



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“MICOTECA: COLECCIÓN DE CULTIVOS DE HONGOS, UNA
HERRAMIENTA PARA EL APRENDIZAJE Y ENSEÑANZA DE LA
MICOLOGÍA MÉDICA Y SU APLICACIÓN EN EL CONTROL DE
CALIDAD”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

VANESSA GUERRERO VELÁZQUEZ



MÉXICO, D.F.

2015



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:** Gutiérrez Ramos Abel
VOCAL: **Profesor:** González Ibarra Misael
SECRETARIO: **Profesor:** Mirabal García Mónica
1er. SUPLENTE: **Profesor:** Camacho Cruz Alejandro
2° SUPLENTE: **Profesor:** Ruiz Villafán Beatriz

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE PARASITOLOGÍA Y MICOLOGÍA DEL INSTITUTO NACIONAL
DE PEDIATRÍA

ASESOR DEL TEMA:

QFB/EBC MÓNICA MIRABAL GARCÍA

SUSTENTANTE:

VANESSA GUERRERO VELÁZQUEZ

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
III.JUSTIFICACIÓN	4
IV. OBJETIVOS	7
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	7
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	7
V. ANTECEDENTES	9
5.1 GENERALIDADES.....	9
<i>5.1.1 Morfología.....</i>	<i>9</i>
<i>5.1.2 Reproducción.....</i>	<i>12</i>
5.2 METODOLOGÍAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE HONGOS MICELIALES Y LEVADURIFORMES EN EL LABORATORIO	21
<i>5.2.1 Examen directo</i>	<i>21</i>
<i>5.2.2 Aislamiento.....</i>	<i>25</i>
<i>5.2.3 Pruebas bioquímicas.....</i>	<i>29</i>
<i>5.2.4 Otras pruebas</i>	<i>30</i>
5.3 MICOTECA: COLECCIÓN DE CULTIVOS DE HONGOS	32
<i>5.3.1 Federación Mundial de Colecciones de Cultivo (WFCC).....</i>	<i>33</i>
<i>5.3.2 Conservación.....</i>	<i>33</i>
<i>5.3.3 Autenticidad de los cultivos.....</i>	<i>40</i>

VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
VII. RESULTADOS	56
VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	84
IX. CONCLUSIONES	102
X. REFERENCIAS	105
ANEXO I.....	111
ANEXO II	115

ABREVIATURAS

°C: Grados Celsius

µm: micrómetros

A. amstelodami: Aspergillus amstelodami

A. clavatus: Aspergillus clavatus

A. flavus: Aspergillus flavus

A. fumigatus: Aspergillus fumigatus

A. madurae: Actinomadura madurae

A. niger: Aspergillus niger

A. ochraceus: Aspergillus ochraceus

A. pelletieri: Actinomadura pelletieri

A. terreus: Aspergillus terreus

A. versicolor: Aspergillus versicolor

AAL + PVA: Azul Algodón Lactofenol más Alcohol Polivinílico

AAL: Azul Algodón Lactofenol

ANF: Aspirado Nasofaríngeo

ASC: Agar Sabouraud más Cloranfenicol

ATCC: American Type Culture Collection

B.D.: Becton, Dickinson and Company

B. dermatitidis: Blastomyces dermatitidis

C. albicans: Candida albicans

C. dubliniensis: Candida dubliniensis

C. famata: Candida famata

C. glabrata: Candida glabrata

C. guilliermondii: Candida guilliermondii

C. posadasii: Coccidioides posadasii

C. krusei: Candida krusei

C. lusitaniae: Candida lusitaniae

C. neoformans: Cryptococcus neoformans

ABREVIATURAS

C. parapsilosis: *Candida parapsilosis*

C. tropicalis: *Candida tropicalis*

C. uniguttulatus: *Cryptococcus uniguttulatus*

C. utilis: *Candida utilis*

CaCl₂: Cloruro de Calcio

CCI: Control de Calidad Interno

DMSO: Dimetilsulfóxido

E. floccosum: *Epidermophyton floccosum*

EtOH: Etanol

F. compacta: *Fonsecaea compacta*

F. oxysporum: *Fusarium oxysporum*

F. pedrosoi: *Fonsecaea pedrosoi*

F. solani: *Fusarium solani*

FRU: Fragmentos de Uñas

H. capsulatum: *Histoplasma capsulatum*

H. werneckii: *Hortaea werneckii*

hrs.: horas

INP: Instituto Nacional de Pediatría

K. ohmeri: *Kodamaea ohmeri*

kg/cm²: kilogramos por centímetro cuadrado

KOH: Hidróxido de potasio

LB: Lavado Bronquial

LBA: Lavado Bronquioalveolar

LCR: Líquido Ceforraquídeo

M. canis: *Microsporum canis*

mDNA: Ácido Desoxirribonucleico mensajero

MeOH: Metanol

min: minutos

mL: mililitros

mm: milímetros

ABREVIATURAS

mRNA: Ácido Ribonucleico mensajero

N. asteroides: Nocardia asteroides

N. brasiliensis: Nocardia brasiliensis

N. otitidiscaviarum: Nocardia otitidiscaviarum

N: Normalidad

P. brasiliensis: Paracoccidioides brasiliensis

P. lilacinus: Paecilomyces lilacinus

PAS: Ácido Peryódico de Schiff

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PFGE: Electroforesis de Campo Pulsátil

PVA: Alcohol Polivinílico

QFB: Químico Farmacéutico Biólogo

RFLP: Polimorfos de Longitud de Fragmentos de Restricción

s.a.: sin año

s.f.: sin fecha

S. acremonium: Scopulariopsis acremonium

S. apiospermum: Scedosporium apiospermum

S. brevicaulis: Scopulariopsis brevicaulis

S. chartarum: Stachybotrys chartarum

S. schenckii: Sporothrix schenckii

ASD: Agar Sabouraud Dextrosa

SSI: Solución Salina Isotónica

T. asahii: Trichosporon asahii

T. cutaneum: Trichosporon cutaneum

T. inkin: Trichosporon inkin

T. mentagrophytes: Trichophyton mentagrophytes

T. mucoides: Trichosporon mucoides

T. rubrum: Trichophyton rubrum

T. tonsurans: Trichophyton tonsurans

WFCC: World Federation of Culture Collections

I. INTRODUCCIÓN

En el mundo existen cerca de 100,000 especies de hongos, tanto micro como macroscópicos, de la cuales sólo entre 300 ó 400 especies son patógenos para el hombre (micosis). El incremento de pacientes con enfermedades del sistema inmune, ha propiciado un aumento de infecciones por hongos, muchos de ellos saprofitos, los cuales pueden ser identificados mediante técnicas moleculares, no obstante inaccesibles para la mayoría de los laboratorios. Por lo que el diagnóstico definitivo de la mayoría de las micosis requiere del aislamiento e identificación del hongo a partir del cultivo, el cual en el Laboratorio de Parasitología y Micología del Instituto Nacional de Pediatría (INP) se lleva a cabo mediante la identificación morfológica y bioquímica de los hongos aislados de muestras biológicas de pacientes pediátricos, que en ocasiones sus características pueden ser muy similares, logrando así causar confusiones.^{10, 30,40}

La existencia de material de referencia dentro de un laboratorio de diagnóstico clínico juega un papel muy importante, porque como su nombre lo indica es referencia para la correcta identificación tanto de hongos patógenos como de hongos oportunistas que afectan a la población infantil.

La colección de cultivos de hongos, denominada Micoteca, tiene diversos propósitos, entre ellos: fungir como auxiliar para la identificación de cepas patógenas o contaminantes de interés clínico, el uso como material de enseñanza y capacitación para el personal de laboratorio y otros profesionales involucrados en el diagnóstico micológico, el control de calidad interno del laboratorio, así como la realización de proyectos y la preservación de especies puras de aislamiento poco frecuente.

En el laboratorio de Parasitología y Micología del INP existe un gran interés en la conformación de una Micoteca, ya que uno de los objetivos de esta institución a parte de la atención al paciente pediátrico, es la formación de profesionales dedicados a la salud participando tanto en la capacitación del personal de laboratorio, así mismo de los estudiantes de la carrera QFB y carreras afines, que rotan por el laboratorio, además de los residentes que llegan a especializarse en áreas como Infectología y Dermatología. Otro aspecto considerado en la docencia es la realización de cursos, que ayudan a compartir experiencia adquirida con personal de otras instituciones, hospitales o laboratorios.

También el contar con cepas puras aisladas de muestras biológicas de pacientes como cepas de referencia (ATCC), adecuadamente conservadas e identificadas, garantiza la calidad en el desempeño diario en el laboratorio puesto que son utilizadas en el control de calidad interno de medios de cultivo, métodos comerciales tanto de identificación (como MicroScan[®] y API ID 32[°][®]) como en la determinación de perfiles de sensibilidad a antifúngicos, de los equipos de incubación y detección de hemocultivos para el diagnóstico de micosis sistémicas.

Con todo lo anterior, se garantiza la calidad de los resultados emitidos por el laboratorio que se ve reflejado en el diagnóstico oportuno y veraz del paciente.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1. ¿Cuál es la frecuencia de micosis por hongos miceliales y hongos levaduriformes en la población? Y ¿Cuáles son las herramientas para identificarlos y dar un diagnóstico verás y oportuno?
2. ¿Cómo transferir la experiencia adquirida en el laboratorio y evitar la pérdida de información para la identificación adecuada de los hongos?
3. ¿Cómo preservar las cepas micóticas obtenidas de muestras biológicas de pacientes del INP? Y ¿En qué orden mantenerlas? para impedir su pérdida.
4. ¿Cómo comprobar sí los equipos y materiales que se utilizan para la identificación funcionan adecuadamente?

III. JUSTIFICACIÓN

En la última década, la incidencia de micosis, ha elevado la tasa de morbilidad y mortalidad en pacientes inmunodeficientes u hospitalizados con enfermedades graves, a pesar de la mejora en los métodos de diagnóstico y de la introducción y uso de nuevos antifúngicos.⁴⁰

La candidemia es la micosis más común, con una tasa de mortalidad entre el 10 y 15% en neonatos y niños, y aunque hay descritas más de cien especies de *Candida*, el 95-97% son causadas por solo cinco especies: *C. albicans* (40.9%), *C. parapsilosis* (20.5%), *C. glabrata* (4.9%), *C. tropicalis* (20.9%) y *C. krusei* (2%), con menor frecuencia destacan *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* y *C. rugosa*. En la población pediátrica, la candidemia representa casi el 16% de la infecciones nosocomiales.^{35, 37,40}

Aunque las especies de *Candida* constituyen una importante causa de micosis, otros géneros han incrementado su prevalencia en pacientes inmunodeficientes, como son las especies del género *Aspergillus* que entre ellas destacan *A. fumigatus* (90%), *A. flavus*, *A. nidulans* (en pacientes pediátricos con enfermedad granulomatosa crónica) y *A. terreus*; seguidas por *Fusarium sp.* (50-90% de mortalidad), *Scedosporium sp.*, *Acremonium sp.*, *Mucor sp.*, *Rhizopus sp.*, especies del género *Cryptococcus* y otras levaduras (*Trichosporon sp.*, *Geotrichum sp.*, *Malassezia sp.*, *Saccharomyces sp.* y *Rhodotorula sp.*), ocasionando una tasa elevada de mortalidad (40-90%).^{35, 40}

La gran diversidad genética del reino *Fungi*, ha orillado a los Microbiólogos clínicos al uso de técnicas moleculares para dar al médico un diagnóstico con mayor precisión y veracidad. Sin embargo, dichas técnicas son inaccesibles para la mayoría de los laboratorios. Por tanto, el diagnóstico definitivo de la mayoría de las micosis sigue basándose en la identificación morfológica y en algunos casos bioquímica del hongo aislado del cultivo.

Un diagnóstico médico de certeza obtenido en el laboratorio de micología inicia con la calidad de la muestra clínica obtenida del paciente, ya que esta debe ser representativa del estado del mismo, seguida de las condiciones adecuadas y tiempo de transporte, el procesamiento de la muestra clínica en el laboratorio que incluye la selección de las técnicas analíticas aplicadas, dentro de las cuales se encuentra la utilización de los medios de cultivo idóneos para la búsqueda del agente micótico involucrado, que una vez aislado, su correcta identificación a partir del cultivo obtenido es de vital importancia y es considerado el estándar de oro para otros métodos diagnósticos.

A través del presente proyecto se pretende integrar una Micoteca para el Laboratorio de Parasitología y Micología del INP, estableciendo métodos adecuados de preservación de cepas, preparaciones fijas de la morfología microscópica, así como cultivos permanentes que permitan observar la morfología macroscópica de los hongos aislados de las muestras biológicas de pacientes pediátricos. También se pretende contar con un Atlas de Micología que contenga microfotografías de las especies patógenas y oportunistas causantes de las micosis más frecuentes, e incluir algunos datos que en pocas ocasiones son mencionados en la literatura.

Por lo que contar con una Micoteca y un atlas como material de referencia facilitará la correcta identificación del agente micótico aislado del paciente, la utilización de una colección de cepas puras y caracterizadas en el Control de Calidad Interno garantizará un correcto diagnóstico, además de que la capacitación y enseñanza de la Micología Médica al personal involucrado en el diagnóstico, proporcionará al paciente un diagnóstico confiable, oportuno y veraz.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

∞ Integrar una colección de cepas micóticas conservadas que mantengan sus características morfológicas y fisiológicas, aisladas de muestras biológicas de pacientes pediátricos del INP. Asimismo contar con una colección de preparaciones fijas y de cultivos de hongos permanentes que nos permitan observar las características micro y macroscópicas de cada hongo, respectivamente, y finalmente hacer una recolección de material iconográfico que será integrado en un atlas de micología médica, que en conjunto servirán como material de referencia.

4.2 Objetivos particulares

- ∞ Recuperar y seleccionar cepas puras y viables, que se encontraban conservadas en agua, como parte de la Micoteca del laboratorio.
- ∞ Seleccionar cepas micóticas puras aisladas de muestras de pacientes pediátricos para su conservación *ex situ*.
- ∞ Determinar los métodos óptimos de conservación para las diferentes especies de hongos, aislados de muestras biológicas de pacientes pediátricos.
- ∞ Comprobar tanto la viabilidad como la estabilidad morfológica de las cepas micóticas, para cada método de conservación seleccionado.
- ∞ Utilizar las cepas micóticas conservadas como control de calidad interno.
- ∞ Estandarizar la recuperación, conservación y utilización de las cepas de referencia ATCC utilizadas para el control de calidad interno del laboratorio como parte del material de referencia.

- ∞ Optimizar la realización de preparaciones fijas microscópicas de los hongos aislados mediante la utilización de una técnica alternativa al microcultivo (Modificación a la técnica de Ridell).
- ∞ Realizar la técnica de momificación, a las cepas fúngicas aisladas de muestras biológicas, con la finalidad de conservar sus características morfológicas macroscópicas.
- ∞ Realizar la toma de microfotografías, así como la medición de las estructuras micóticas para la elaboración de un atlas.
- ∞ Diseñar un código de identificación y ubicación de cada cepa conservada, asimismo como de cada preparación fija realizada.
- ∞ Diseñar un formato de registro digital para cada cepa y preparación fija.

V. ANTECEDENTES

5.1 Generalidades

La Micología es la ciencia que tiene como objeto el estudio de los hongos y líquenes. Los hongos son organismos eucariontes, uni o pluricelulares, micro o macroscópicas (para el caso de las Setas), con diferentes tipos de parasitismo: saprofito, simbiote comensal o patógeno; que se reproducen sexualmente de forma perfecta: meiótica o teleomórfica por esporas o asexualmente de forma imperfecta: mitótica o anamórfica por conidios, siendo la unidad funcional de todos, las hifas.²³

5.1.1 Morfología

Los hongos constituyen un gran grupo de organismos, diversos y muy extendido, que incluye a las setas, los mohos u hongos filamentosos (multicelulares) y levaduriformes (unicelulares). Bajo el punto de vista micro y macroscópico sólo hay dos tipos: mohos, denominados también hifomicetos, que dan colonias filamentosas y circulares en medios con agar y globosas en caldo; y las levaduras o blastomicetos, los cuales forman colonias cremosas similares a las bacterianas.^{10,31,32,52}

Las células fúngicas están constituidas por mitocondrias y sistema endomembranoso, dictiosomas o cuerpos cisternales (cuerpo de Golgi). La membrana celular basal está compuesta por una gran cantidad de esteroides, principalmente ergosterol. Mientras que la pared celular está básicamente formada por quitina (*N*-acetilglucosamina), glucanos, mananos y derivados celuloideos, así como glucopéptidos y manoproteínas (dan flexibilidad).^{2, 10}

Nutrición y condiciones de crecimiento

Los hongos son organismos heterótrofos (carecen de clorofila), por lo que su nutrición se realiza mediante la secreción de enzimas catabólicas

conocidas como exodespolimerasas que digieren la materia orgánica antes de ingerirla (absorción pasiva o mecanismos de transporte activo) que es almacenada en forma de glucógeno.

Cada hongo crece bajo circunstancias óptimas, como los psicrófilos que se desarrollan entre 0 y 20°C, mesófilos de 0 a 50°C y termófilos con un rango óptimo entre 20 y 50°C, por lo general los hongos que afectan al ser humano crecen entre 35 y 40°C. Los hongos son acidófilos, por lo que se desarrollan mejor entre 5.6 y 6.8 de pH.¹⁰

Clasificación de las hifas

Algunos hongos, están formados por filamentos (estructuras elementales multicelulares), llamadas hifas (unidad funcional), las cuales crecen por alargamiento de las puntas o por ramificación, denominadas micelio.

Las funciones de la hifa o micelio se clasifican de acuerdo a su constitución física y funcional:

Por su origen:

- ∞ **Hifas verdaderas:** se forman a partir de la germinación de un conidio o espora, pertenecientes a los hongos filamentosos y macromicetos.
- ∞ **Pseudohifas o pseudofilamento:** la reproducción es por gemación, que son células redondas que en algunas especies estas células quedan unidas a la célula madre, y se alargan formando una estructura similar a la hifa verdadera, la cual se forma por lo regular cuando el micelio nutricional es pobre.

