso de tipificación.
- En general, los caracteres bioquímicos de las levaduras son considerados como elementos taxonómicos de valor, si bien no del todo definitivos, en algunos casos es importante implementar pruebas adicionales para obtener un óptimo resultado, es importante contar con pruebas que nos permitan un diagnóstico presuntivo o definitivo, sin dejar de lado la importancia de las condiciones de desarrollo de cada género factor limitante en el proceso de tipificación, como lo es la temperatura existen cepas que desarrollan a temperatura ambiente o a 28° C; **Cepas que crecen a 28 °C:** *Cryptococcus neoformans***, *Cryptococcus humicola*, *Cryptococcus albidus*, *Candida parapsilopsis***, *Candida famata*** y *Candida dubliniensis*** (**Desarrollan lentamente a 37 °C), **Cepas que crecen a temperatura ambiente:** *Rhodotorula sp*, *Prototheca sp* y *Candida lipolytica*.
- Los porcentajes de tipificación en promedio son: *C. albicans* 52.52%, *C. glabrata* 10.14%, *C. parapsilopsis* 8.45%, *C. tropicalis* 7.06%, *Trichosporon sp.* 5.69%, MSD 4.51%, MNT 3.74%, PNC 2.35%, *Rhodotorula sp.* 1.32% y *C. kruseii* 1.21%.

- La calidad de la muestra, cantidad, transporte y almacenamiento, hora de toma, temperatura de incubación, medios de cultivo, tratamiento profiláctico, son factores que interfieren en el desarrollo de las levaduras.
- Los porcentajes de tipificación para las muestras enviadas por el laboratorio de bacteriología son: *C. albicans* 62.78%, *C. glabrata* 14.39%, *C. tropicalis* 12.16%, *C. parapsilosis* 6.20% y *Trichosporon sp* 2.73%.
- Cada laboratorio de acuerdo al tipo de paciente, debe de realizar un conjunto de pruebas acorde a su nivel de acción que le permitan sustentar sus resultados. El empleo de pruebas adicionales son de vital importancia debido a que nos permitirá realizar una mejor tipificación. Cuando se decide incorporar una nueva metodología es importante evaluar su capacidad para tipificar los microorganismos deseados, se debe realizar una comparación entre las técnicas empleadas y la nueva metodología, demostrando en forma experimental que el método cumple sus especificaciones cuando es utilizado por el usuario, buscando demostrar que el método a incorporar presenta un comportamiento similar o superior al utilizado, o que los benéficos respecto al costo favorecerán al laboratorio sin afectar el proceso de tipificación.
- Los kits de pruebas bioquímicas son una herramienta de fácil manejo pero lamentablemente de difícil acceso, los resultados dependen mucho del manejo del personal y de un adecuado criterio que permita tomar una apropiada decisión al momento de realizar una serie de pruebas bioquímica, por lo que es importante minimizar los factores que afectan el proceso de tipificación.
- La introducción de sistemas comerciales para la identificación de levaduras oportunistas con carácter patogénico, ha favorecido mucho la rapidez, eficacia y la facilidad de identificación en el laboratorio de Parasitología y Micología del Instituto Nacional de Pediatría.

Acción de mejora

La tipificación del genero *Malassezia spp* es de vital importancia debido a ser un agente causal de infecciones en el ser humano a pesar de ser un comensal, puede presentar una gran variedad de cuadros clínicos que pueden afectar a la población pediátrica por lo que es importante implementar técnicas que nos permitan su diferenciación, en cambio a la mayoría de las levaduras de interés clínico no poseen la capacidad de fermentar carbohidratos por lo que es necesario demostrar su desarrollo en medios enriquecidos con ácidos grasos.

En el laboratorio una cantidad de muestras clínicas presentan desarrollo en el medio medio Myco/F lytic medio enriquecido con ácidos grasos pero al ser resembradas en agar Sabouraud mas antibiótico no presentan desarrollo lo cual nos podría hacer pensar que se trata de una infección causada por *Malassezia spp.*, es importante implementar pruebas de diagnóstico rápido que nos permitan su recuperación y sobretodo que nos permitan su tipificación, debido a que no presenta una capacidad de fermentar carbohidratos y su desarrollo en agar Sabouraud es escaso o nulo, algunas características que nos permite diferenciar a las siete principales especies de interés clínico se encuentran:

Tabla 12. Características fisiológicas de las especies de Malassezia.

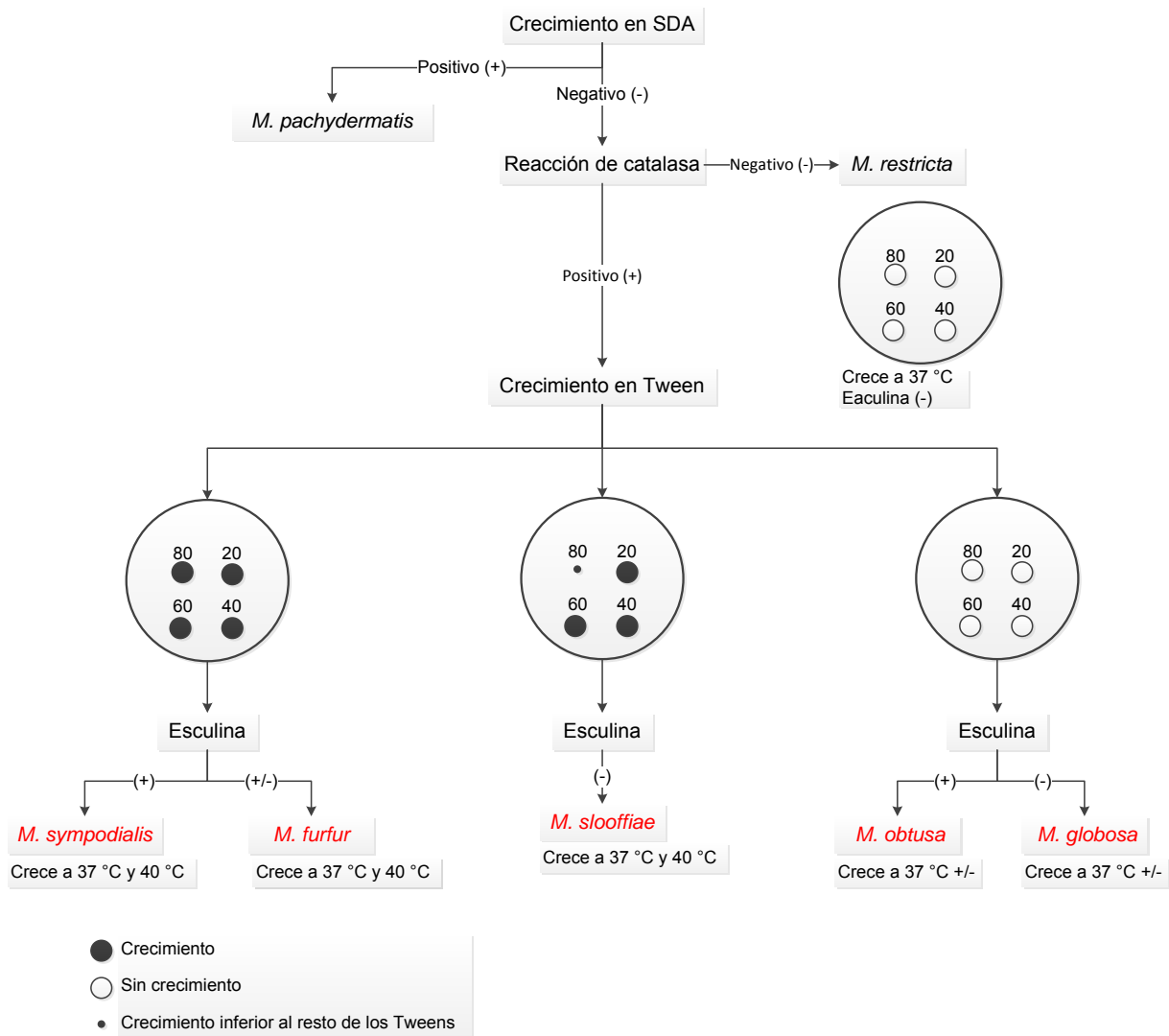
Especie	Catalasa	SDA ^a	mDixon ^b			Tween		
			32 °C	37 °C	40 °C	80 0.1%	40 0.5%	20 10%
<i>M. furfur</i>	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>M. pachydermatis</i>	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>M. sympodialis</i>	+	-	+	+	+	+	+	-
<i>M. globosa</i>	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>M. obtusa</i>	+	-	+	+	-	-	-	-
<i>M. restricta</i>	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>M. slooffiae.</i>	+	-	+	+	+	-	+	+

a: crecimiento en agar Sabouraud sin ningún suplemento lipídico
b: crecimiento en agar Dixon modificado a 32, 37 y 40 °C

Debido a la complejidad y el empleo de diversos recursos es complicado implementar abruptamente todo un proceso de triplicación (Diagrama 8), por lo que

en un inicio podría iniciarse con pruebas sencillas que nos permitan un diagnóstico presuntivo y que a la vez nos permita tener certeza de que se trata de alguna especie del género *Malassezia spp* como es el empleo de agar MycoCel con aceite de olivo debido a la alta tolerancia a la ciclohexamida por esta especie, la implementación de pruebas como es el caso de la ureasa y catalasa, y quizás tratar de demostrar el empleo de Tween 20 y Tween 80 reactivos disponibles en el laboratorio de Micología.