Por su función:

- ∞ **Micelio vegetativo o de nutrición:** asegura el desarrollo, nutrición, fijación y edificación de la parte reproductora. En el medio de cultivo, este micelio es el que penetra a través del agar.
- ∞ **Micelio aéreo:** las hifas crecen sobre la superficie del agar y es el encargado de soportar las estructuras de reproducción.
En el micelio aéreo se desarrollan las características del hongo, que de acuerdo al género o especie que pertenezcan van a ser de diferentes formas y colores (pulvurenta, cerebriforme, algodonosa, etc.).
- ∞ **Micelio fértil o reproductivo:** parte del micelio de donde surgen las estructuras de reproducción.¹⁹

De acuerdo a la presencia o ausencia de pigmentos:

- ∞ **Micelio hialino:** es aquel que carece de pigmento (por ejemplo, los hialohifomicetos o zigomicetos).
- ∞ **Micelio pigmentado:** se caracterizan por tener pigmento, sobre todo melánico (por ejemplo, feohifomicetos o dematiáceos) y otros producen pigmento carotenoide (por ejemplo, *Rhodotorula*).

Por el diámetro:

- ∞ **Micelio microsifonado:** menor a 1 μm , característico de los actinomicetos.
- ∞ **Micelio macrosifonado:** mayor a 1 μm , perteneciente a los hongos filamentosos y macromicetos en el subsuelo.

La presencia o ausencia de divisiones o septos:

- ∞ **Micelio septado:** tabiques o divisiones (que marcan a una célula). Cada septo es un canal de comunicación en donde hay un

intercambio de nutrientes, como de otras sustancias, mediante poros.

- ∞ **Micelio aseptado o cenocítico:** Ausencia de divisiones, característico de los *Mucorales*.

Los hongos presentan diferencias o modalidades de las hifas en su forma y constitución, que son una guía para la identificación de los hongos (Figura 1). Los más comunes son los órganos de resistencias como los clamidioconidios, cuerpos nodulares (*Cladosporium sp.* y *F. pedrosoi*), espirales (*T. mentagrophytes*), estolón (*Rhizopus sp.*), pectinadas (*Cunninghamella sp.*), raquetas intercalares o terminales (*M. canis*), rizoides que son órganos de fijación (*Rhizopus sp.*), zarcillos (*T. mentagrophytes*) y acumulación de muchas hifas como las células muriformes (su objetivo es almacenar sustancias de reserva). También hay agregaciones miceliales como lo son los coremios y sinemas (asociación micelial formada de hifas delgadas con órganos de fructificación o sin ellas, respectivamente), apresorios (prolongación de la hifa que sirve para adherirse a un sustrato como *T. ovoides*), haustorios (perforación después de la fijación de la hifa como *T. asahii*), cleistotecios (cuerpo fructífero cerrado, que al romperse libera las ascas). Así como peritecios y apotecios, en los hongos ascoporados .⁴,
10,31

5.1.2 Reproducción

Los hongos se reproducen sexualmente (meiosis) o asexualmente (mitosis), y algunos por ambos. Ya que para conservar su capacidad de adaptación, los hongos deben reproducirse fácilmente. Sin conidios, se puede decir que el micelio es estéril.¹⁹

Reproducción teleómorfa o sexual

El principal objetivo de la reproducción sexual es el intercambio de material genético y, por tanto, se relaciona con cambios evolutivos y adaptativos para sobrevivir a modificaciones ambientales.^{5, 10}

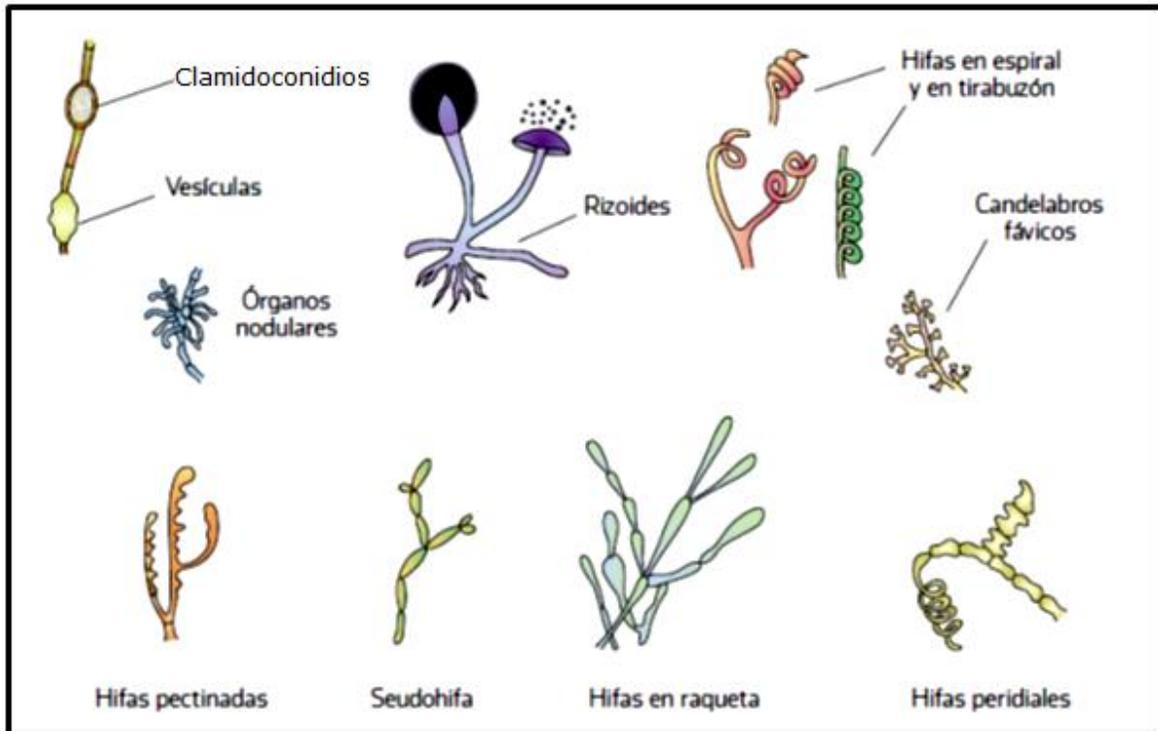


Figura 1. Modalidades de las hifas (Tomado de Arenas, Micología Médica capítulo de muestra. México.)

La reproducción sexuada o perfecta (hongos teleómorfos) consta de una serie de procesos como: producción de órganos sexuales y gametos; fusión protoplasma de éstos (plasmogamia) y fusión nuclear (cariogamia); y meiosis en hongos haploides; aparición de factores genéticos, así como el desarrollo de cuerpos fructíferos y esporas sexuales.⁵

En la meiosis, algunas veces son seguidas por división mitótica, que ocurre en la formación sexual de las ascosporas en la Clase *Ascomycetes*. Algunos Ascomicetos exhiben ascosporas libres, y otros

producen ascas dentro de un cuerpo fructífero llamado ascocarpo. Si el ascocarpo está enteramente cerrado, es denominado cleistotecio, y se liberan las ascas hasta que éstas estén maduras. El peritecio es cuerpo fructífero en forma de botella con una apertura donde las ascosporas pueden ser liberadas. Los gimnotecios son parecidos a los cleistotecios excepto que la pared exterior del ascocarpo está poco organizada de tal manera que las ascas se liberan al azar a través de las aperturas en la pared (forma sexual de los dermatofitos). Un cuarto tipo de ascocarpo es el apotecio que tiene forma de copa, las ascas son formadas desde el interior de la copa. Y finalmente las ascostromas, en la cual las ascas son producidas en lóculos (compresiones o cavidades) en masas duras **soportando hifas llamadas estromas (“colchones”)**.

Las Clase *Basidiomycetes* producen basidiosporas que son producidas tanto por meiosis como por mitosis sobre cortos dentículos sobre la superficie de una forma de masa celular llamada basidio.¹⁹

En la Clase *Zygomycetes* forman zigosporas que surgen por la unión de dos hifas sexualmente diferenciadas, donadoras (+ o *major*) y receptoras (- o *minor*), aunque su morfología es igual (isogamia), una vez que se lleva a cabo la unión, se inicia la plasmogamia, seguido de la cariogamia, de donde se forma un huevo o zigospóra, donde posteriormente a la meiosis nacerá un nuevo hongo.¹⁰

Reproducción anamórfica o asexual

Dentro de las *phyla* (divisiones) de los hongos, todos presentan forma de reproducción sexual, y solo a un grupo pequeño no se le ha detectado este tipo de reproducción; pero de acuerdo al reordenamiento por biología molecular (mRNA y mDNA), quedan estos incluidos en las diversas clases; así los llamados *Fungi imperfecti* o *Deuteromycetes*

(antigua clasificación), en la actualidad son denominados hongos mitospóricos, es decir, que sólo llevan a cabo la mitosis.¹⁰

Sólo algunos hongos que causan infecciones en humanos se reproducen mediante reproducción asexual, también llamada imperfecta o anamórfica, la cual es útil para realizar la identificación morfológica del hongo, ya que es la observada en los medios de cultivo de primo aislamiento en los laboratorios de diagnóstico clínico.

El objetivo principal de este tipo de reproducción es el mantenimiento de la especie, por lo que no hay intercambio de material genético sino que éste pasa directamente a las células hijas y las estructuras permanecen idénticas al progenitor.

Los hongos pueden reproducirse asexualmente de tres maneras diferentes: el primero por taloconidios mediante el crecimiento y diseminación de las hifas filamentosas lo que da lugar a los artroconidios, blastoconidios, clamidoconidios, dictioconidios y aleuroconidios; el segundo es la reproducción asexual por conidios denominados micro y macroconidios y finalmente los esporangioconidios o esporangiosporas que se encuentran dentro de una bolsa llamado esporangio.³²

La conidiogénesis es la gemación de estructuras reproductivas especializadas. La célula que produce a los conidios, es llamada célula conidiogénica (fiálide, anélide). Tanto en las fiálides como en las anélides, el primer conidio es holoblástico y cada conidio sucesivo es enteroblástico. Las fiálides son células determinadas, esto significa que la fiálide detiene su alargamiento cuando el primer conidio es producido. Mientras que las anélides son células conidiogénicas indeterminadas que continúan creciendo mientras más conidios son producidos van dejando una forma de cicatriz en el anelóforo.

Los conidios son producidos por hongos filamentosos y levaduriformes. En algunas instancias la célula conidiogénica es el conidióforo (del Griego "phoro", **acarrear o soportar**). En otras el conidio puede ser producido de una célula conidiogénica especializada localizada entre el conidio y el conidióforo. Las células conidiogénicas difieren en apariencia, en cómo producen los conidios, y en los cambios que ocurren durante la conidiogénesis.

Los conidios se forman por dos caminos:

1. **Blastogénesis:** En la blastogénesis el nuevo conidio comienza a alargarse y entonces se diferencia de la célula parental por el desarrollo de un septo en la hifa o célula.
2. **Conidiogénesis tálica:** El conidio joven no se desarrolla hasta después de la formación de un septo en la célula parental.¹⁹

Los criterios de conidiogénesis más relevantes para la identificación de hongos se pueden clasificar de acuerdo a su origen y función:

1. **Por su origen tálico o artrogénico:** que se forman a partir de la fragmentación de la hifa, por ejemplo los artroconidios, clamidoconidios y aleuroconidios.

Hay tres tipos:

- ∞ Tálico-solitaria: como los de *Microsporum sp.*
 - ∞ Tálico-ártrica: separación en fragmentos, por ejemplo *Geotrichum sp.*
 - ∞ Tálico-ártrica alternada: no hay separación de los fragmentos por lo que quedan unidos por un artículo como los de *Coccidioides sp.*
2. **Por su origen blástico:** formación a partir de una célula madre, como los blastoconidios (gemación) y dictioconidios o poroconidios como *Alternaria sp.*

Se subdivide en:

- ∞ Blástica-blástica: por gemación, particular de las levaduras.
- ∞ Blástica-simpodial: nacimiento de un conidio tras otro (por ejemplo, *Sporothrix sp.*).
- ∞ Blástica-sincrónica: los conidios nacen al mismo tiempo.
- ∞ Blástica-acrópetala: el conidio más joven está en la punta de la cadena (por ejemplo, *Monilia sp.*).
- ∞ Blástica-fialídica: nacimiento de una célula conidiogénica llamada fiálide, donde la célula basal es la más joven (por ejemplo, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*).
- ∞ Blástica-anelídica: cuando el conidio nace, deja una cicatriz en forma de anillo alrededor de la célula conidiogénica (por ejemplo, *Scopulariopsis sp.*).

Estas características se pueden observar en la Figura 2.

3. **Por su origen endogénico** son las que se forman dentro de una bolsa o membrana por segmentación progresiva:

- ∞ Esporangiosporas, esporangioconidios o endosporas, también pueden ser uniseriales, el cual el esporangio se alarga hasta dar una saco o merosporangio que contiene a los conidios en cadena (por ejemplo, *Syncephalastrum sp.*) o el esporangio se reduce o esporangiolo, conteniendo solo un conidio (*Cunninghamella sp.*).^{10,15}

Pero el hongo no puede ser identificado solo por observar las células conidiogénicas, sino hay que considerar las estructuras especializadas, las cuales proporcionan gran información para la identificación en el laboratorio de diagnóstico. Estas son propias de los fialoconidios y esporangiosporas, las cuales se pueden ver en la Figura 3.

Los hongos asimismo pueden presentar fenómenos fúngicos como:

- ∞ **El dimorfismo fúngico:** fenómeno reversible mediante el cual el hongo puede pasar de una forma micelial a una levaduriforme. Las condiciones que pueden propiciar este fenómeno son variables como los nutrientes (medios pobres o ricos) y temperatura dependiente a la temperatura de 25 a 28°C fase filamentosa y a 37 °C fase levaduriforme en medios ricos, entre otras.¹⁰
- ∞ **Los hongos dimórficos-bifásicos:** son los que presentan una forma filamentosa y otra diferente a la fase levaduriforme (células muriformes como la de los hongos que ocasionan Cromoblastomycosis).
- ∞ **Pleomorfismo fúngico:** se presenta en los medios de cultivo, es un proceso irreversible, por exceso de carbohidratos, lo que propicia un micelio blanco, algodonoso, estéril y que al microscopio no se observan estructuras de reproducción e inclusive hay presencia de clamidoconidios. En los dermatofitos es muy común que se presente.¹⁰

También a los siguientes fenómenos se les considera muy importantes para la micología médica:

- ∞ **La reducción morfológica fúngica:** reducción mínima del hongo como infectante o al parasitar por cambios bioquímicos y metabólicos (por ejemplo, la presencia de hifas en escamas).
- ∞ **Polimorfismo lesional:** es la capacidad de un hongo para causar diferentes cuadros clínicos (por ejemplo, dermatofitos, *Aspergillus sp.*, entre otros).

∞ **Pluralidad etiológica:** cuando una misma micosis es causada por diferentes agentes etiológicos (por ejemplo, la onicomicosis que puede ser causada por *Scopulariopsis sp.*, *Aspergillus sp.* o *T. rubrum*).

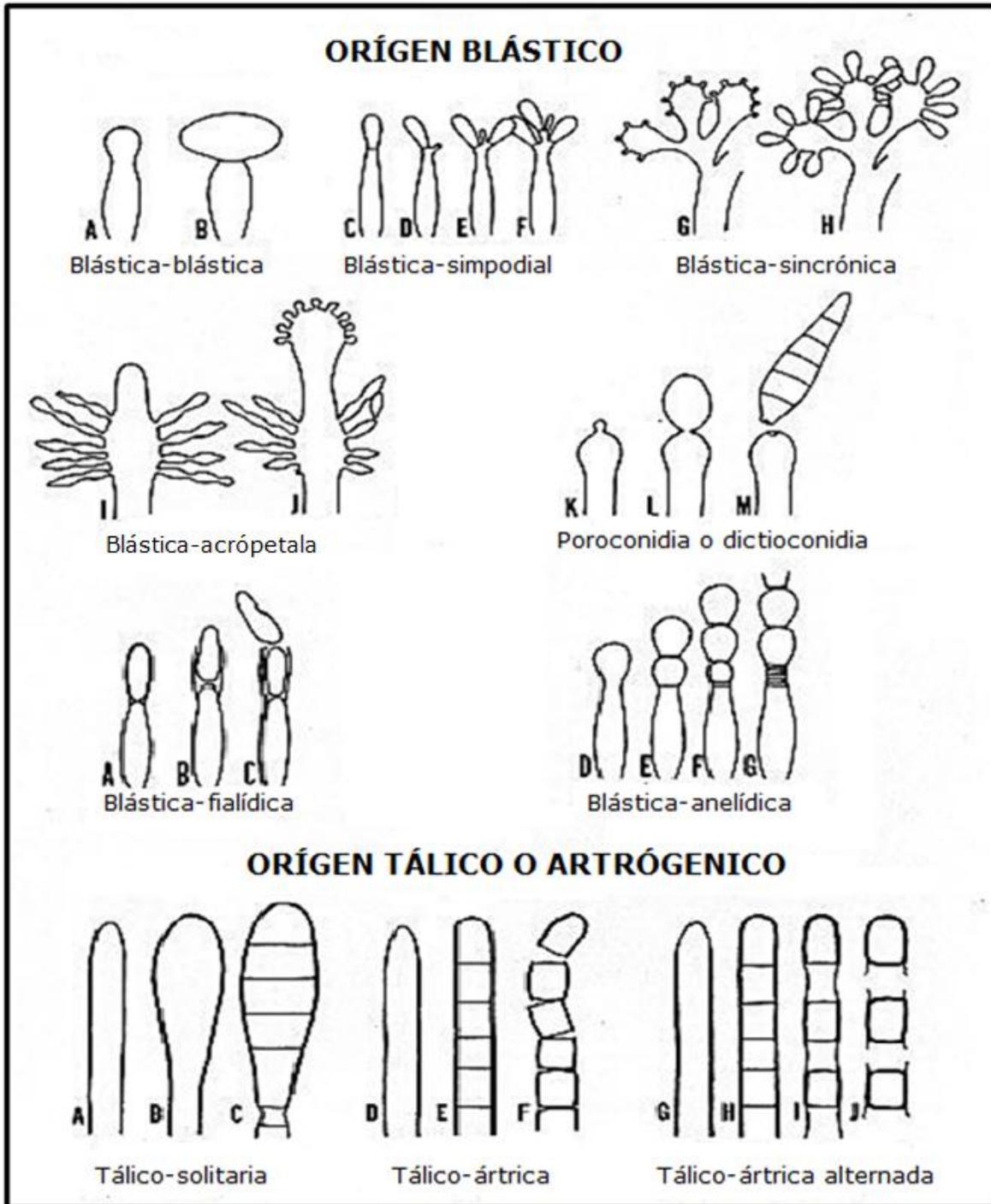


Figura 2. Formación de los conidios (Tomado y modificado de: Kendrick, B. *The Fifth Kingdom*: www.mycolog.com)

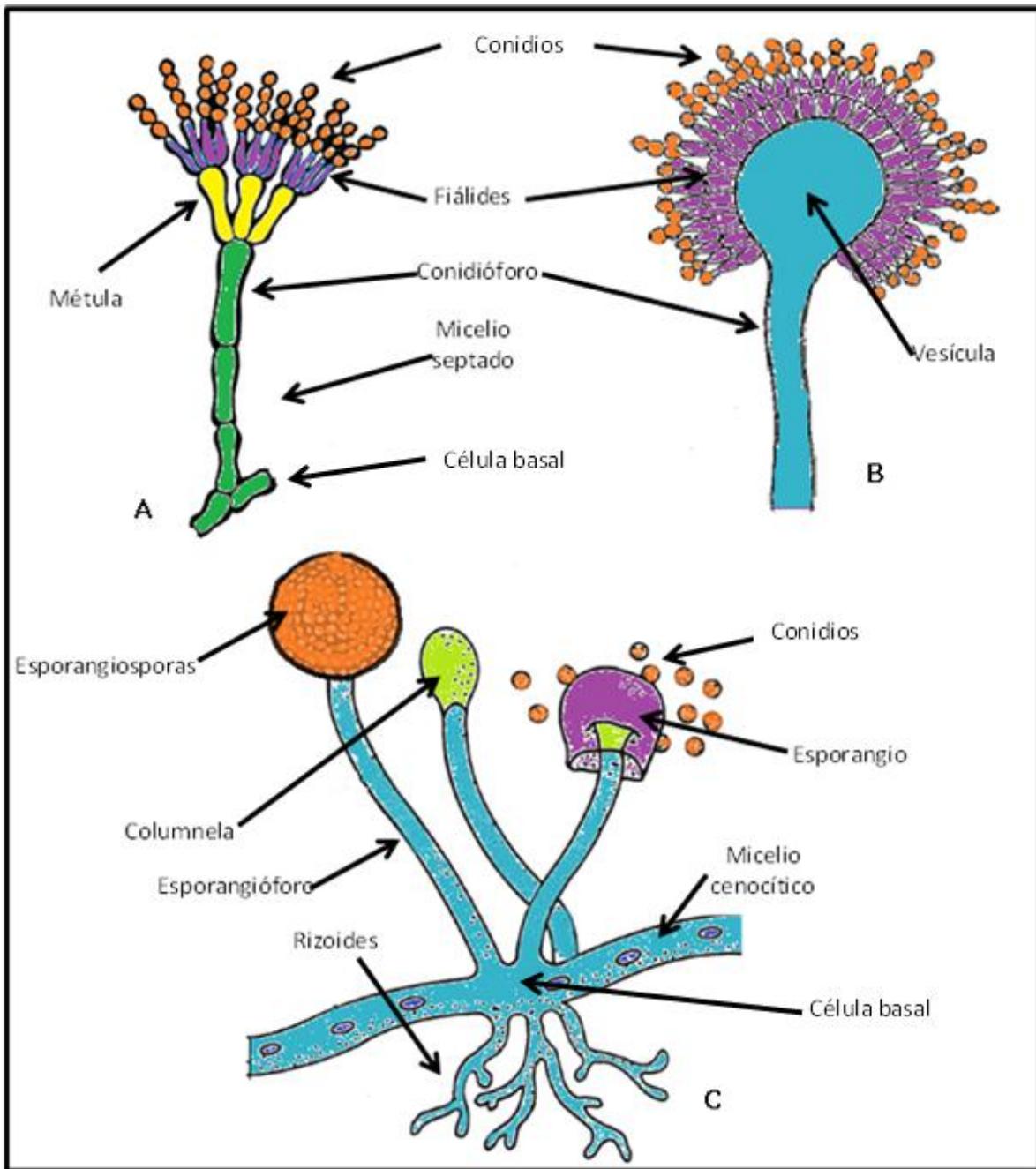


Figura 3. Estructuras especializadas. A) *Penicillium sp.* (Tomada y modificada de: www.virtualmuseum.ca), B) *Aspergillus sp.* (Tomada y modificada de: www.plantasyhongos.es) y *Rhizopus sp.* (Tomada y modificada de: www.clt.astate.edu).

5.2 Metodologías para la identificación de hongos miceliales y levaduriformes en el laboratorio

El laboratorio de Micología cuenta con una serie de procedimientos que permiten la detección e identificación de hongos patógenos u oportunistas en los diversos especímenes clínicos que les son remitidos, los cuales logran proporcionar resultados de calidad para que los médicos den un diagnóstico veraz y certero.³

El diagnóstico definitivo de la mayoría de las micosis requiere del primo-aislamiento e identificación del hongo a partir del cultivo. Por lo que las muestras para estudio micológico se deben examinar tanto micro como macroscópicamente.

La serie de metodologías que permiten la detección e identificación son:

5.2.1 Examen directo

El examen directo ofrece claves tempranas que ayudan al personal del laboratorio a decidir qué medios de cultivo y pruebas bioquímicas debe utilizar para seguir con la identificación y, al médico a realizar un diagnóstico presuntivo e inclusive proporcionar al paciente un tratamiento previo con antimicóticos.²⁷

Este procedimiento no sustituye al cultivo, pero puede aportar, en ocasiones, un diagnóstico definitivo al ser la única evidencia de infección fúngica y en otras, un diagnóstico de sospecha previo a la confirmación con el cultivo o si es negativo puede sustentar el aislamiento de hongos contaminantes. Además, de que es un método sencillo, rápido y de bajo costo.^{14, 22}

Este se debe complementar con el cultivo, ya que nos permite la exacta identificación del hongo, porque en los medios de cultivos puede haber crecimiento de hongos filamentosos y levaduriformes que son parte de la microbiota o contaminantes.

Son múltiples las técnicas de observación microscópica para el diagnóstico de cada micosis. Entre las principales para realizar el examen directo destacan:

∞ **Examen en fresco**

Se realiza un montaje directo del sedimento de la muestra previamente centrifugada sobre un portaobjetos, sin la necesidad de adicionar algún reactivo o colorante.

∞ **Hidróxido de potasio (KOH) al 10-30%**

Disuelve el grosor de las células (escamas) permitiendo la degradación de la queratina y la saponificación de las grasas, logrando observar con mayor nitidez los elementos fúngicos, este proceso de aclaramiento se puede acelerar calentándolo ante las flamas de un mechero.

Esta solución (volumen: volumen) también se utiliza para muestras con alto contenido de mucina (expectoraciones, LBA, etc.) que se deben centrifugar para permitir que la mucina se separe y se puedan observar fácilmente las estructuras micóticas.^{10, 22}

Al adicionar glicerol al KOH, mejora la conservación de las estructuras fúngicas, ya que no permite que la preparación se seque tan rápido.

∞ **Tinta China**

Es un método de contraste. Ayuda a visualizar la cápsula de polisacárido de *C. neoformans* y *C. gattii*, mediante la presencia de un halo claro y nítido alrededor de los blastoconidios en gemación.

Aunque mediante esta técnica la presencia de artefactos pueden interferir en la lectura y dar un diagnóstico erróneo, como burbujas de aire, leucocitos, gotas de grasa y partículas de talco, por ello es muy importante buscar cuando están en proceso de blastogénesis.

∞ **Azul Algodón Lactofenol (AAL)**

Es un colorante útil para teñir las estructuras fúngicas tanto de miceliales como levaduriformes, y tener una mejor visualización de la conformación morfológica del hongo (este colorante se utiliza una vez obtenido el cultivo). Cuando un hongo micelial crece, éste se debe observar mediante un examen directo con cinta adhesiva colocando una gota de azul de lactofenol.

Al laboratorio llegan diversas muestras que se les realiza examen directo en fresco o alguna tinción para la búsqueda de estructuras micóticas que podrían estar parasitando alguna parte del cuerpo del paciente. Dependiendo de la muestra clínica, la observación microscópica se realiza mediante un examen en fresco, con KOH al 20%, AAL, tinta china, etc. (Cuadro 1).

Las desventajas y limitaciones del examen directo que deben tomarse en cuenta son:

- ∞ Un examen directo negativo, no descarta una infección fúngica. La sensibilidad de la técnica fluctúa entre 10^3 - 10^5 elementos

fúngicos por mililitro. Por lo que es importante recolectar una cantidad representativa de la muestra.

- ∞ Puede originar falsos positivos al confundir ciertos artefactos con estructuras fúngicas como linfocitos, fibras, gotas de grasa, mucina, etc.
- ∞ No es posible identificar la especie fúngica.¹⁴

Cuadro 1. Proceso de las diversas muestras y posibles estructuras que se pueden observar.

Procedimiento	Muestra biológica	Estructuras micóticas observadas
En fresco	Orina	Blastoconidios, pseudohifas y conidios.
	LCR	Pseudohifas y blastoconidios
	Líquido pleural	Blastoconidios y pseudohifas
	Sangre	
Aclarado con KOH al 20%	Escamas de piel	Blastoconidios, pseudohifas, conidios y filamentos.
	Expectoración, LBA, ANF, LB.	
	FRU	
	Escamas de piel	
	Mucosas	
	Cabellos	
Azul de lactofenol	Escamas de piel	Hifas y blastoconidios redondas "albóndigas con espagueti" .
Tinta China	LCR	Blastoconidios gemantes con cápsula o blastoconidios mas pseudohifas.

^a Estas muestras también se pueden teñir mediante tinciones fijas e histológicas como la de Ácido peryódico de Schiff (PAS).

5.2.2 Aislamiento

Posteriormente cada muestra se siembra en medios especiales para optimizar el crecimiento de los microorganismos.

Dependiendo su composición, los medios de cultivo se pueden clasificar en:

Generales o medios de primo-aislamiento

Idealmente, cuatro medios deben ser usados para primo-aislamiento, los tubos o placas donde directamente se hace la inoculación de las muestras de los pacientes. Una combinación de medios es siempre deseable para una amplia posibilidad de aislamiento.

Algunos de ellos son:

- ∞ **Agar Dextrosa Sabouraud (ADS):** es un medio que provee los nutrientes básicos que se requieren para el crecimiento de la mayoría de los hongos. Pero es un medio muy susceptible a contaminarse con bacterias y hongos saprófitos. Este medio se considera útil para el aislamiento de hongos causantes de micosis por oportunistas aunque su desarrollo morfológico no es completo, por lo que se recomienda resembrarlo en otros medios.^{10,19}
- ∞ **Agar Sabouraud con cloranfenicol (ASC):** es un medio de primo-aislamiento que no permite el desarrollo de la mayoría de las bacterias de la microbiota y es el que más se utiliza en la rutina para el aislamiento de hongos filamentosos y levaduriformes. También está dentro de los medios selectivos ya que está diseñado para que crezcan los hongos de interés.¹⁹

Medios complejos o para subcultivo.

Son aquellos que su composición es desconocida pero que contiene los nutrientes necesarios para un adecuado desarrollo.

- ∞ **Agar Papa y Dextrosa (PDA):** es útil para el subcultivo de hongos miceliales y levaduriformes a partir muestras clínicas, ya que la base del medio es altamente nutritiva y permite la conidiación y la producción de pigmentos de algunos dermatofitos. También puede ser suplementado con antibióticos o ácidos (por ejemplo, ácido tartárico a pH 3.5 ± 1) para inhibir el crecimiento bacteriano.

Selectivos

Son aquellos que favorecen el desarrollo de un microorganismo específico y suprime el crecimiento de otros.⁴²

- ∞ **Agar Micosel:** es un medio altamente selectivo para el aislamiento de hongos patógenos a partir de muestras con gran cantidad de microbiota de otros hongos y bacterias. Inhibe el crecimiento de hongos contaminantes, levaduras saprofitas y bacterias. Contiene en su composición cicloheximida para inhibir el crecimiento de hongos no patógenos y cloranfenicol que es un antibacteriano de amplio espectro. En el laboratorio de Micología del INP este medio se utiliza principalmente para el aislamiento de dermatofitos.

Diferenciales

Son aquellos que contienen sustancias nutritivas o indicadoras que permiten poner en manifiesto alguna actividad metabólica del microorganismo que los diferencie de los demás.⁴²

- ∞ **Medio cromogénico CHROMagar-Candida®:** Este medio diferencial es principalmente utilizado como auxiliar para la identificación de levaduras mediante la interpretación bioquímica por cambios de coloración de las colonias. Contiene diversos sustratos enzimáticos que están unidos a compuestos cromogénicos. Cuando estas enzimas descomponen el sustrato, se produce el color e inhibe el crecimiento de bacterias. Este medio, según el instructivo de uso, permite la diferenciación de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei*, entre las 48 a 72 horas de incubación, pero de acuerdo a la experiencia en el laboratorio este medio solo sirve como un auxiliar pues otras especies que presentan pigmentaciones que varían desde el rosa pálido, púrpura a azul, por lo que se debe complementar con las pruebas bioquímicas correspondientes. Una ventaja adicional del medio es la fácil detección de cultivos mixtos de levaduras, debido a los diferentes colores de las colonias.¹⁹

Especializados

Son aquellos medios que contienen algún componente destinado a aislar un agente microbiano en concreto, favorecer la identificación de ciertas especies u obtener estructuras de reproducción.¹⁴

- ∞ **Agar alpiste negro:** este medio es específico para el aislamiento del género *Cryptococcus*, ya que este microorganismo metaboliza los extractos del alpiste negro (*Guizotia* abissinica) al tener presente la enzima fenol-oxidasa.¹⁰

Una vez realizado el aislamiento del hongo, de la muestra clínica, se lleva a cabo la identificación del mismo dependiendo del tipo de hongo aislado, si es un hongo filamentoso se consideran los siguientes criterios:

- ∞ La morfología microscópica, de acuerdo a la conidiogénesis anteriormente descrita.
- ∞ La morfología macroscópica, en el cual se consideran las siguientes características:

Cada tipo de crecimiento en los medios debe ser descrito. Para examinar la colonia se debe tener en cuenta el tiempo de la colonia (días) y la temperatura a la que fue incubada.

Los hongos filamentosos son considerados de crecimiento rápido si la colonia madura en menos de 5 días y por lo general son los saprofitos. Los de crecimiento moderado producen colonias de 6 a 10 días, es el caso de algunos oportunistas y que constantemente causan infección, particularmente los dermatofitos. Y los de lento crecimiento que necesitan 11 días o más, y causan infecciones sistémicas o subcutáneas.

Otra de las características que ayudan a identificar la colonia es la producción de pigmento que pueden ser localizados, difuminado en todo el medio o estar ausentes.

Después de ver si hubo desarrollo de pigmento o no, observamos la textura que define a la colonia, haciendo la descripción, por ejemplo si es **cerosa** el micelio aéreo corto, y la colonia se ve sumergida en el medio; **aterciopelada**, que parece felpa o tela aterciopelada; **gamuza** hifa aérea corta aproximadamente de igual longitud, con pocos conidios visibles a simple vista; **levaduriforme** muy parecidas a las colonias bacterianas (estafilococos) la diferencia es que las colonias de levaduras

son más elevadas y a veces corrugadas; **algodonosa**, en la cual la hifa aérea es muy larga y en los tubos o cajas con medio de cultivo ocupa todo el espacio libre; y las colonias que son **granulares** o **polvosas** que son características de hongos donde su conidiación es muy alta.

También hay que hacer la descripción de la superficie de la colonia por ejemplo si son **rugosas** que son colonias que tienen surcos radiales del centro a la periferia (parece rueda de bicicleta), si es **crateriforme** que asimilan la forma de un volcán (es de los menos comunes) y las colonias **cerebriformes** que parecen un cerebro.¹⁹

En el caso de los hongos levaduriformes se realizan las siguientes pruebas para su identificación:

5.2.3 Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas para la identificación se basan principalmente en las características metabólicas de cada una de las levaduras. Estas técnicas se fundamentan en la fermentación (zimograma) y la utilización de carbohidratos (auxograma). En el laboratorio de Micología del INP se utilizan principalmente dos pruebas bioquímicas comerciales (zimograma y auxograma) que son MicroScan[®] y API ID 32[®].

- ∞ **MicroScan[®]**: es una prueba semiautomatizada de rutina que consiste en un panel para la identificación rápida de levaduras. Es una placa de microdilución de 96 pocillos que utiliza 27 sustratos deshidratados. Estos sustratos son rehidratados con una suspensión concentrada de la levadura (previa resiembra de 24 horas, 35-37°C) en agua estéril. Se logra la identificación después de una incubación de 4 horas a 35-37°C. Permite la identificación de 40 especies diferentes.

El instructivo menciona las siguientes limitaciones de la prueba: debe tenerse cuidado con las cepas con producción excesiva de

hifas, ya que la prueba es útil únicamente para la identificación de levaduras y organismos afines (*Prototheca*). A un determinado número de biotipo le puede corresponder a varios organismos, por lo que se debe recurrir al uso de pruebas complementarias como el desarrollo en Caldo Sabouraud Hipertónico, la coloración en CHROMagar, desarrollo en cicloheximida, etc. y pueden haber variaciones cromogénicas debido a un sobre o infra inoculación en el panel.¹⁴

- ∞ **API ID 32°®**: la galería de ID 32° es una prueba estandarizada de escrutinio para la identificación de levaduras, compuesta por 32 ensayos de asimilación miniaturizados, donde la lectura y la interpretación puede ser automatizada o manual.

Cada cúpula contiene un sustrato carbonado en forma deshidratada. La levadura en estudio se pone en suspensión en un medio semisólido (previa resiembra de 24 horas a 28°C). Después de 24-48 horas de incubación a 28°C, se lee el crecimiento en cada cúpula. Permite identificar 63 especies diferentes.