Diagrama 8: Identificación de especies de *Malassezia* (Guillot et al. y Mayser et al.; 1996)



Recomendaciones

Al momento de emplear una placa de pruebas bioquímicas se debe de tener en cuenta y controlar ciertos aspectos que pueden interferir en el resultado, entre los puntos críticos se encuentran:

- Tiempo de incubación de las placas de las pruebas bioquímica.
- Se requiere de un cultivo puro de 24 a 48 horas dependiendo de la temperatura de incubación.
- Fundamental una turbidez igual al estándar.
- Medio de inóculo homogéneo; la presencia de partículas o colonias mal disueltas pueden interferir con los resultados, al igual que la presencia de ceniza o alguna otra contaminante.
- Material limpio y estéril.
- Condiciones óptimas de almacenaje de reactivos y placas de 2-8 °C.
- Atemperar placa y reactivos (RapID® y MricroScan®) antes de su uso.

Rhodotorula sp presenta una coloración característica que en ocasiones no es necesario recurrir a un proceso de tipificación pero actualmente ha presentado un apreciable auge^{52, 53 54}, es una cepa delicada que presenta un desarrollo muy lento se caracteriza por formar colonias de color naranja, la producción de su pigmento dificulta la lectura de las pruebas bioquímicas debido a que difunde en el medio de inóculo, al ser un método colorimétrico interfiere en la interpretación de resultados dejando en duda la asimilación de sustratos debido a que se aprecian tonalidades intermedias o de color naranja.

Anexos

Agar Sabouraud dextrosa modificado por Emmons (SDA)

Formula

Digerido pancreático de caseína	5.00g
Digerido pancreático de tejido animal	5.00g
Dextrosa	40.00g
Agar	15.00g
Agua destilada	1L

Agar harina de maíz + tween 80

Formula

Harina de maíz	40.00g
Agar	20.00g
Tween 80	6.00mL
Agua destilada	1L

CHROMagar Candida Medium

Formula

Cromopectona	10.00g
Mezcla cromogenica	2.00g
Dextrosa	20.00g
Agar	15.00g
Cloranfenicol	500mg
Agua destilada	1L

Tabla 21: Características de crecimiento de hongos levaduriformes en CHROMagar

Cepa	CHROMagar (observaciones)
<i>C. albicans</i>	Presenta colonias de un color característico verde claro convexas cremosas de tamaño un poco varia de 1-3 mm de diámetro; a las 24 horas presenta un crecimiento significativo pero sin presentar su color característico cabe destacar que a las 48 horas algunas cepas presentan una coloración de verde limón (colonias convexas y cremosas de tamaño aproximado de 1-2 mm de diámetro), verde oscuro (colonias convexas puntiformes cremosas aunque de una consistencia seca de tamaño aproximado de 1 mm de diámetro) o verde bandera (colonias convexas y cremosas de tamaño aproximado de 1-2 mm de diámetro), presenta un desarrollo óptimo a 37 o 28 °C, a pesar de su color característico puede observarse colonias con borde de color blanco con centro verde; conforme va envejeciendo la intensidad de la tonalidad del color va disminuyendo llegando a un verde grisáceo.
<i>C.dubliniensis</i>	Presenta colonias de un color similar <i>C. albicans</i> a las 24 horas presenta un crecimiento significativo pero sin presentar su color característico presenta una tonalidad blanca a verde bandera, cabe destacar que a las 48 algunas colonias presentan una coloración verde bandera, colonias convexas puntiformes cremosas aunque tamaño aproximado de 1 mm de diámetro conforme del paso del tiempo va tomando una coloración verde oscuro presenta un mejor desarrollo a 28 °C, a 37°C presenta un crecimiento lento, conforme va envejeciendo la intensidad de la tonalidad del color va disminuyendo llegando a un verde olivo hasta llegar un verde grisáceo tomando finalmente una tonalidad blanca.
<i>C. Tropicalis</i>	Presenta colonias de un color característico azul metálico cabe destacar que alguna cepas presentan una coloración mora o una tonalidad intermedia azul metálico-morado, desde las 24 horas comienza a tomar su color característico aunque en ocasiones se pueden observar colonias de coloración purpura, a las 48 horas presenta colonias azules o moradas de consistencia cremosa convexas de tamaño muy variado de 1-3 mm de diámetro, las colonias que presentan una coloración morada conforme al paso de tiempo toman un color azul aproximadamente a las 72 horas, estas tonalidades pueden observarse indistintamente si la cepa fue incubada a 28 o 37 °C , conforme va envejeciendo la intensidad de la tonalidad del color va disminuyendo hasta llegar a una coloración verde-azulado llegando a una tonalidad grisácea.
<i>C.parapsilosis</i>	Es una levadura muy delicada, es importante que al sembrarse se le tengan ciertas condiciones de incubación a pesar de que puede desarrollar adecuadamente a 37°C en ocasiones debido al tipo de muestra de donde fue aislada presentan un mejor desarrollo a 28 °C su color característico de desarrollo es blanco; forma colonias cremosas convexas con un tamaño de 1-2 mm de diámetro en ocasiones presenta una ligera coloración beige o puede tomar una tonalidad rosa pálido, se observado que cambios de temperaturas de 37°C a 28 °C favorecen su crecimiento este efecto puede deberse a una retro activación enzimática, a pesar del paso del tiempo mantiene su tamaño aunque toma tonalidades desde el beige hasta una amarillo paja, cabe mencionar que en ocasiones es necesario llevar un proceso de reactivación (sembrando 2-3 veces a 28°C) para favorecer su crecimiento a 37°C.
<i>C. famata</i>	Es una levadura u poco delicada a la cual se le devén de tener ciertas condiciones de incubación desarrollar adecuadamente a 28°C su color característico de desarrollo es beige o color crema en algunos casos puede dar una coloración lila; colonias cremosas convexas en ocasiones suele formar

	colonias puntiforme, de un tamaño de 1-2 mm de diámetro, se observado que cambios de temperaturas de 37°C a 28 °C favorecen su crecimiento, conforme al paso del tiempo va aumentando de tamaño conservando una coloración beige (crema) cabe destacar que un cultivo muy viejo presenta colonias de color gris, cabe mencionar que es necesario llevar un proceso de reactivación (sembrando 2-3 veces a 28°C) para favorecer su crecimiento a 37°C, debido a sus características de crecimiento puede confundirse con <i>C.parapsilopsis</i> .
<i>C. albidus</i>	Es una levadura con la cual se debe de tener ciertas condiciones para su desarrollo, presenta un adecuado crecimiento a 28°C sin presentar desarrollo a 37°C su color característico de desarrollo es de rosa a lila; forma colonias cremosas convexas de apresable tamaño de 1-3 mm de diámetro, se ha observado que presenta un mejor desarrollo a TA, al paso del tiempo las colonias conservan sus características pero van tomando un color violeta a morado, cabe mencionar que es necesario llevar una reactivación (sembrando 2-3 veces a 28°C) para así favorecer su crecimiento .
<i>C. glabrata</i>	Presenta un adecuado crecimiento a 37°C su color característico de desarrollo es de rosa a lila; forma colonias cremosas convexas de apresable tamaño de 1-2 mm de diámetro, se ha observado que muestras que han recibido tratamiento presenta un mejor desarrollo a 28 °C o TA y que al realizarle pruebas bioquímicas requieren una reactivación (resembrarse 2 a 3 veces), al paso del tiempo las colonias conservan sus características pero en ocasiones toman una color violeta a morado puede tomando un crecimiento apreciable, debido a sus características puede confundirse con <i>C. albidus</i> a pesar de que la temperatura de crecimiento nos puede dar un indicio para diferenciarlas.
<i>C. guilliermondii</i>	Es una levadura un poco delicada la cual se le devén de tener ciertas condiciones de incubación a pesar de que presenta un adecuadamente desarrollo a 37°C presentan un mejor desarrollo a 28 °C su color de crecimiento es rosa pálido o blancas; colonias cremosas convexas con un tamaño de 1-2 mm de diámetro, a pesar del paso del tiempo mantiene sus características de teniendo un significativo incremento de tamaño aunque toma una coloración rosa.
<i>Trichosporon</i>	Presenta un crecimiento muy característico; a las 48 horas de incubación presenta un desarrollo semejante al de <i>C. albicas</i> colonias verdes obscuro o verde azulado de 1 mm de diámetro, presenta un desarrollo puntiforme con la diferencia de exhibir colonias secas y planas al paso del tiempo va tomando una consistencia más rugosa, después de una semana de crecimiento las colonias presentan una forma de dona su coloración va cambiando tomando una tonalidad verde-azulado hasta tonalidades verde grisáceo, poco a poco van creciendo por todo el medio haciendo difícil su resiembra su crecimiento es tan característico que en Sabouraud presente el mismo crecimiento conforme va envejeciendo va formando grandes pliegues rugosos.
<i>Rhodotorula sp.</i>	Es una levadura de crecimiento muy lento a 28°C desarrolla pobremente su crecimiento optimo se presenta a TA de aproximadamente 25 °C, su color de crecimiento es anaranjado debido a la presencia de β-carotenos que le dan esa tonalidad característica en cualquier medio que se siembre; a las 48 horas presenta colonias cremosas, mucoides, convexas puntiforme de aproximadamente 1 mm de diámetro, al paso del tiempo su coloración va tomando un tonalidad anaranjada más intensa presentando un incremento de tamaño con la tendencia de cubrir todo el medio.
<i>C. lipolytica</i>	Es una levadura delicada a la cual se le devén de tener ciertas condiciones de incubación a pesar de llega a presentar un escaso desarrollo a 28 °C y nulo a 37°C prácticamente se desarrolla a TA forma colonias de color blanco, cremosas, convexas con un tamaño de 1-2 mm de diámetro, al paso del tiempo