El instructivo menciona las siguientes limitaciones de la prueba: No se pueden identificar otros microorganismos que no estén contenidos en la base de datos y sólo se pueden utilizar cepas puras.¹⁴

5.2.4 Otras pruebas

Existen otras pruebas que pueden ser un auxiliar para la identificación de los hongos. Por ejemplo:

- ∞ Las pruebas utilizadas para la diferenciación entre *C. albicans* y *C. dubliniensis*, esta última no crece a 45°C ni en caldo Sabouraud hipertónico, tampoco asimila la D-xilosa, Metil- α -D-glucósido y D-trealosa, pero si crece en glicerol, a comparación

de *C. albicans*. Cabe destacar, que todas las cepas identificadas por estos métodos tendrían que ser probadas por biología molecular.¹⁰

- ∞ Prueba en tubo germinal donde sólo *C. albicans* y en menos proporción *C. dubliniensis*, son capaces de producir verdaderos tubos germinales. Sin embargo, después del periodo indicado de incubación, todas las especies de *Candida* pueden formar tubo germinativo (con excepción de *C. glabrata*) y *C. tropicalis* puede producir pseudohifas de aspecto similar al tubo germinal pero con blastoconidias más grandes que las de *C. albicans*.¹⁰
- ∞ Los métodos inmunológicos, que se basan en la detección de antígenos o anticuerpos a través de ensayos de inmunofluorescencia indirecta, aglutinación en látex, ELISA. Las pruebas comerciales más comunes son: Bichro Látex Albicans, Bichro-Dubli (Fumouze), Platelia *Candida* Ag, Platelia *Aspergillus* Ag, entre otras.
- ∞ Pero hoy en día el uso de la biología molecular se ha aplicado para el análisis y el estudio de diferentes especies de hongos miceliales y levaduriformes. La determinación del cariotipo mediante electroforesis de campo pulsátil (PFGE), hibridación con sondas, la detección de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), la amplificación del ADN (PCR) son los más empleados para la identificación.⁵¹

Pero, ¿Por qué es importante identificar correctamente a los hongos filamentosos y levaduriformes?

En los últimos años las micosis han aumentado, en especial en pacientes pediátricos, inmunodeficientes o que están bajo tratamientos con fármacos agresivos, ya que el riesgo de contraer una micosis es muy alto, ya sea por contacto en el medio ambiente o por una infección

nosocomial, afectando a los pacientes a diferentes niveles del cuerpo; como lo son las micosis superficiales (tiñas), profundas, sistémicas o por oportunistas (levaduras u hongos contaminantes).

Por lo que es importante saber identificar al microorganismo que está ocasionando la micosis, pues a la hora de valorar el crecimiento fúngico, surge la necesidad de diferenciar entre un **“aislamiento significativo”** de otros debidos a la presencia de hongos contaminantes, ya que no es lo mismo identificar una especie fúngica que diagnosticar una micosis.³⁹

Y ¿Cómo lograr una adecuada identificación?, ¿Cómo saber si los equipos y materiales que se utilizan para la identificación funcionan adecuadamente?

5.3 Micoteca: Colección de Cultivos de Hongos

Gracias al gran auge que ha alcanzado la Micología, se han generado diversos campos para facilitar el estudio de estos organismos, como la creación de colecciones de cultivos para la conservación de los hongos, denominadas Micotecas.

Las colecciones de cultivo adquieren cada vez mayor importancia como mecanismo o vía para la conservación *ex situ* que representan un elemento estratégico y económico para ofrecer a los pacientes un diagnóstico veras y efectivo.

Además de que una Micoteca es una fuente de información de aspectos importantes como métodos de conservación tanto de las cepas recuperadas de pacientes como de las cepas de referencia o certificadas (como las ATCC), medios de cultivo, identificación de hongos en el diagnóstico de micosis, control de calidad, docencia médica y química, capacitación del personal, etc.¹⁷

5.3.1 Federación Mundial de Colecciones de Cultivo (WFCC)

Existen según el Centro Mundial de Datos de Microorganismos (WDCM, siglas en inglés) en el mundo cerca de 684 centros de Colecciones de Cultivo de Microorganismos registrados ante la WFCC, de los cuales en México hay 18, de estos sólo dos pertenecen a la UNAM, uno en la Facultad de Medicina (293 cepas de hongos conservadas) y otro en la Facultad de Química (80 cepas de hongos conservadas).⁴⁹

Tal vez la principal tarea común de todos los laboratorios de micología, independiente de su perfil, es la adecuada conservación de los cultivos fúngicos, para llevar a cabo la realización de dichas colecciones es necesario regirse bajo ciertas normas generales o principios básicos que establece la WFCC:

- a) Todos los cultivos deben conservarse **vivos** (al menos 70%),
- b) Deben mantenerse en estado de **pureza**,
- c) Cada cepa debe **mantener** sus característica morfológicas, bioquímicas y genéticas,
- d) Cada cepa debe **conservarse** al menos por dos métodos (uno de ellos debe ser la liofilización) y
- e) En el caso de los patógenos, debe conservarse también sus *atributos patógenos*.

5.3.2 Conservación

El almacenamiento es uno de los mayores problemas que se presentan en la función de una Micoteca, ya que son pocos los laboratorios que cuentan con la tecnología como la liofilización o el uso de nitrógeno líquido. Por lo que muchos micólogos se han visto en la necesidad de buscar técnicas sencillas y más accesibles.^{12, 17}

Los métodos de conservación cambian para cada microorganismo, ya que son diferentes entre géneros e inclusive especies, y con el fin de

garantizar la viabilidad óptima, almacenamiento y pureza de cada cepa; la WFCC establece que para mayor seguridad y minimizar la probabilidad de que las cepas cambien sus características:

«Cada cepa debe ser mantenida por lo menos por dos métodos diferentes»

Al menos uno de estos debe ser la liofilización o almacenamiento a baja temperatura (Criopreservación) a -140°C o menos y reducir los cambios genéticos. También para asegurar la estabilidad y viabilidad de las cepas congeladas deben de refrigerarse por duplicado en aparatos diferentes con suministros eléctricos estables.⁵⁴

Métodos de conservación

En la actualidad se utilizan una gran diversidad de métodos de conservación, los cuales dependen por una parte de las especies que se desean mantener y otra de los recursos disponibles para llevarlo a cabo (por ejemplo, económico, personal, tiempo, equipos, etc.). Los métodos no van ser éxitos en general para todas las cepas, por lo que se recomienda utilizar los más adecuados según las características de cada especie.¹⁷

Los métodos de conservación se pueden clasificar en:

1. Métodos de conservación de elección o de largo plazo (>8 años)

Son los mejores métodos para garantizar la estabilidad genética, ya que paraliza el metabolismo y por ende el crecimiento de las células microbianas, aunque no se puede descartar algún cambio. Estos métodos se dividen en dos principalmente:^{1,20}

a) Criopreservación

Este proceso tiene como principal objetivo la estabilidad de los materiales microbiológicos a temperaturas criogénicas; algunas cepas de hongos miceliales pueden tolerar temperaturas de -60°C a -80°C por largo tiempo, mientras que los hongos levaduriformes pueden soportar temperaturas de hasta -150°C .

Cuando las células se someten a un proceso de congelación sufren cambios de acuerdo al tiempo que dure este (Figura 4).

Un proceso de congelamiento lento conlleva a la congelación externa de la célula antes de que comience el hielo intracelular a formarse. Cuando se forma hielo externo a la célula, el agua es removida del ambiente extracelular provocando un desbalance osmótico, ya que hay un incremento de solutos fuera de la célula, que ocurre a través de la membrana celular dejando que el agua migre fuera de esta. También si hay demasiada agua dentro de la célula, puede haber formación de cristales durante el calentamiento y puede ser letal.

Pero cuando el proceso de congelación es rápido, minimiza la concentración de solutos y el hielo se forma uniformemente, pero deja que se forme más hielo intracelular y no permite que el agua migre al exterior.

El uso de crioprotectores o químicos durante el proceso de congelación también minimiza los efectos perjudiciales del incremento de solutos y la formación de cristales de hielo en las células microbianas. Los crioprotectores más comunes son el DMSO y el glicerol.

Los crioprotectores cumplen varias funciones durante el proceso de congelación. El DMSO es utilizado para fomentar una mayor deshidratación de las células antes de la congelación intracelular. El

glicerol es el agente crioprotector más usado debido a que es menos tóxico que el DMSO.

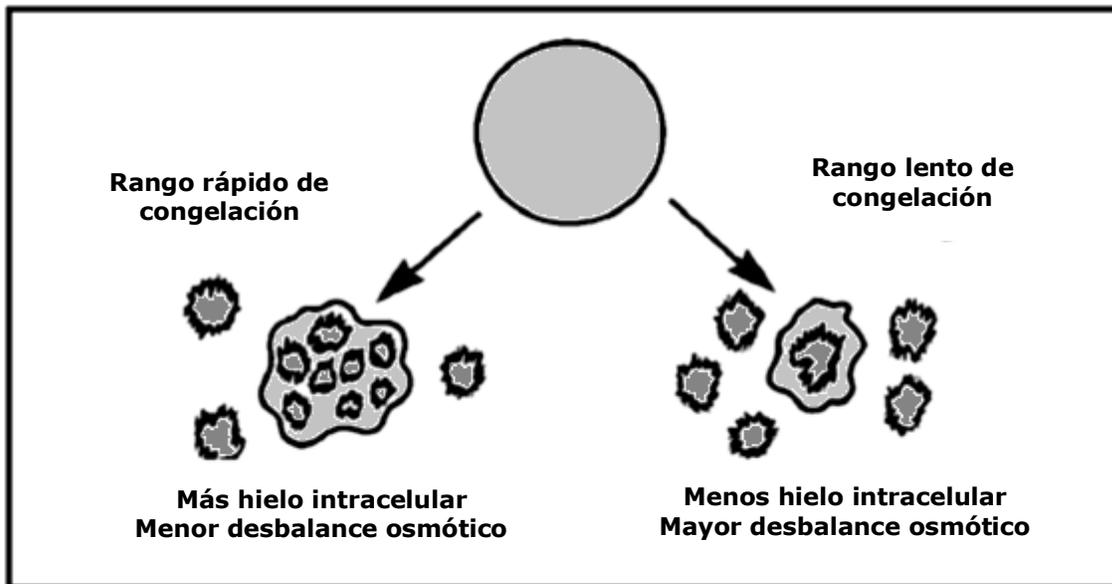


Figura 4. Cambios celulares de acuerdo a los rangos de congelación. (Tomado y modificado de: Simione P., ATCC en cooperación con Thermo Fisher Scientific: www.thermoscientific.com/coldstorage)

Un elemento clave para una buena criopreservación, es la estandarización del método.⁷

Existen cuatro factores que influyen en la viabilidad y estabilidad de las células conservadas por criopreservación:

- 1) Edad de las células: uso de células maduras del inicio de la fase estacionaria,
- 2) Velocidad de congelación y descongelación: estas dos etapas deben ser rápidas, y que la temperatura para descongelar sea de 37°C,
- 3) Temperatura de almacenamiento: esta debe ser lo más baja posible, lo más aconsejable debe ser a -70°C o menos.

4) Empleo de agentes crioprotectores: este dependerá del microorganismo que se quiera conservar. Los más usados son el glicerol al 10, 15 o 20%, DMSO, leche descremada y carbohidratos.²⁰

b) Liofilización

Se considera el mejor método para la conservación de cultivos de células con sus características originales. Este método consiste en la remoción de agua de las células a presión reducida (sublimación). En este proceso también se emplea el uso de un crioprotector como leche, suero o glutamato de sodio. La muestra se transfiere a una ampolleta, se congela y se somete a alto vacío hasta que el agua intracelular se sublima.

Las ventajas de este método es que una vez liofilizada la cepa no necesita tratamientos especiales, no requiere resiembras, se puede conservar el microorganismo hasta por 20 años; la ampolleta permite un fácil transporte, evita la contaminación, se conservan las propiedades morfológicas y bioquímicas de los hongos miceliales y levaduriformes, este es un método muy exitoso. Mientras que las desventajas es que es muy costoso.¹⁷

Ambos métodos son los recomendados para la conservación de microorganismos de referencia, como las cepas ATCC.

2. Métodos alternativos

Son aquellos métodos que se utilizan cuando no se pueden emplear la liofilización o criopreservación, ya sea por no contar con los equipos necesarios o por que la cepa no resiste las condiciones de conservación.²⁰

a) Cultivo periódico o resiembras

Este método consiste en sembrar a la cepa en un determinado medio de cultivo y, posteriormente conservarlo en refrigeración a 4°C. El proceso debe repetirse cada cierto tiempo y las resiembras se realizan en tubos de ensayo con el agar inclinado (*slants*). Es el peor método de conservación ya que tiene muchas desventajas como la inestabilidad genética, alto riesgo de contaminación y el agar se deshidrata en refrigeración.⁵³

b) Conservación en agua destilada o Método de Castellani

Es el método más utilizado para la conservación de cepas y que da altos porcentajes de viabilidad para hongos filamentosos y levaduriformes. Consiste en suspender a los microorganismos en agua estéril en criotubos. Se han comprobado que las cepas conservan sus características morfológicas y fisiológicas, aunque aún no se han comprobado si pierde sus factores de virulencia y de fermentación. Las ventajas de este método son que es un proceso rápido, barato, sencillo, seguro y capaz de garantizar la integridad del microorganismo.^{20, 30}

3. Métodos restringidos

Son técnicas que permiten la viabilidad de los cultivos entre 2 y 5 años. Estos métodos se basan en la paralización del crecimiento por eliminación del agua disponible para las cepas. La desecación se lleva a cabo en varios soportes como arena, papel filtro, sílica gel, perlas de vidrio o plástico, etc.), así como el almacenamiento en tierra, parafina líquida y glicerol, métodos bien fundamentados en especial para hongos.^{20,51}

a) En papel filtro

Se utiliza papel Whatmann No. 3 o No. 4 (esterilizado), que se impregna con una suspensión (más un protector) concentrada de la cepa y se deja secar (en condiciones estériles) de 2 a 3 semanas.

b) En suelo, arena, sílica gel, perlas de plástico o vidrio, etc.

Se realiza una suspensión de las células en un protector, que se añaden al soporte para que las proteja al desecar. Por este método se pueden conservar las cepas a 18°C o temperatura ambiente.

c) En bolitas de alginato

Las células se encuentran en una matriz de alginato y la eliminación del agua se hace por tratamiento con soluciones hipertónicas sucesivas y posteriormente se deseca al aire hasta que pierde un 70% de su contenido en agua. Aunque otras fuentes señalan que se pueden hacer las bolitas de alginato mediante la polimerización de este, haciéndolo reaccionar con CaCl_2 . Estas cepas se pueden conservar a 4°C y 8°C, e incluso -80°C. ^{20,24}

Sin embargo, sin importar el método utilizado, se debe tener cuidado con la recuperación de las cepas cuando se requiere trabajar con ellas, **ya que se encuentran "dormidas" o en "estrés"**. Así que al recuperarlas se debe hacer en medios selectivos para asegurar su crecimiento y así empezar a trabajar.

Finalmente, la selección de la técnica de conservación dependerá del microorganismo, por lo cual es mejor realizar la revisión en la literatura y buscar alternativas.

5.3.3 Autenticidad de los cultivos

La WFCC establece la importancia de la identificación adecuada de las cepas conservadas, y así evitar cualquier riesgo para el personal que se expone al reconstituirlas.

En caso de los hongos filamentosos y levaduriformes, que son identificados mediante microscopía, es recomendable tener un banco con preparaciones para cada cepa.

La documentación del registro de las cepas, la WFCC recomienda, que debe contener la siguiente información:

- ∞ Lugar
- ∞ Microorganismo
- ∞ Fecha de aislamiento
- ∞ Nombre de la persona que aisló el espécimen
- ∞ Nombre de la persona que identificó la cepa
- ∞ Técnica de conservación
- ∞ Medio y temperatura óptima de crecimiento
- ∞ Otras características

Por seguridad la información se debe respaldar por duplicado en un sistema de cómputo o copias.⁵⁴

Por otra parte, en la actualidad se hace más evidente la necesidad de incorporar técnicas moleculares que confirmen la preservación de la identidad de las cepas conservadas como uno de los principios básicos de las colecciones de cultivo de hongos.¹⁷

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material biológico

- ∞ Cepas miceliales y levaduriformes obtenidas de muestras biológicas de pacientes del INP durante la realización de este proyecto.
- ∞ Cepas miceliales y levaduriformes aisladas de muestras biológicas de pacientes del INP y que se encuentran conservadas en agua.
- ∞ Cepas ATCC liofilizadas Kwik-Stik[®]

5.2 Medios de Cultivo

- ∞ Agar Alpiste Negro (Tubo 16X150 mm)
- ∞ Agar Mycosel (Tubo 16x150 mm)
- ∞ Agar Papa y Dextrosa (Tubo 22x150 mm, Tubo 12x75 mm, caja)
- ∞ Agar Sabouraud (Caja, Tubo 12x75 mm)
- ∞ CHROMagar-*Candida*[®] (Caja)
- ∞ Medio de inmovilización-criopreservación (Anexo I)

5.3 Reactivos

- ∞ Agua
- ∞ AAL
- ∞ AAL + PVA (Anexo I)
- ∞ CaCl₂ 0.25 M
- ∞ Formaldehído 40%
- ∞ Formol 10%
- ∞ Glicerol al 10 y 15%
- ∞ KOH al 20%
- ∞ SSI 0.9%

5.4 Material de laboratorio

- ∞ Algodón
- ∞ Asa micológica en "L"
- ∞ Asa bacteriológica
- ∞ Bisturí
- ∞ Cajas portapreparaciones
- ∞ Crioviales (2 mL)
- ∞ Cubreobjetos (10x10 mm)
- ∞ Gradillas
- ∞ Hisopos
- ∞ Mechero de Fisher
- ∞ Pipetas Pasteur
- ∞ Pipetas de 100-1000 μ L
- ∞ Portacrioviales (para 100 crioviales)
- ∞ Portaobjetos (22x75 mm)
- ∞ Puntas desechables

5.5 Equipos

- ∞ Agitador eléctrico
- ∞ Autoclave
- ∞ Ultra congelador a -70°C
- ∞ Equipo para lectura de paneles de MicroScan AutoScan4[®]
- ∞ Incubadora 28°C y 37°C
- ∞ Microscopio óptico Carl Zeiss (cámara con resolución 1.3 mpx)
- ∞ Parrilla eléctrica
- ∞ Refrigerador 4°C
- ∞ Vórtex

5.6 Kits

- ∞ Kits para la identificación rápida de levaduras MicroScan[®]
 - ▶ Agua para inóculo (3 mL)
 - ▶ Hidróxido de sodio (NaOH) 0.05N
 - ▶ Reactivo Peptidasa
 - ▶ Patrón de turbidez para levaduras
 - ▶ Panel para la identificación rápida de levaduras

- ∞ Kits para la identificación de levaduras API ID 32[°][®]
 - ▶ Galería ID 32°
 - ▶ Tapa de incubación
 - ▶ Ampolla de API[®] C Medium
 - ▶ Ampolla de API[®] Suspensión Medium (2 mL)

5.7 Otros

- ∞ Arena (soporte)
- ∞ Parafina para cortes histológicos
- ∞ Chakirón (soporte)
- ∞ Cinta adhesiva transparente (mágica)

En la elaboración de la Micoteca se recuperaron 76 cepas: un actinomiceto, una alga, 34 levaduras y 40 hongos filamentosos (aisladas de diversas muestras biológicas), que estaban conservadas en agua (Método de Castellani), PDA, ASD, Alpiste negro y SSI. Con estas cepas se probaron técnicas alternativas de conservación tomando como referencia lo establecido en la WFCC, además de métodos que permitan la preservación de los cultivos a temperatura ambiente.

Las técnicas de conservación ensayadas fueron:

- ∞ La conservación del cultivo del hongo en glicerol al 10%, es la técnica más utilizada para la preservación de levaduras, ya que se reduce su metabolismo y por ende su crecimiento.
- ∞ La conservación en arena, para hongos miceliales, es un método restringido que se basa en la paralización del crecimiento por eliminación del agua. Se deposita el cultivo del hongo en un soporte (arena) en cual el agua se deseca y se utiliza un protector para evitar el daño celular.
- ∞ Conservación del cultivo del hongo en SSI al 0.9%, este método se probó con aquellas cepas susceptibles al pleomorfismo y a la contaminación, como lo son los dermatofitos y cepas del género *Cryptococcus*, dicha técnica se basó en el artículo de Brilhante.¹²
- ∞ La conservación en formol al 10% se utilizó para la fijación de estructuras micóticas contenidas en muestras biológicas.

Los cultivos conservados por estos métodos se mantuvieron a temperatura ambiente y se realizó cada uno por duplicado.

En el diagrama 2, se puede ver el proceso a seguir para conservar las cepas mediante estas técnicas.

- ∞ En el diagrama 3, se encuentra el método de criopreservación en chakirón, que se fundamenta en la inmovilización de los conidios al chakirón con alginato de sodio, utilizando como protector glicerol, preservándolas a -70°C .

Para cada cepa conservada en los diferentes métodos se evaluó la pureza, viabilidad y estabilidad morfológica mes a mes durante 6 meses, resembrando las cepas en PDA (miceliales) y ASD (levaduriformes) observando la morfología micro y macroscópica.

También para este proyecto se buscó una alternativa a la elaboración de microcultivos, ya que la realización de estos conlleva una serie de pasos tardados y laboriosos (Diagrama 10A). Larone (2011) propone en su libro, una modificación a la técnica del montaje de PVA de Huber, que se basa en la elaboración del colorante AAL adicionado con PVA, ya que este último permite la fijación de las estructuras microscópicas. Las 76 cepas, una vez conservadas de 4 a 5 meses en las diferentes técnicas anteriormente mencionadas, fueron resembradas en PDA (miceliales) y ADS (levaduras), las cuales se monitoreó su crecimiento hasta observar la morfología microscópica adecuada, para posteriormente ser montadas con este colorante por cuadruplicado, en el diagrama 5 se puede observar el procedimiento utilizado. Una vez fijadas las preparaciones, se realizaron una serie de microfotografías, en las cuales se capturaron las características microscópicas de los hongos. Además, se realizaron medidas, por quintuplicado, al azar de las estructuras micóticas, para posteriormente hacer el promedio y compararlo con establecido la literatura.²⁶

También se realizó la momificación de la morfología macroscópica de las cepas, la cual se basa en la siembra del hongo en un tubo con PDA y ASD (para *S. schenckii*), una vez que las características cumplen con lo establecido en la literatura, se fijan para evitar su crecimiento. La técnica esta descrita en el diagrama 4.

Se elaboró un atlas, en el cual se efectuó una selección de microfotografías en donde se observarán las estructuras descritas en la literatura. Asimismo se realizó el cultivo de los hongos en cajas de PDA (miceliales) y CHROMagar (levaduriformes) para fotografiar la morfología macroscópica. Con este material el contenido del atlas es el siguiente: una introducción de la micosis, microfotografías y macrofotografías del hongo donde se señalan las características claves para su identificación, una descripción de las características microscópicas (morfología y medidas), así como las condiciones de crecimiento y las características macroscópicas del hongo, y al final una recopilación de las técnicas de recolección de muestras, su observación al microscopio (secreciones, orina, escamas) y las lesiones que puede ocasionar el hongo.

Además, se realizó un registro digital para el control de las cepas de acuerdo a lo mencionado por la WFCC: lugar, microorganismo, fecha de aislamiento, nombre de la persona que aisló el espécimen, nombre de la persona que identificó la cepa, técnica de conservación, medio y temperatura óptima de crecimiento y otras características. Asimismo la cantidad de preparaciones fijas y cepas momificadas contenidas en la Micoteca.

Finalmente en el diagrama 8 y 9, se observa la propuesta de mejora para la recuperación y conservación de cepas ATCC, de acuerdo a los documentos encontrados en la página web www.atcc.org.

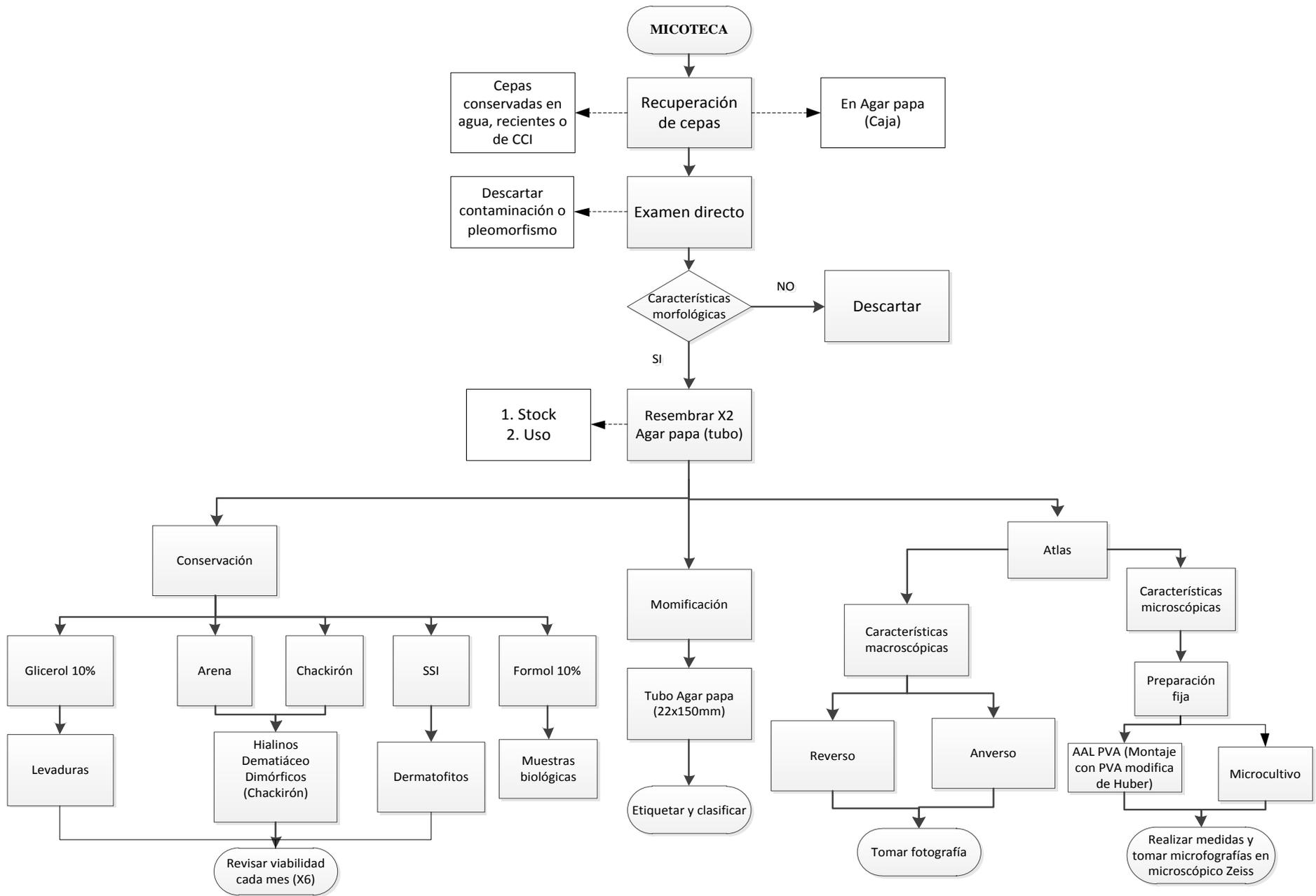


Diagrama 1. Procedimientos generales para la elaboración de la Micoteca.

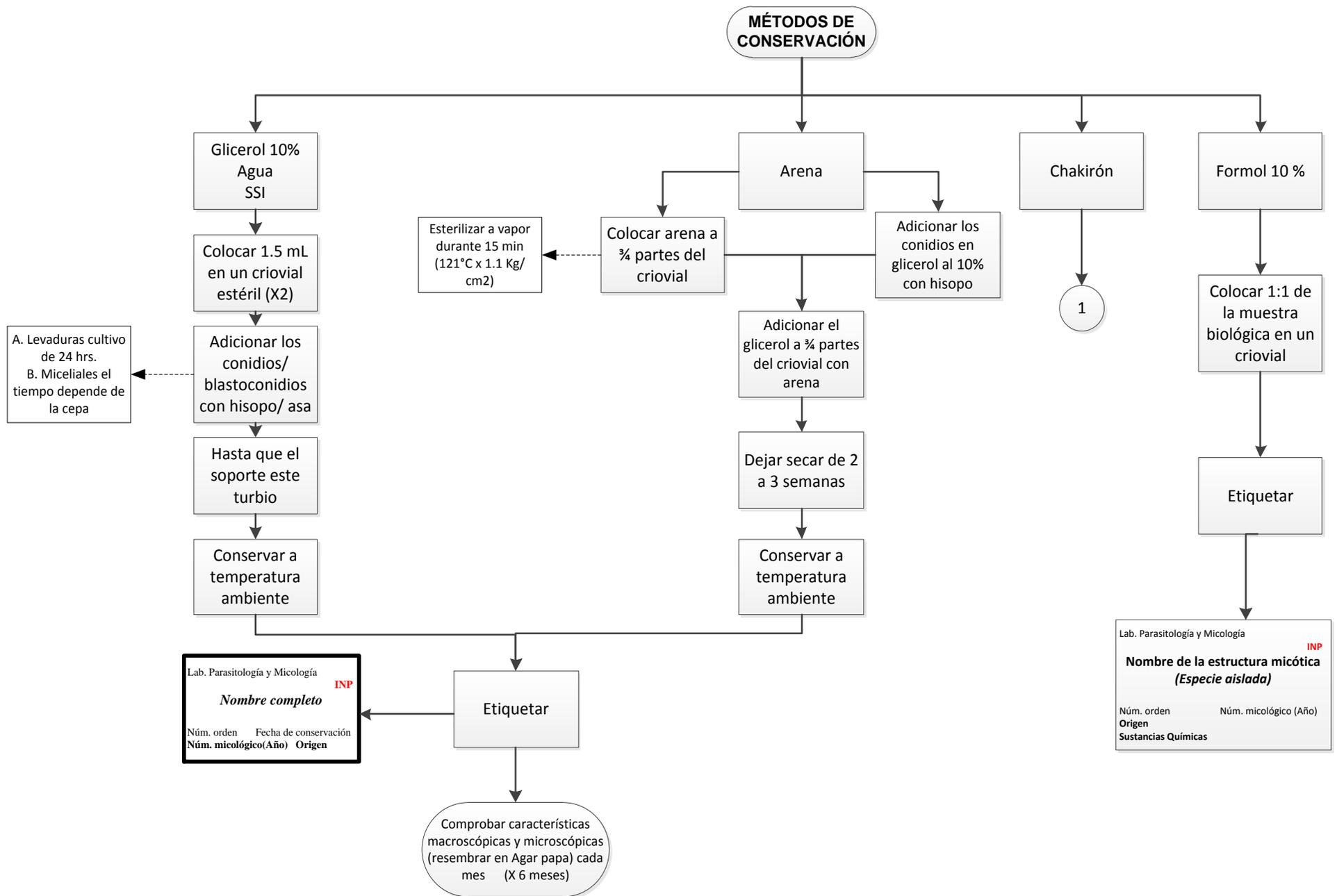


Diagrama 2. Procedimiento de las diferentes técnicas de conservación (Glicerol 10%, Agua, SSI, Arena y Formol 10%) y las especificaciones de almacenamiento.

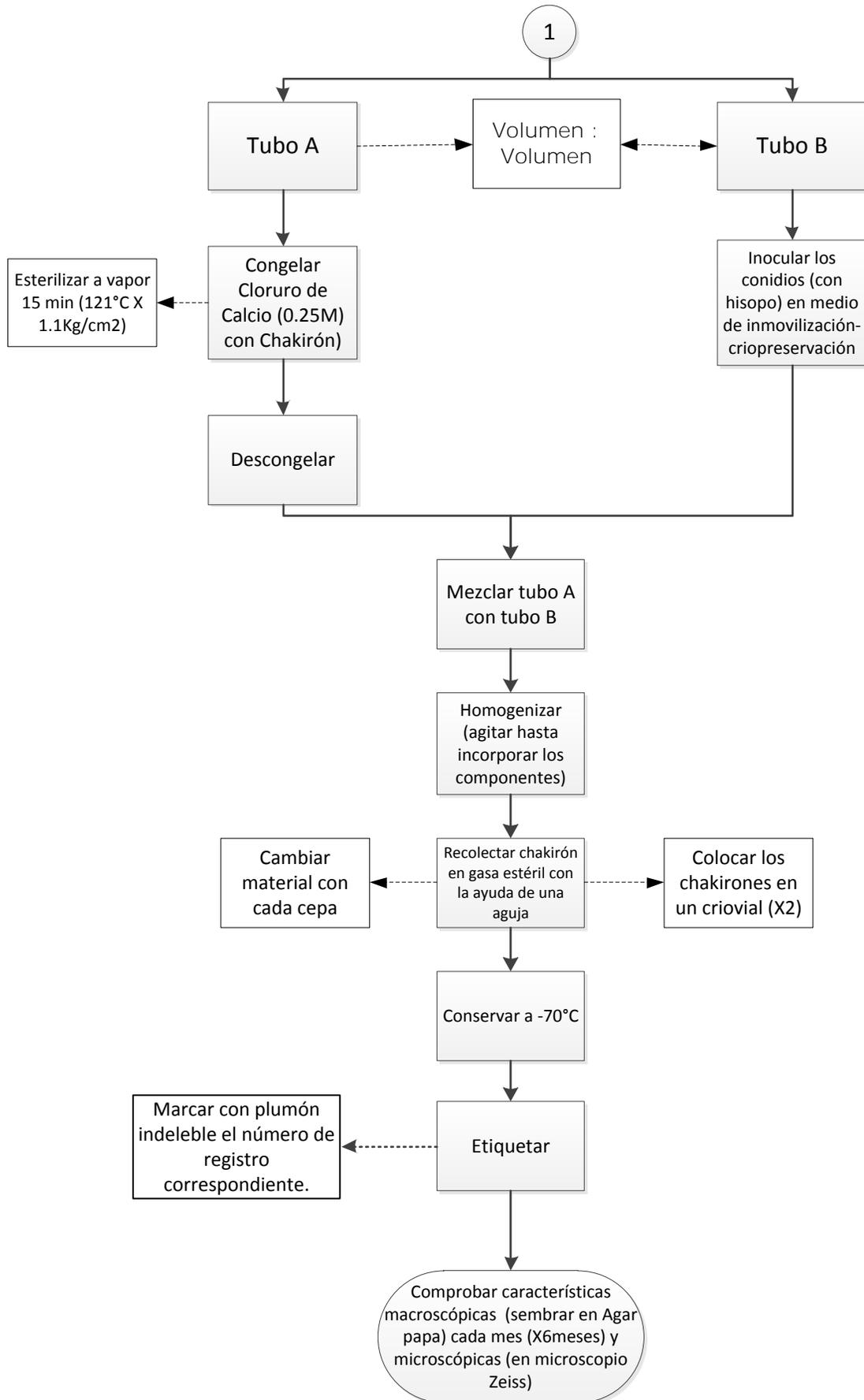


Diagrama 3. Continuación del procedimiento de las diferentes técnicas de conservación (Chakirón) y las especificaciones de cómo debe ser guardado.