	los colonias incremente de tamaño con la tendencia de cubrir el medio toman una coloración amarillo pálido o beige.
<i>C. kefyri</i>	Presenta un adecuado crecimiento a 37°C su color característico de desarrollo es de rosa a lila con un ligero borde blanco; forma colonias cremosas planas (con una ligera elevación) forma colonias de apresable tamaño con bordes un poco irregulares de 1-3 mm de diámetro, al paso del tiempo las colonias conserva algunas de sus características pueden tomar una coloración violeta con un borde blanco apreciable con incremento en el tamaño de colonia, al envejecer demasiado va tomando una coloración blanca, presenta un desarrollo adecuado a 28 °C y debido a sus características de desarrollo puede confundirse con <i>C. glabrata</i> o <i>C. albidus</i> .
<i>C. krusei</i>	Presenta un adecuado crecimiento a 37°C su color característico de desarrollo es de rosa a lila con un borde blanco; forma colonias secas planas de apresable tamaño con bordes irregulares de 1-5 mm de diámetro o más grandes debido a su crecimiento en ocasiones es difícil obtener colonias aisladas, al paso del tiempo las colonias van perdiendo algunas de sus características pueden tomar una coloración violeta con un halo blanco muy pronunciado además de que pueden tomar una consistencia cremosa, al envejecer demasiado toma una textura polvosa tomando una coloración blanca, presenta un desarrollo más lento a 28°C lo cual nos permite una mejor apreciación de su morfología colonial cabe destacar que <i>Saburoaud</i> presenta una textura seca y plana.
<i>C. neoformans</i>	Es una levadura muy delicada, es importante que al sembrarse se le tengan ciertas condiciones de incubación a pesar de que puede desarrollarse adecuadamente a 28 °C o TA su color característico de desarrollo en un inicio es blanco; forma colonias cremosas convexas con un tamaño aproximado de 1 mm de diámetro, se observado que al paso del tiempo comienza a tomar una coloración rosa pálido con incremento importante incremento en su tamaño mantiene su tamaño poco a poco toma tonalidad amarillo paja después de una semana de crecimiento comienza a tomar una coloración café a negro esto puede deberse a la producción de melanina, cabe mencionar que en ocasiones es necesario llevar un proceso de reactivación (sembrando 2-3 veces a 28°C).
<i>Prototheca sp</i>	Es un alga de un crecimiento demasiado lento a la cual se le deben tener una gran cantidad de cuidados al incubarse desde las condiciones de temperatura hasta el periodo de incubación a 28 °C puede tardar hasta una semana en crecer se desarrolla mejor a temperatura ambiente a las 48 h solo se observa crecimiento de color café en la descargar masiva y pequeñas colonias blancas de aparente aspecto cremoso, poco a poco va desarrollándose aumentando de tamaño de 1-2 mm de diámetro manteniendo una coloración blanco conforme va pasando el tiempo toma una coloración amarillo paja de consistencia polvosa crateriforme de bordes irregulares mientras va envejeciendo v tomando una coloración crema, para optimizar su crecimiento es importante llevar un proceso de reactivación a temperatura ambiente.

Bibliografía

1. J. Alejandro Bonifaz, Micología medica básica, tercera edición McGraw Hill, México 2009.
2. Roberto Arenas, Micología medica ilustrada, cuarta edición McGraw Hill, México 2011.
3. Winn, Allen, Janda, Koneman, Procop, Schreckenberger, Woods, Koneman diagnóstico microbiológico, sexta edición, Editorial Medica Panamericana, 2006, p.p. 1167-1173.
4. María José Linares Sicilia Francisco Solís Cuesta, Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica capítulo 11 identificación de levaduras, Revista Iberoamericana de Micología, Asociación Española de Micología, 2007.
5. Tesis Cristina Espinoza Sierra, Universidad de Murcia departamento de Medicina Interna, Candidemias nosocomiales: Patrones de cambio clínicos-epidemiológicos, factores pronostico, e influencia del tratamiento antifúngico precoz en su evolución, 2008.
6. Mireya Mendoza, Importancia de la identificación de levaduras, Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología 2005; 25: 15-23.
7. Carmen Castro Méndez y Estrella Martín Mazuelos, Diagnóstico de la infección fúngica por levaduras del género *Candida*: *Candida dubliniensis*, Servicio de Microbiología y Parasitología Clínica. Hospital Universitario de Valme, Sevilla.
8. Tesis Maria del Toro Crespo, Caracterización de *Candida parapsilopsis* complex en el área hospitalaria del H. U Virgen del Rocío en el periodo 2003-2009 Sevilla 2011.
9. Estrella Martín-Mazuelos, Anastasio Valverde-Conde, Criptococosis diagnóstico microbiológico y estudio de la sensibilidad in vitro, Servicio de Microbiología. Hospital Universitario de Valme. Sevilla 2003.