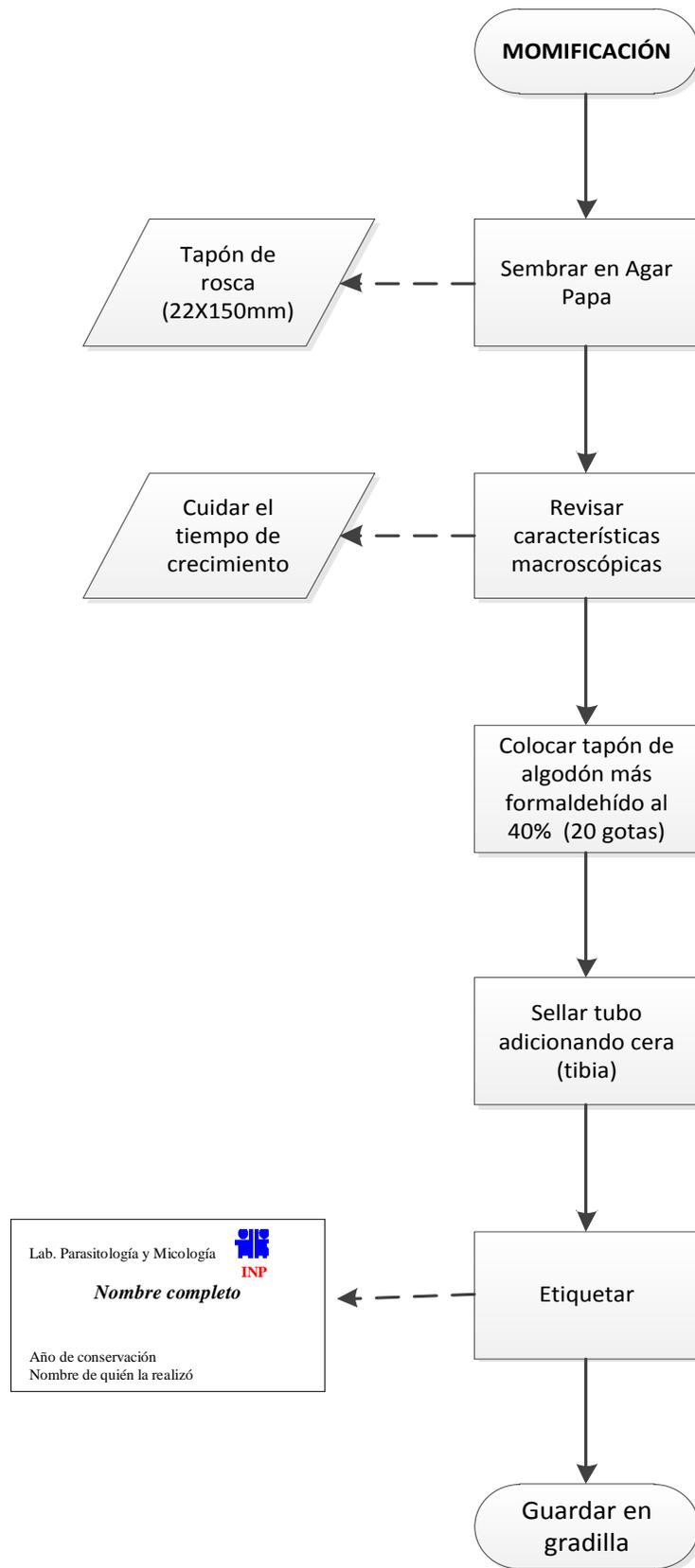


Diagrama 4. Técnica de momificación de cepas miceliales a nivel macroscópico.

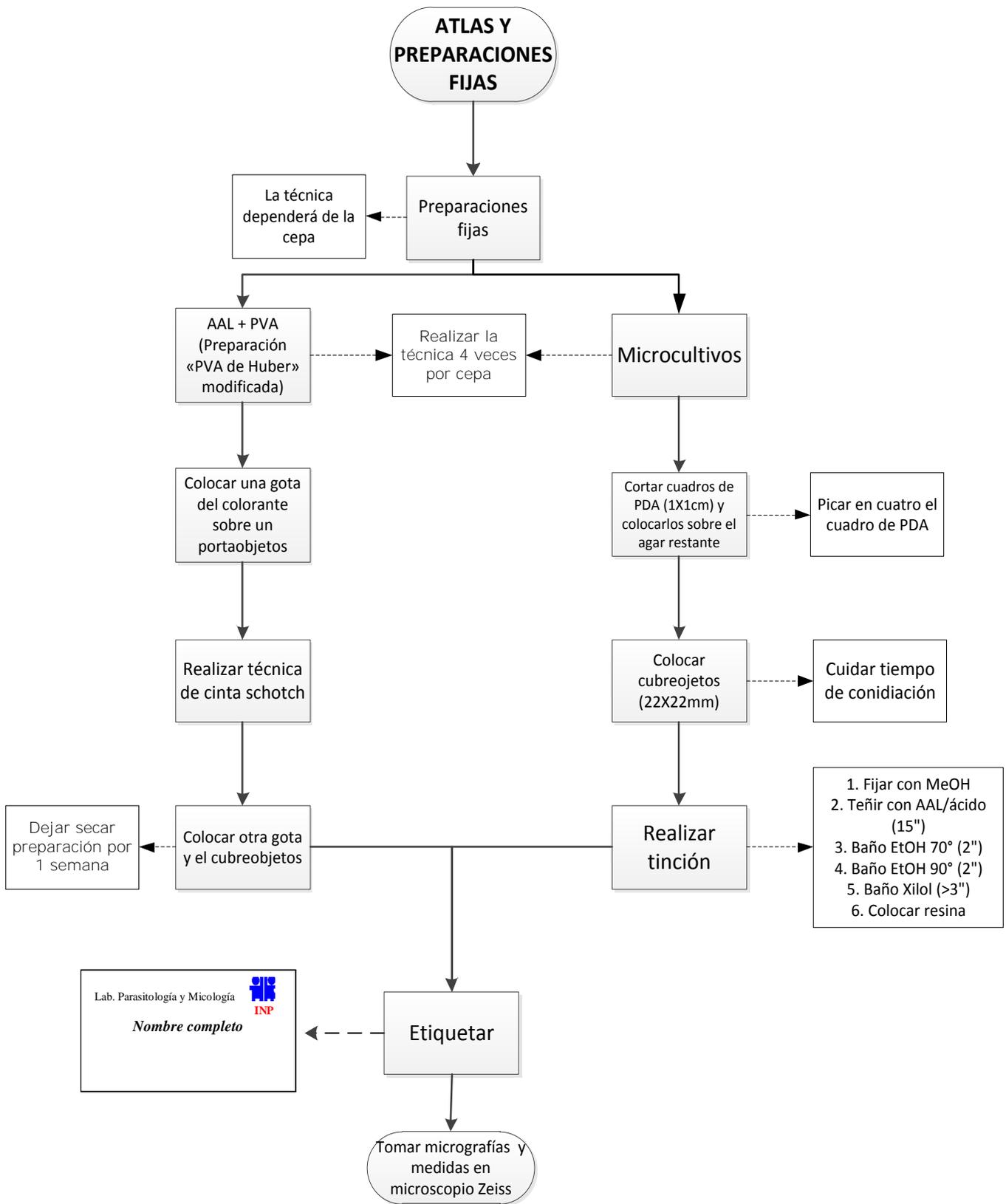
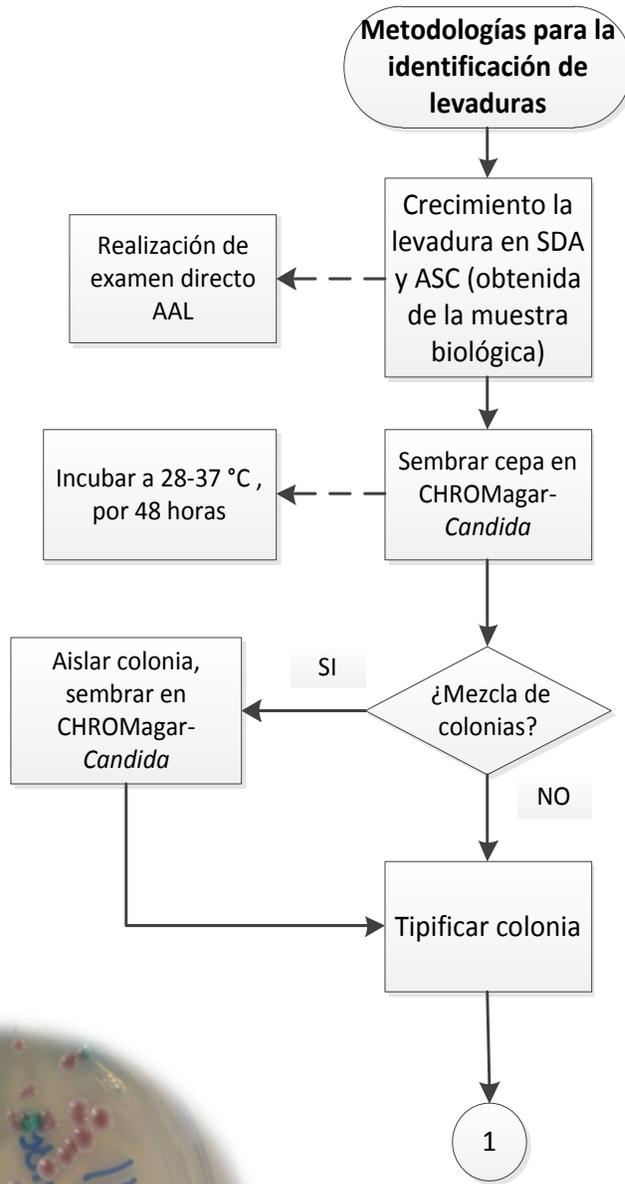


Diagrama 5. Elaboración de preparaciones fijas, microcultivos y Atlas de cepas miceliales y levaduriformes.



*CHROMagar-Candida es un auxiliar para las pruebas de identificación comerciales, en base al color que desarrolle la colonia



Figura 5. Medio CHROMagar-Candida, mezcla de colonias

Diagrama 6. Aislamiento de las levaduras obtenidas de muestras biológicas.

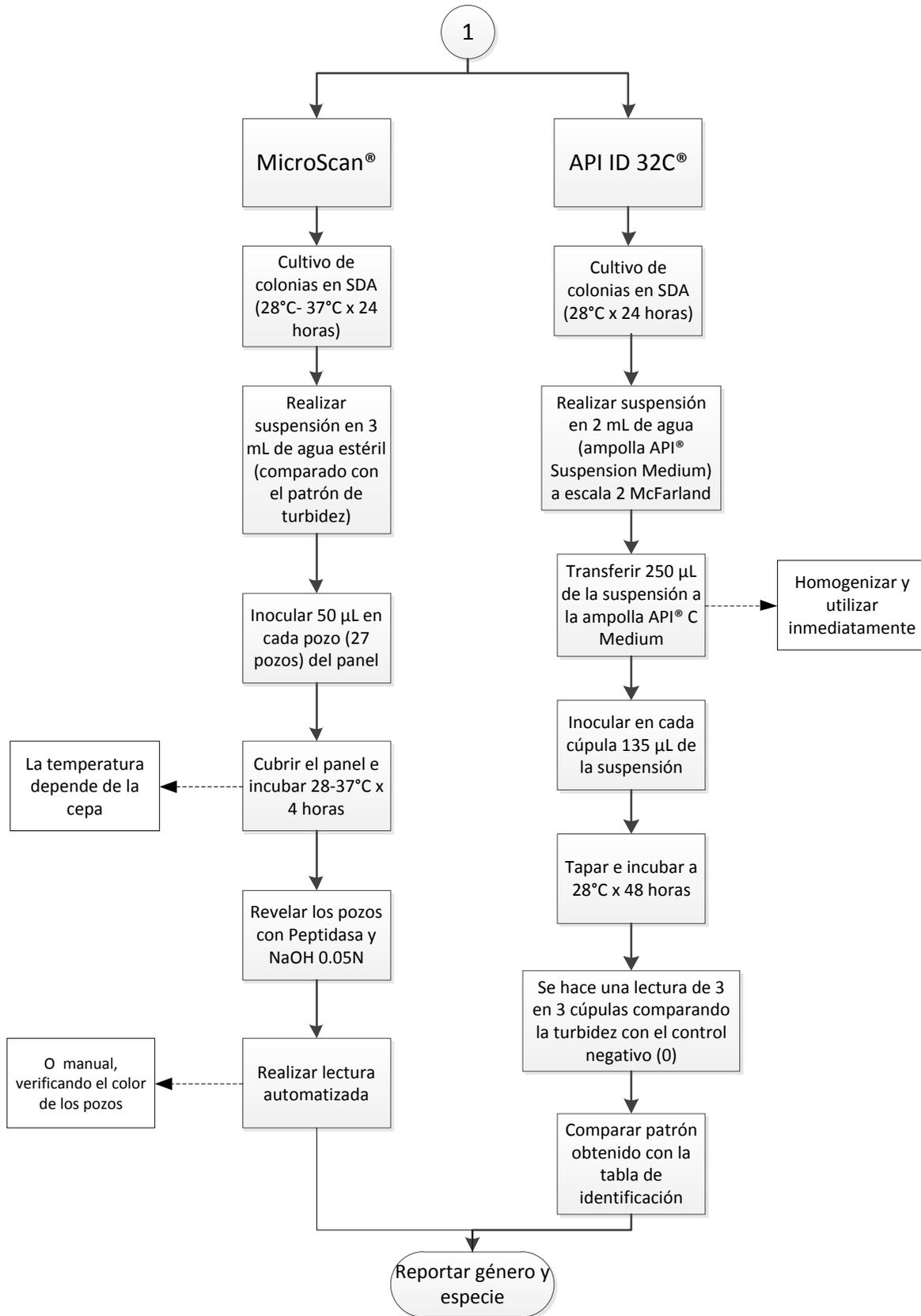


Diagrama 7. Técnicas para la tipificación de levaduras obtenidas de muestras de pacientes y cepas de referencia ATCC.

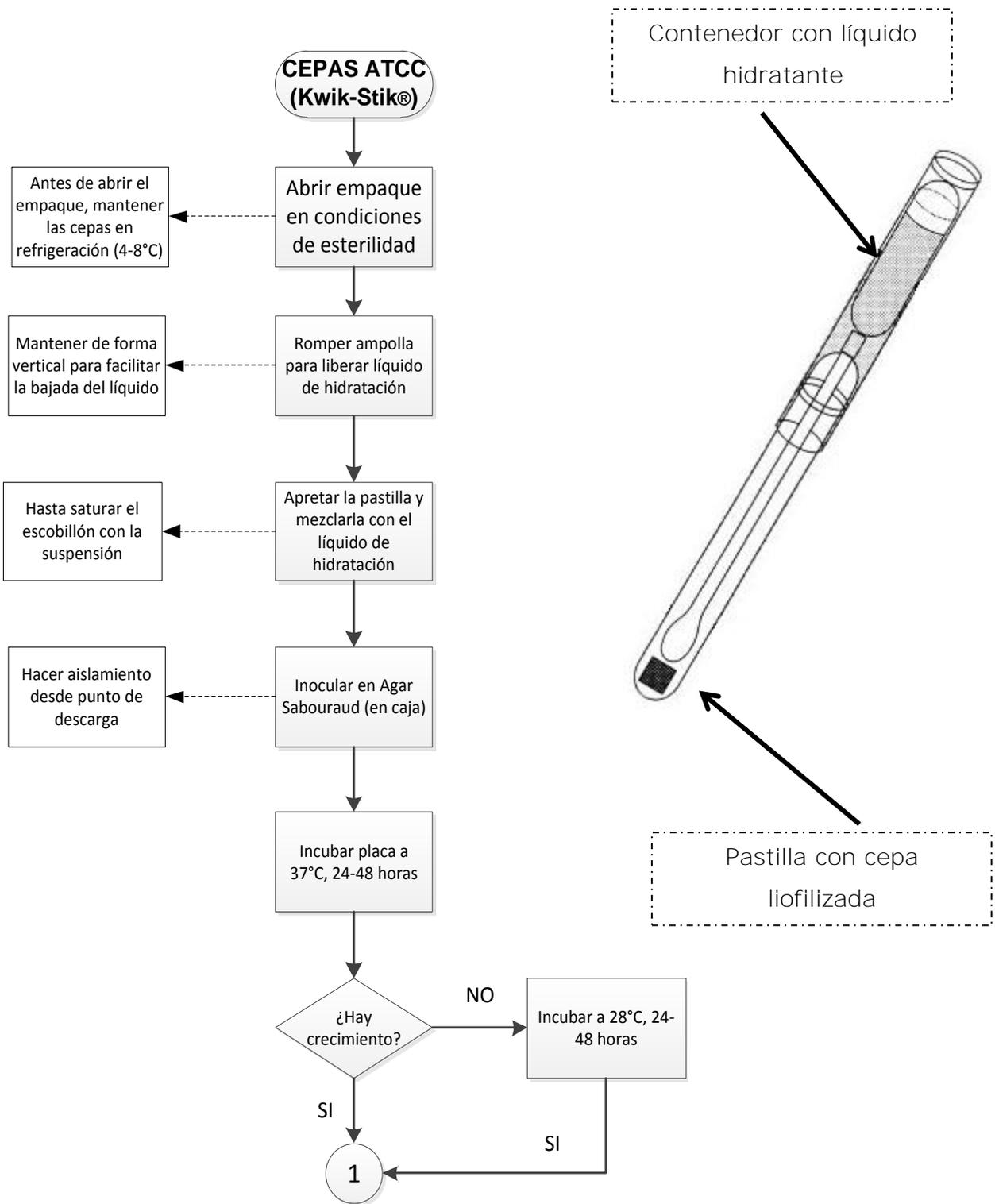


Diagrama 8. Obtención de cepas ATCC liofilizadas del kit comercial Kwik-Stik®.

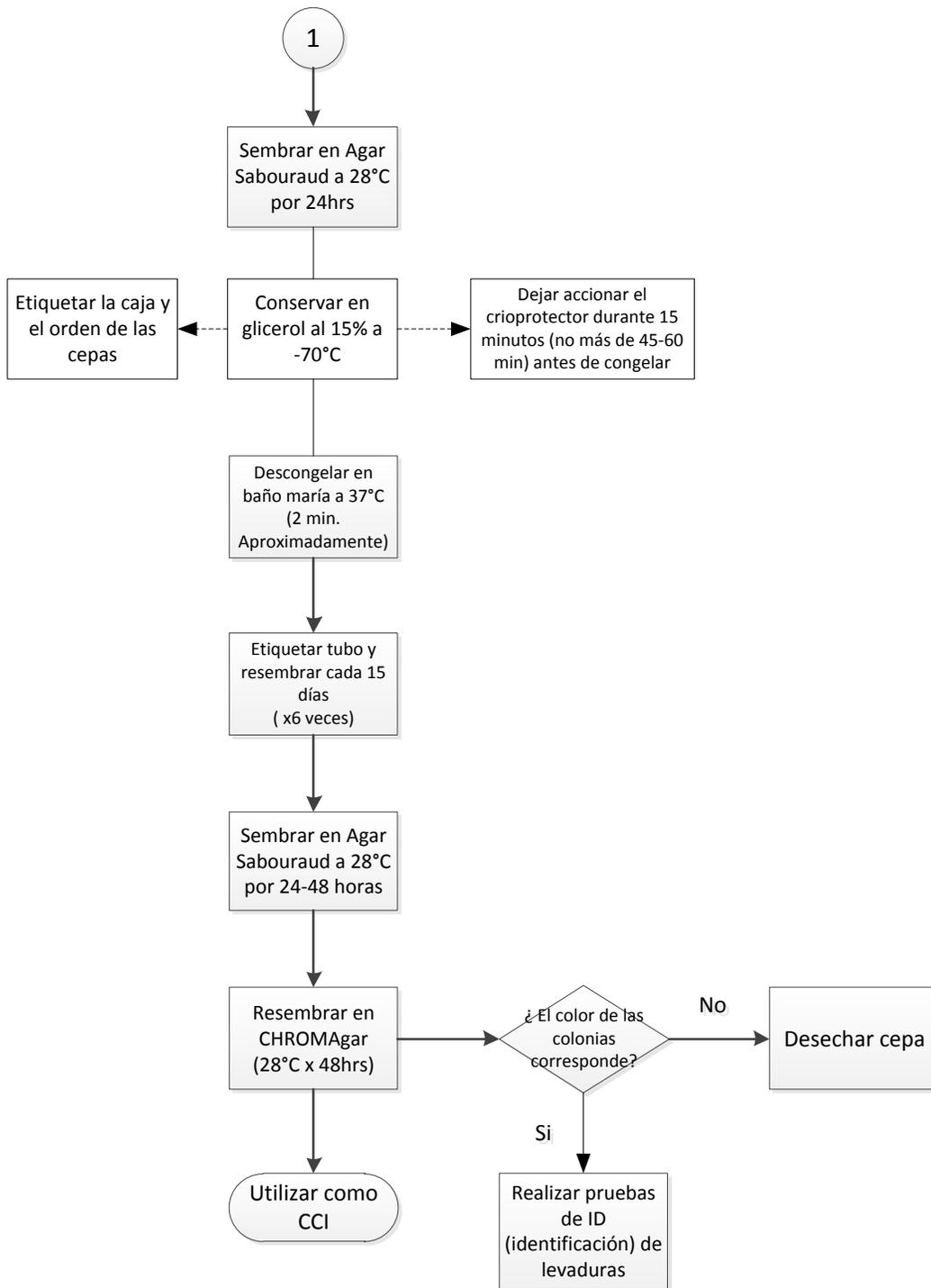


Diagrama 9. Almacenamiento y recuperación de cepas ATCC.

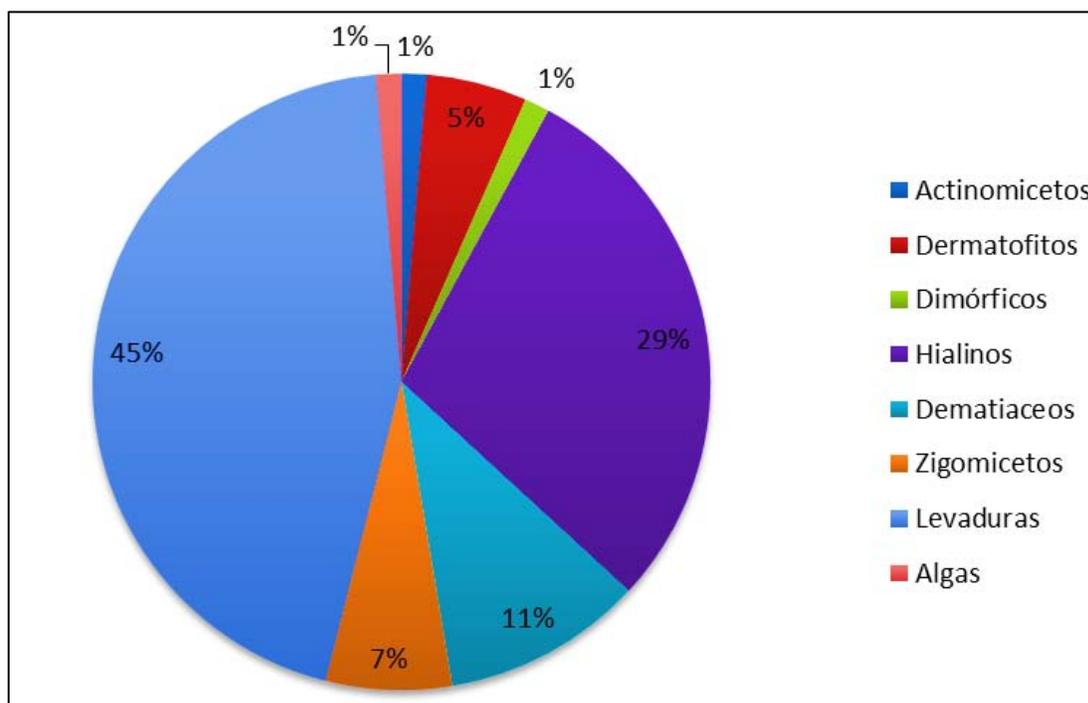
VII. RESULTADOS

Inicialmente el laboratorio de Micología contaba con 76 cepas conservadas por diferentes métodos, que se muestran en el Cuadro 2. La cuales, una vez recuperadas, fueron probadas durante 6 meses (180 días) con técnicas de conservación tomadas de la literatura como lo son: la conservación en arena y chakirón para las cepas miceliales y, glicerol al 10% para las levaduras, comprobando la viabilidad, pureza y estabilidad morfológica mediante el cultivo en PDA y ASD, respectivamente. De la misma forma se preservó en formol al 10% las muestras biológicas que tenían un alto contenido de estructuras micóticas, comprobando su estabilidad morfológica al microscopio.

A las cepas, también se les realizó el montaje de preparaciones fijas con AAL + PVA y la aplicación de la técnica de momificación a los cultivos para la fijación de las características macroscópicas, cabe destacar que ya existían microcultivos como parte de la Micoteca y solo se les realizó a los zigomicetos, ya que no se contaba con material de estos. Con las preparaciones fijas se obtuvo una serie de microfotografías y medidas de las estructuras de los hongos obtenidos en el laboratorio, las cuales se conjuntaron con fotografías de las colonias, muestras biológicas y lesiones que generan cuando están infectado, para la elaboración de un Atlas de Micología Médica.

Cuadro 2. Origen de recuperación de las cepas de trabajo.

Hongos	Agua	ASD	SSI	Alpiste negro	PDA	Total
Actinomicetos	1	0	0	0	0	1
Dermatofitos	2	0	0	0	2	4
Dimórficos	1	0	0	0	0	1
Hialinos	4	0	0	0	18	22
Dematiáceos	3	0	0	0	5	8
Zigomicetos	4	0	0	0	1	5
Levaduras	7	25	0	2	0	34
Algas	0	0	1	0	0	1
Total	22	25	1	2	26	76



Gráfica 1. Porcentaje inicial de las cepas de trabajo que se utilizaron para la elaboración de la Micoteca.

6.1 Métodos de conservación

Cuadro 3. Viabilidad, pureza y estabilidad morfológica de las cepas miceliales y levaduriformes conservadas en arena.

Género y especie	Examinados	Viabilidad	Pureza	Estabilidad morfológica	Fallidas
Dermatofitos					
<i>E. floccosum</i>	2	-			2
<i>M. canis</i>	2	-			2
<i>T. rubrum</i>	2	-			2
<i>T. mentagrophytes</i>	2	-			2
Hialinos					
<i>A. clavatus</i>	2	+	+	+	
<i>A. flavus</i>	2	+	+	+	
<i>A. flavus</i>	2	+	+	+	
<i>A. fumigatus</i>	2	+	+	+	
<i>A. glaucus</i>	2	+	+	+	
<i>A. nidulans</i>	2	+	+	+	
<i>A. niger</i>	2	+	+	+	
<i>A. ochraceus</i>	2	+	+	+	
<i>A. terreus</i>	2	+	+	+	
<i>A. versicolor</i>	8	+	±	+	4
<i>Acremonium sp.</i>	2	±	+	+	2
<i>Beauveria sp.</i>	2	+	+	+	
<i>F. oxysporum</i>	2	+	+	+	
<i>F. solani</i>	2	+	+	+	
<i>P. lilacinus</i>	2	+	+	+	
<i>Penicillium sp.</i>	4	+	+	±	
<i>S. brevicaulis</i>	2	-			2
<i>Trichoderma sp.</i>	2	±	+	±	2
Dematiáceos					
<i>Alternaria sp.</i>	2	+	+	+	

<i>Cladosporium sp.</i>	2	+	-	+	2
<i>Curvularia sp.</i>	2	+	+	+	
<i>F. pedrosoi</i>	2	+	+	+	
<i>Madurella grisea</i>	2	+	+	+	
<i>S. apiospermum</i>	2	-	+	+	2
<i>S. chartarum</i>	2	±	+	+	2
Levaduriformes					
<i>Geotrichum sp.</i>	2	+	+	+	
Zigomicetos					
<i>Cunninghamella sp.</i>	2	+	+	+	
<i>Mucor sp.</i>	2	+	+	+	
<i>Rhizomucor sp.</i>	2	+	+	+	
<i>Rhizopus sp.</i>	2	+	+	+	
<i>Syncephalastrum sp.</i>	2	+	+	+	
Total	78				24
Porcentaje recuperado (%) 81.3					
Porcentaje perdido (%) 18.7					

Cuadro 4. Viabilidad, pureza y estabilidad morfológica de las cepas miceliales y levaduriformes conservadas en Chakirón.

Género y especie	Cantidad	Viabilidad	Pureza	Estabilidad morfológica	No viables
Hialinos					
<i>A. flavus</i>	2	+	+	+	
<i>A. fumigatus</i>	2	+	+	+	
<i>A. glaucus</i>	2	+	+	+	
<i>A. nidulans</i>	2	+	+	+	
<i>A. niger</i>	2	+	+	+	
<i>A. ochraceus</i>	2	+	+	+	
<i>A. terreus</i>	2	+	+	+	
<i>A. versicolor</i>	8	+	+	+	
<i>Beauveria sp.</i>	2	+	+	+	
<i>F. solani</i>	2	+	+	+	
<i>F. oxysporum</i>	2	+	+	+	
<i>P. lilacinus</i>	2	+	+	+	
<i>Penicillium sp.</i>	4	+	+	+	
<i>S. brevicaulis</i>	2	-			2
<i>Trichoderma sp.</i>	2	+	+	+	
<i>Acremonium sp.</i>	2	+	+	+	
Dematiáceos					
<i>Alternaria sp.</i>	2	+	+	±	
<i>Curvularia sp.</i>	2	±	+	+	2
<i>C. carrionii</i>	2	+	+	+	
<i>Cladosporium sp.</i>	2	+	+	+	2

<i>S. chartarum</i>	2	+	+	+	
<i>F. pedrosoi</i>	2	+	+	+	
<i>Madurella grisea</i>	2	-			2
<i>S. apiospermum</i>	2	+	+	+	
Dimórficos					
<i>S. schenckii</i>	2	+	+	+	
Levaduriformes					
<i>Geotrichum sp.</i>	2	+	+	+	
Zigomicetos					
<i>Cunninghamella sp.</i>	2	±	+	+	2
<i>Mucor sp.</i>	2	+	+	+	
<i>Rhizopus sp.</i>	2	±	+	+	2
<i>Syncephalastrum sp.</i>	2	+	+	+	
<i>Rhizomucor sp.</i>	2	+	+	+	
Total	70				12
Porcentaje recuperado (%) 91.6					
Porcentaje perdido (%) 8.4					

Cuadro 5. Viabilidad, pureza y estabilidad morfológica de cepas miceliales y una alga, conservadas en SSI (0.9%).

Género y especie	Cantidad	Viabilidad	Pureza	Estabilidad morfológica	No viables
Dermatofitos					
<i>E. floccosum</i>	2	-	-		2
<i>M. canis</i>	2	+	+	+	
<i>T. rubrum</i>	2	+	+	+	
<i>T. mentagrophytes</i>	2	+	+	+	
Algas					
<i>P. wickerhamii</i> ^a	2	+	+	+	
Total	10				2
Porcentaje recuperado (%)	80		Porcentaje perdido (%)		20

^a Conservada en SSI al 0.4%

Cuadro 6. Viabilidad y pureza de cepas conservadas en Glicerol al 10%

Cepa	Cantidad	Viabilidad	Pureza	No viables
Levaduras				
<i>C. albicans</i>	8	+	+	
<i>C. famata</i>	2	+	+	
<i>C. glabrata</i>	2	+	+	
<i>C. guilliermondii</i>	2	+	+	
<i>C. krusei</i>	4	+	+	
<i>C. lusitaniae</i>	4	+	+	
<i>C. parapsilosis</i>	20	+	+	
<i>C. tropicalis</i>	10	+	+	
<i>C. utilis</i>	2	+	+	
<i>C. neoformans</i>	2	-		2
<i>C. uniguttulatus</i>	2	+	+	
<i>Rhodotorula sp.</i>	2	+	+	
<i>S. cerevisiae</i>	4	+	+	
<i>T. cutaneum</i>	2	+	+	
Actinomicetos				
<i>N. brasiliensis</i>	2	-		2
Algas				
<i>P. wickerhamii</i>	2	-		2
Dermatofitos				
<i>E. floccosum</i>	2	-		2
<i>M. canis</i>	2	-		2
<i>T. rubrum</i>	2	-		2
<i>T. mentagrophytes</i>	2	-		2
Total				
	78			14
Porcentaje recuperado (%)	89.1	Porcentaje perdido (%)	10.9	

Cuadro 7. Comparación del tiempo de preservación para cada método de conservación de hongos miceliales, hongos levaduriformes, actinomicetos y algas.

Cepa	Métodos de conservación				
	Tiempo de conservación en Agua (años)	Tiempo de conservación en Arena (días)	Tiempo de conservación en Chakirón (días)	Tiempo de conservación en SSI (días)	Tiempo de conservación en Glicerol al 10% (días)
Levaduras					
<i>C. albicans</i>					180
<i>C. famata</i>	3				180
<i>C. glabrata</i>					180
<i>C. guilliermondii</i>	12				180
<i>C. krusei</i>	5				180
<i>C. lusitaniae</i>					180
<i>C. neoformans</i>					NHD
<i>C. parapsilosis</i>					180
<i>C. tropicalis</i>					180
<i>C. uniguttulatus</i>					180
<i>C. utilis</i>	2				180
<i>Geotrichum sp.</i>	11	180	180		180
<i>K. ohmeri</i>	NHD				
<i>Rhodotorula sp.</i>					180
<i>S. cerevisiae</i>					
<i>T. cutaneum</i>	1				180
Dermatofitos					
<i>E. floccosum</i>	4 (Contaminada)				
<i>M. canis</i>		NHD		180	NHD
<i>T. mentagrophytes</i>	4	NHD		180	NHD

<i>T. rubrum</i>		NHD		180	NHD
Dimórficos					
<i>S. schenckii</i>	9		180		
Hialinos					
<i>A. clavatus</i>	11	180			
<i>A. flavus</i>	5	180	180		
<i>A. fumigatus</i>	3	180	180		
<i>A. glaucus</i>		180	180		
<i>A. nidulans</i>		180	180		
<i>A. niger</i>	5	180	180		
<i>A. ochraceus</i>	11	180	180		
<i>A. terreus</i>	3	180	180		
<i>A. versicolor</i>	9	180	180		
<i>Acremonium sp.</i>	9	150	180		
<i>Beauveria sp.</i>		180	180		
<i>F. oxysporum</i>		180	180		
<i>F. solani</i>		180	180		
<i>Fusarium sp.</i>	5				
<i>Neurospora sp.</i>	5 (Contaminada)				
<i>P. lilacinus</i>	4	180	180		
<i>Penicillium sp.</i>	5	180	180		
<i>S. brevicaulis</i>	3	NHD	NHD		
<i>Trichoderma sp.</i>		120	180		
Dematiáceos					
<i>Alternaria sp.</i>	4	180	180		
<i>C. carrionii</i>			180		
<i>Cladosporium sp.</i>		30	180		

		(Contaminada)			
<i>Curvularia sp.</i>	5	180	90		
<i>F. pedrosoi</i>		180	180		
<i>Madurella grisea</i>		180	NHD		
<i>Nigrospora sp.</i>	10 (Contaminada)				
<i>S. apiospermum</i>	3	60	120		
<i>S. chartarum</i>	4	90	180		
Zigomicetos					
<i>Cunninghamella sp.</i>	8	180	120		
<i>Mucor sp.</i>	3	180	180		
<i>Rhizomucor sp.</i>		180	180		
<i>Rhizopus sp.</i>	4	180	120		
<i>Syncephalastrum sp.</i>	3	180	180		
Algas					
<i>P. wickerhamii</i>	3			3	
Actinomicetos					
<i>N. brasiliensis</i>	9	NHD			NHD

Cuadro 8. Estructuras micóticas obtenidas de diversas muestras de pacientes del INP conservadas con Formol al 10%

Estructura micótica	Conservadas con KOH	Conservadas sin KOH
Hifas hialinas, dicotómicas, septadas y macrosifonadas	7	2
Pseudohifas y blastoconidios	1	12
Pseudohifas y cúmulo de blastoconidios	0	1
Hifas hialinas, dicotómicas, septadas y conidios	0	1
Total	8	17



Imagen 1. Microfotografías de muestras biológicas conservadas con Formol al 10%. **A)** Hifas hialinas, septadas, dicotómicas y macrosifonadas observadas en muestra de A.B. (Conservada 07/2014) y **B)** Pseudohifas y blastoconidios observadas en muestra de orina (Conservada 09/2014).