10. Tesis Cárdenes Perera Carmen Delia, Levaduras del género *Candida* de procedencia clínica. Evaluación de métodos de identificación, Universidad de la Laguna España, 2000.
11. Tesis Doctoral Eidi V. Alvarado Ramírez. Estudios de los factores de patogenicidad de *Cryptococcus gattii*. Universidad Autónoma de Barcelona, 2008.
12. M. Loreto Gardeweg M. Laboratorio Linsan, Manual de microdiagnostico parte dos diagnóstico de hongos y levaduras, tercera edición, Chile 2012.
13. C. López, L. Giro, L. Ramos, S. Ramandán, L. Bulacio, Comparación de diferentes métodos para la identificación de especies del género *Candida*, Revista Argentina de Microbiología (2005) 37: 16-21.
14. Miriam Guevara Robles, Flor Urcia Ausejo y José Casquero Cavero, Instituto Nacional de Salud, Manual de procesamientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas, "Serie de Normas técnicas No. 44, Lima 2007.
15. Claudia Alfonso, Mónica López, Alicia Arechavala, et. al. Identificación presuntiva de *Candida spp.* Y de otras levaduras de importancia clínica: utilidad de Brilliance Candida Agar. Revista Iberoamericana de Micología El Servier, Buenos Aires, 2010; 27 (2) p.p. 90–93.
16. L. Roderó, G. Davel, M. Soria, W. Vivot, S. Córdoba, C. E. Canteros, A. Saporiti et. al. Estudio multicéntrico de fungemias por levaduras en la República Argentina. Revista Argentina de Microbiología (2005) 37: p.p. 189-195.
17. Tesis Liz Alejandra Uribe Gutiérrez, Caracterización fisiológica de levaduras aisladas de la filósfera de las moras, Facultad de ciencias, Bogotá 2007.
18. Garnica Ocegueda E, Araiza Santibáñez J, Moncada Barrón D, Arroyo Escalante S, Bonifaz A. Evaluación de sensibilidad y especificidad del agar Harina de maíz + tween 80, CHROMagar Candida y MicroScan para la identificación de especies aisladas de *Candida*. LAB-acta. 2009; 21: p.p. 79-84.

19. Sayyada Ghufrana Nadeem, Shazia Tabassum Hakim and Shahana Urooj Kazm Use of CHROMagar Candida for the presumptive identification of Candida species directly from clinical specimens in resource-limited settings, COACTION 9 February 2010.
20. Gerard J. Tortora, Berdell R. Funke, Christine L. Case, Introducción a la microbiología, Ed. Médica Panamericana, novena edición, Buenos Aires 2007, p.p. 139, 140.
21. Manuel Cuenca Estrella, Ignacio Gadea Gironés, Estrella Martín Mazuelos, Javier Pemán García, José Pontón, Juan Luis Rodríguez Tudela. Procedimientos en Microbiología Clínica, Diagnóstico microbiológico de las micosis y estudios de sensibilidad a los antifúngicos. España 2006.
22. Jesús Ruiz-Aragón, Pedro García-Martos, José Luis Puerto, Pilar Marín, Abel Saldarreaga, Patricia Moya. Evaluación de un nuevo medio CHROMagar Candida para la identificación presuntiva de levaduras. Revista de Diagnóstico Biológico, v.52 n.1 Madrid ene.-mar. 2003.
23. José Luis Gatica M., Iván Goic B., María Angélica Martínez T et. al. Utilidad del agar CromoCandida para el diagnóstico diferencial de *Candida spp* aisladas en muestras vaginales octubre de 2002 Chile.
24. Merkt M.; Nuñez N.; Pennini M.; Piacenza L.; Alonso M.; Sucari A. Verificación inicial del equipo rapid yeast ID panel para la identificación de levaduras, Argentina.
25. Guillermo Quindós, Rocío Alonso-Vargas, Silvia Helou, Alicia Arechavala, Estrella Martín-Mazuelos y Ricardo Negroni, Evaluación micológica de un nuevo medio de cultivo cromógeno (Candida ID®) para el aislamiento e identificación presuntiva de *Candida albicans* y otras levaduras de interés médico, Revista Iberoamericana Micología 2001; 18: 23-28.
26. Fabíola Silveira-Gomes, Dayse Nogueira Sarmento, Elaine Patrícia Tavares do Espírito-Santo, et. al., Differentiation between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* using hypertonic Sabouraud broth and tobacco agar,

- Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 44(4):457-460, jul-ago, 2011.
27. Tesis Jesús Jaime Hernández Escareño, caracterización molecular de especies del genero *Malassezia*, Barcelona España, 2005.
 28. Elizabeth Rendic O, Cristina Díaz J., Félix Fich S. Caracterización de especies del género *Malassezia* en pacientes con dermatitis seborreica en controles, Rev Méd Chile 2003; 131: 1295-1300.
 29. Kimberly Anne Schleman, Gene Tullis, y Raymond Blum. Intracardiac mass complicating *Malassezia furfur* fungemia, CHEST 2000; 118:1828–1829.
 30. E. Torres, R. Arenas, C. Atoche-Diéguéz. Infecciones causadas por el género *Malassezia*. Med. Cutan Iber Lat Am 2008; vol. 36 (6): p.p. 265-284.
 31. Marisa Biasoli. Resumen de candidiasis, Centro de referencia de micología, 2010 p.p. 1-29.
 32. Peter G. Pappas, Carol A. Kauffman, David Andes, Daniel K. Benjamin et. al. Guías de práctica clínica para el manejo de la candidiasis: actualización del 2009, de la Infectious Diseases Society of America, Estados Unidos 2009.
 33. Jesús Reséndiz-Sánchez, José Juan Morales-Aguirre. Factores asociados a mortalidad por fungemias causadas por *Candida* sp. en niños. Mediagraphic, México Vol. 64, marzo-abril 2007.
 34. Tesis Leslie Laforet Aguilera. Estudio de Pga 26, una proteína implicada en la arquitectura de la pared de *Candida albicans*. Universidad de Valencia Servei de Publicacions 2009
 35. María del Mar Magariños Losada Carlos Rodríguez Pascual et. al. Tratado de geriatría para residentes. Capítulo 44 Candidiasis, Barcelona España 2006 p.p. 443-448.
 36. Marta Valdivielso-Ramos, Cristina Mauleón. Diagnóstico diferencial de la candidiasis sistémica, Formación continua en Dermatología El Servier. Piel-532, España 2012.
 37. Rosario Alors Correderas. Estudio en el laboratorio de hongos de importancia clínica. Revista Innovación y experiencias educativas No. 11 octubre 2008.

38. Espina Suárez, Michelle Leinin; Guillén Rivera, Gerardo José; Calvo, Belinda; Meza, Luz Mila. Caracterización morfológica y fisiológica de las especies *Cándida* aisladas de la cavidad bucal de pacientes geriátricos. *Ciencia Odontológica*, Venezuela, vol. 2, núm. 2, julio-diciembre 2005, p.p. 110-119.
39. Jorge Enrique Pérez Cardenas, La criptococosis: de enfermedad esporádica a reemergente Parte I: Etiología, distribución y manifestaciones clínicas. En: Colombia Biosalud: Revista De Ciencias Básicas, ed: Centro Editorial De La Universidad De Caldas v.1 fasc.1 p.51 - 64 ,2002.
40. Jorge Enrique Pérez Cardenas, "La criptococosis: de enfermedad esporádica a reemergente. Parte II: Diagnóstico por el laboratorio, diagnóstico diferencial, tratamiento, pronóstico y prevención". En: Colombia Biosalud: Revista De Ciencias Básicas, ed: Centro Editorial De La Universidad De Caldas v.2 fasc. p.37 - 51 ,2002.
41. Emilia Cantón, Ángel Viudes, Javier Pemán. Infección sistémica nosocomial por levaduras. *Revista Iberoamericana Micología España* 2001; 18: p.p. 51-55.
42. Ileana Álvarez Lam, Juan Carlos Velázquez Acosta, Jorge Ponce Bittar, José Antonio Gaya. Criptococosis infantil: presentación de 3 casos. *Rev Cubana Pediatría* 2001; 73(1): p.p. 55-59.
43. Deborah J. Springer and Vishnu Chaturvedi Projecting Global Occurrence of *Cryptococcus gattii*, *Emerging Infectious Diseases* • www.cdc.gov/eid • Vol. 16, No. 1, January 2010.
44. Víctor Manuel Guerrero Prieto, Mará Guadalupe Trevizo Enriquez, Alfonso Antero Gardea Béjar et. al. Identificación de levaduras epifitas obtenida de manzanas [*Malus sylvestris* (L.) Mill var. *domestica* (Borkh) Mansf, para control biológico pos-cosecha. *Revista Mexicana de Fitopatología* 2004 vol 22 numero 002 p.p. 223-230.
45. Suhail Ahmad, Manal Al-Mahmeed, Zia U. Khan, Characterization of *Trichosporon* species isolated from clinical specimens in Kuwait. *Journal of Medical Microbiology* 2005, 54 p.p. 639-646.

46. Lucy García, Guiovana Fernanda Osorio, *Trichosporon mucoides* infección en paciente inmunocompetente. Editora Médica del Valle, Colombia Médica Vol. 39 N° 2, Abril-Junio 2008 p.p. 185-188.
47. Gustavo da Silva Rodríguez, Rodrigo Rosa Ubatuba de Faria, Luciana Silva Guazzelli, Flavi de Mattos Olivares y Luis Carlos Severo. Infección nosocomial *Trichosporon asahii*: revisión clínica de 22 casos. España, Revista Iberoamericana de Micología. 2006; vol. 23 p.p. 85-89.
48. Cecilia Tapia P. Género *Trichosporon*. Retrato Microbiológico. Revista Chile Infectología 2009; 26 (3): p.p. 263-264.
49. Soledad De La Cruz, Florencio Cortez, Oscar Pereda, Ivón Aleman. Piedra blanca en pelo de cuero cabelludo. Folia dermatol. Peru 2008; 19 (3): p.p. 134-137.
50. Víctor Hugo Pinos León, Marlene Legña, Sonia Tello. Prototecosis. Piel Formación continua en dermatología. El Servier. Ecuador 2010; 25 (2) : p.p. 72-74.
51. Arnaldo L. Colombo, Ana Carolina B. Padovan, and Guilherme M. Chaves. Current Knowledge of *Trichosporon* spp. and Trichosporonosis. Clinical Microbiology reviews, Oct. 2011, Vol. 24, No. 4 p.p. 682-700.
52. Antonio Ramos, Martín Cabero, Beatriz Orden, Alfonso Ángel-Moreno, Rafael Forés. Fungemia por *Rhodotorula mucilaginosa*. Revista Especialidades Quimioterapia España 2012; 25(1): p.p. 76-78
53. Nancy Cure Ruiz, Andrés F. Cardona Zorrilla. Aislamiento de *Rhodotorula sp.* en un paciente críticamente enfermo. Infectio, Bogotá, Vol. 5 - 3, 2001.
54. Cristina Guamán-Burneo, Javier Carvajal-Barriga. Caracterización e identificación de aislados de levaduras carotenogénicas de varias zonas naturales del Ecuador. Ecuador 2009, Vol. 14 N° 2-3: 187-197.
55. M Cuenca Estrella, P. Muños García-Paredes. Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y Microbiología clínica Capítulo 62, Infecciones sistémicas por otras levaduras. Editorial medica panamericana, Madrid 2005 p.p. 631-635.

56. Jean F. Mac Faddin Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica, Ed. Médica Panamericana tercera edición Buenos Aires 2003, p.p. 381-383.
57. Hans Beyer, Wolfgang Walter, Manual de Química Orgánica, versión española de la diecinueveava edición alema, Editorial Reverte S.A., Barcelona España, p.p. 785.
58. Dickerson Gray, Darensbourg Darensbourg, Principios de química, tercera edición, Editorial Reverte S.A., Barcelona España 1992, p.p. 855 y 856..
59. Gerzaín Rodríguez, Nelly Ordóñez. Haga usted el diagnóstico Segunda parte. Ecuador Biomecica 2001 volumen 21 p.p. 83-85.
60. Márcio Borges Sá, Actualización sobre el tratamiento de las infecciones fúngicas graves, Revista Quimiote Número 21, España 2008, p.p. 14-25.
61. Javier Pemán Pilar Ramos, Isabel Iglesias. Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica capítulo 6 Procesamiento de las muestras de sangre, líquidos estériles y tejidos, Revista Iberoamericana de Micología, Asociación Española de Micología, 2007.
62. Antonio Rezusta López Aurora Sánchez Sousa Joaquina Gil Tomás. Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica capítulo 3 Fundamentos básicos para el diagnóstico micológico, Revista Iberoamericana de Micología, Asociación Española de Micología, 2007.
63. Pedro García Martos, Juan Manuel Hernández Molina. Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica capítulo 7 procesamiento de las muestras genitourinarias, Revista Iberoamericana de Micología, Asociación Española de Micología, 2007.
64. Ferrán Sánchez Reus. Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica capítulo 5 Procesamiento de las muestras del tracto respiratorio inferior, Revista Iberoamericana de Micología, Asociación Española de Micología, 2007.

65. Dr. Oscar Vázquez Tsuji, Dr. Ignacio Martínez Barbabosa, Dra. Teresita Campos Rivera. Criptococosis Historia natural y estado actual del tratamiento. Revista Acta Pediátrica México 2005, vol. 26(1) p.p. 18-28.
66. Diego Andrés Rodríguez, Adriana Patricia Pinilla. Infección asociada a catéter central por *Cryptococcus laurentii* en niño críticamente enfermo: a propósito de un caso y revisión del tema. Revista Infectio. Colombia 2012, vol. 16(1) p.p. 72-74.
67. Helene C. Eisenman, PhD, Arturo Casadevall, MD, PhD, Erin E. McClelland, PhD. New Insights on the Pathogenesis of Invasive *Cryptococcus neoformans* Infection. Current Infectious Disease Reports, Estados Unidos 2007, vol. 9 p.p. 457–464.