6.2 Preparaciones fijas (Comparación de técnicas)

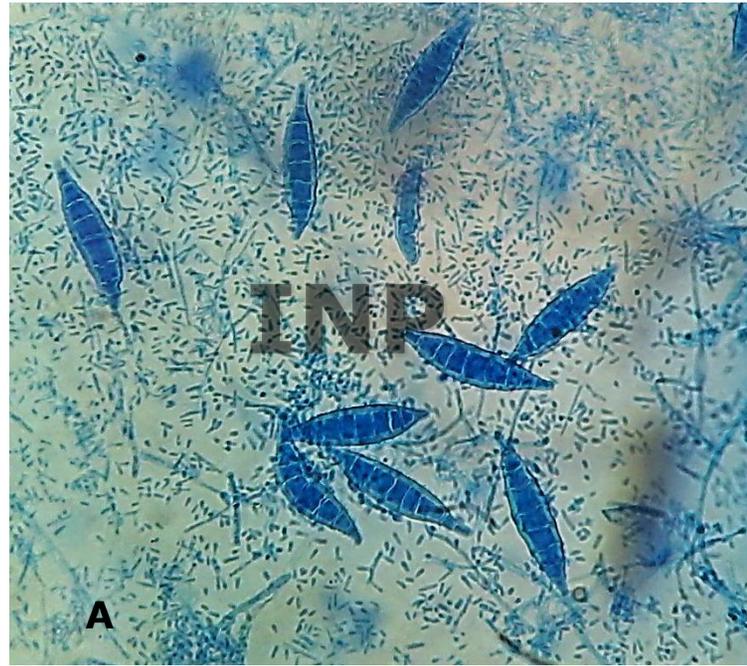
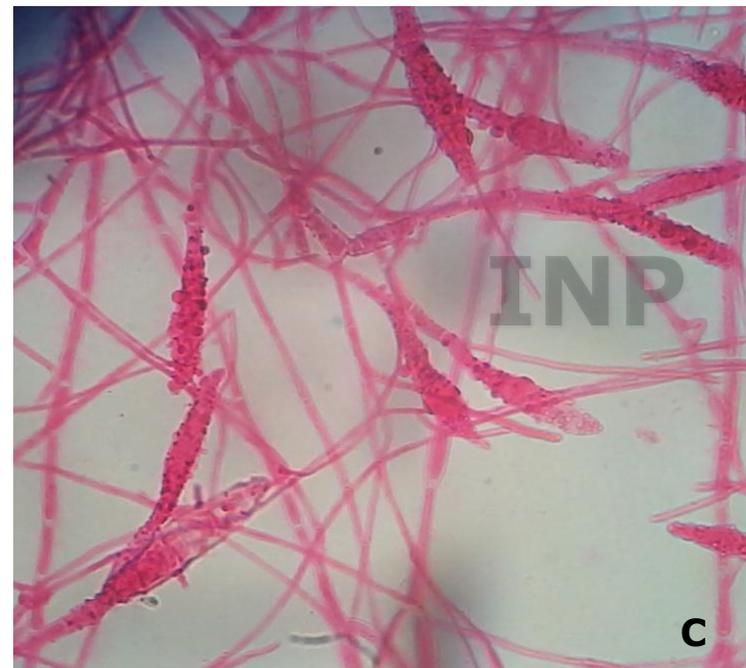
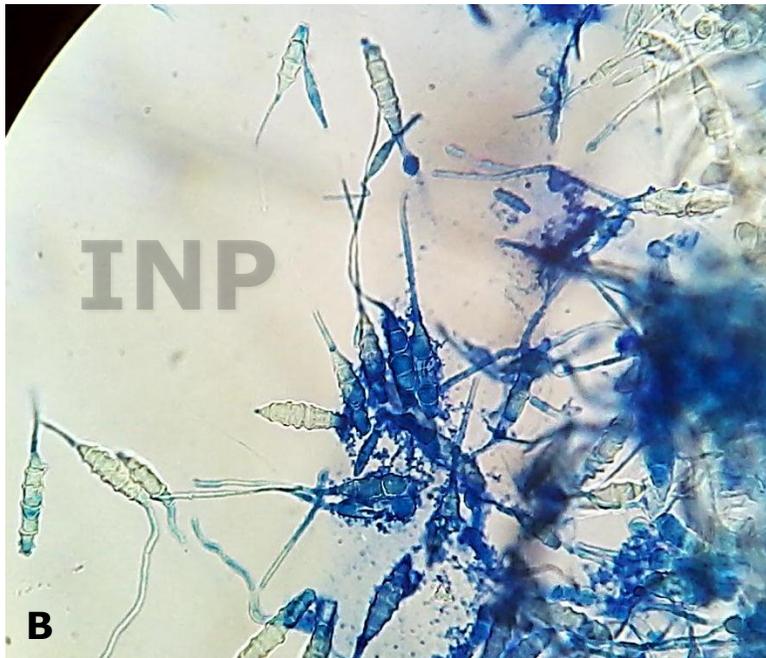


Imagen 2. Microfotografías de *M. canis*.

A) Macroconidios ($30 \times 120 \mu\text{m}$) de más de 6 septos con múltiples microconidios sueltos ($3.5 \times 11 \mu\text{m}$), de pared gruesa. Preparación fija con AAL + PVA (40x).

B) Macroconidios de más de 6 septos con abundantes fragmentos de hifas. Microcultivo teñido con AAL (20x).

C) Macroconidios y fragmentos de hifas. Microcultivo teñido con PAS (40x).



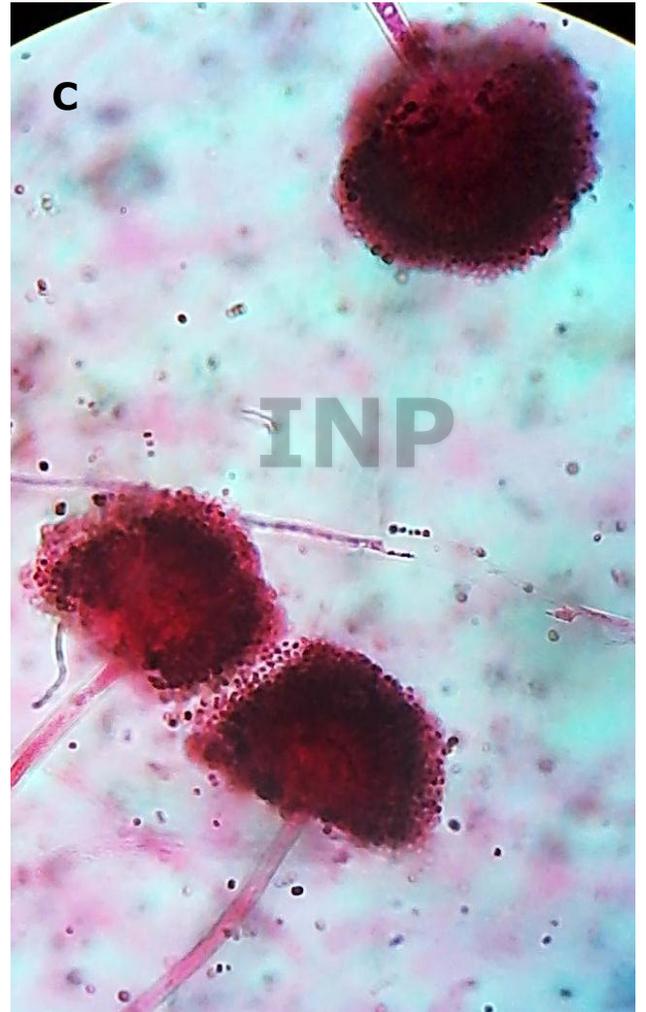
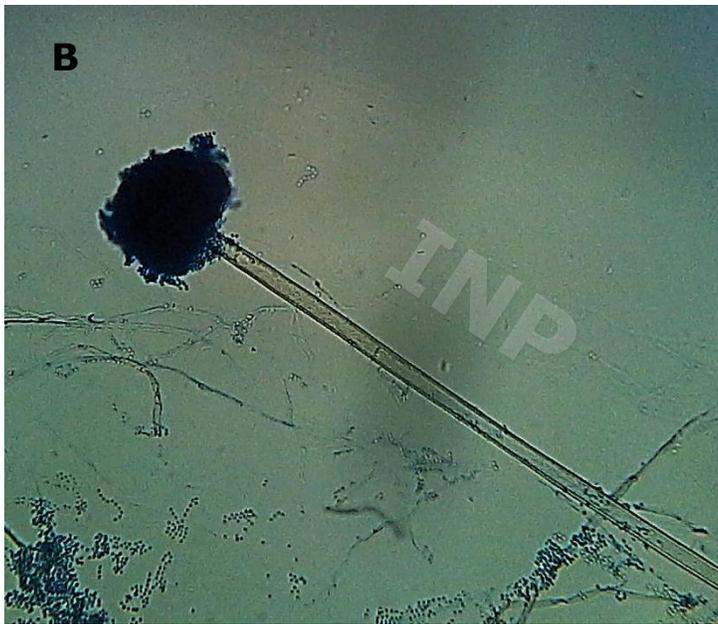
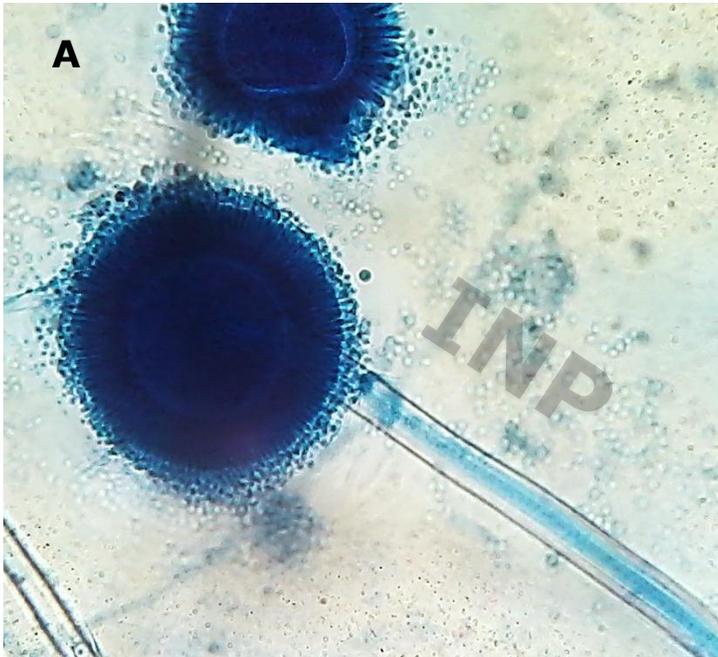


Imagen 3. Microfotografías de *A. niger*. La vesícula es ovalada ($\sim 75\mu\text{m}$), donde nace una doble serie de fiálides largas, gruesas, compactas que se disponen a 360° y múltiples microconidios espiculados ($4\text{-}6\mu\text{m}$).

A) Preparación fija con AAL + PVA (40x),

B) Microcultivo teñido con AAL (10x)

C) Microcultivo teñido con PAS (20x).

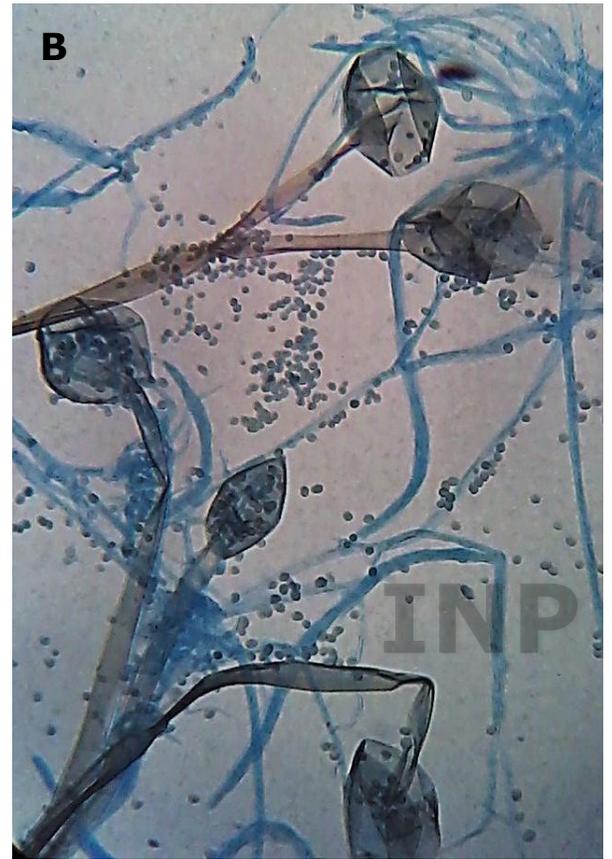
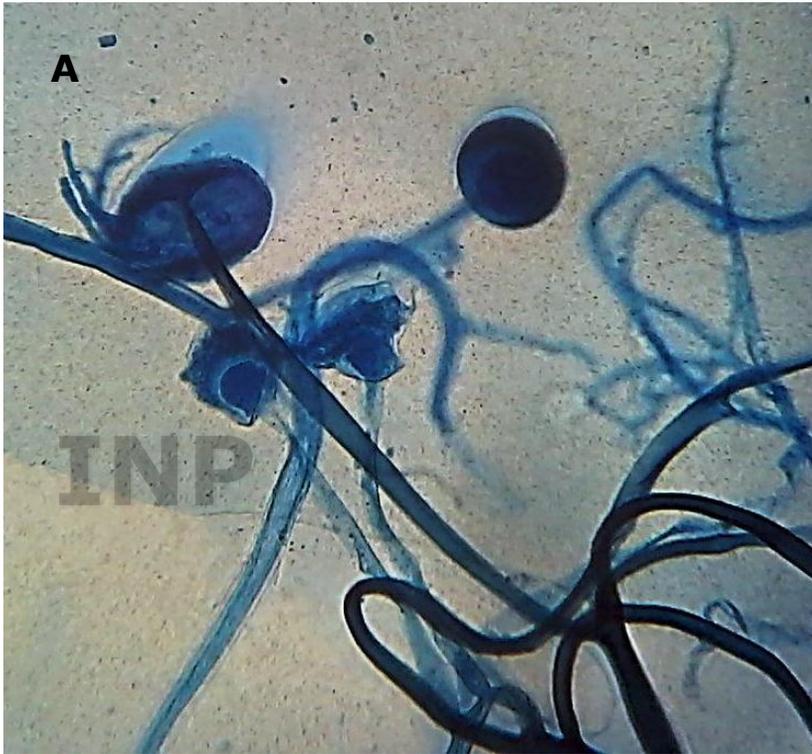


Imagen 4. Microfotografías *Rhizopus sp.*

A) Esporangio ovoide (185-264 μm); micelio cenocítico, macrosifonado, hialino y no ramificado, presenta rizoides y esporangios reventados (en forma de sombrero chino). Preparación fija con AAL + PVA (20x).

B) Esporangios reventados (en forma de sombrero chino) con múltiples conidios libres, micelio cenocítico, macrosifonado, hialino y no ramificado. En la esquina superior derecha se observan rizoides. Microcultivo teñido con AAL (20x). Micrografía de *Cunninghamella sp.*

C) Vesícula redonda (23-60 μm), las esterigmatas son cortas de donde nacen los esporangiolos originando esporangiosporas. El esporangióforo es corto. Microcultivo teñido con AAL (40x).

Cuadro 9. Estructuras fúngicas y cantidad Preparaciones fijas

Cepa	Cantidad	Cepa	Cantidad
<i>T. rubrum</i>	20	<i>T. mentagrophytes</i>	14
<i>M. canis</i>	15	<i>T. tonsurans</i>	3
<i>E. floccosum</i>	1	<i>M. gypseum</i>	6
<i>M. furfur</i>	2	<i>N. brasiliensis</i>	5
<i>Madurella grisea</i>	6	<i>S. schenckii</i>	6
<i>F. pedrosoi</i>	13	<i>C. carrionii</i>	8
<i>P. verrucosa</i>	2	<i>Exophiala sp.</i>	3
Células fumagoides	3	<i>C. immitis</i>	3
<i>H. capsulatum</i>	4	<i>Levaduras</i>	3
<i>Candida sp.</i>	1	<i>C. albicans</i>	8
<i>C. famata</i>	3	<i>C. glabrata</i>	3
<i>C. guilliermondii</i>	3	<i>C. krusei</i>	3
<i>C. lusitaniae</i>	3	<i>C. parapsilosis</i>	3
<i>C. tropicalis</i>	3	<i>Malassezia sp.</i>	4
<i>C. neoformans</i>	8	<i>Geotrichum sp.</i>	6
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	9	<i>A. clavatus</i>	11
<i>A. flavus</i>	19	<i>A. fumigatus</i>	14
<i>A. glaucus</i>	8	<i>A. nidulans</i>	8
<i>A. niger</i>	12	<i>A. ochraceus</i>	6
<i>A. terreus</i>	14	<i>A. versicolor</i>	16
<i>A. amstelodami</i>	3	<i>Cunninghamella sp.</i>	4
<i>Mucor sp.</i>	3	<i>Rhizopus sp.</i>	3
<i>Rhizomucor sp.</i>	4	<i>Syncephalastrum sp.</i>	1
<i>Acremonium sp.</i>	10	<i>Beauveria sp.</i>	10
<i>F. solani</i>	6	<i>F. oxysporum</i>	4
<i>Fusarium sp.</i>	32	<i>Paecilomyces sp.</i>	1
<i>P. lilacinus</i>	5	<i>S. brevicaulis</i>	4
<i>S. apiospermum</i>	6	<i>Rhodotorula sp.</i>	3
<i>Saccharomyces sp.</i>	3	<i>Trichosporon sp.</i>	3
<i>Neurospora sp.</i>	8	<i>Penicillium sp.</i>	12
<i>Trichoderma sp.</i>	8	<i>Alternaria sp.</i>	19
<i>Cladosporium sp.</i>	3	<i>Curvularia sp.</i>	8
<i>S. chartarum</i>	5	<i>Epicoccum sp.</i>	1
<i>Exserohilum sp.</i>	1	<i>Aspergillus sp.</i>	23
Escamas de piel	3	Sinema de <i>Scedosporium sp.</i>	4
Cleistotecios de <i>Scedosporium sp.</i>	1	Cleistotecios + sinema de <i>Scedosporium sp.</i>	1
Tinción de Grocott para <i>P. jirovecii</i>	1	<i>H. werneckii</i>	2
<i>C. utilis</i>	3	<i>S. acremonium</i>	4
<i>Tritirachium sp.</i>	4	Total	498

6.3 Cepas momificadas

Cuadro 10. Tiempo de conservación y cantidad de cepas momificadas.

Cepa	Año de conservación			Cantidad
Levaduras				
<i>C. albicans</i>	1978			1
<i>Geotrichum sp.</i>	2015			1
Dermatofitos				
<i>E. floccosum</i>	1990			2
<i>M. canis</i>	S/A	1989	2015	4
<i>T. mentagrophytes</i>	1987	1989	2015	4
<i>T. rubrum</i>	2015			2
<i>T. tonsurans</i>	1985	1992		2
Dimórficos				
<i>B. dermatitidis</i>	S/A	1970		3
<i>C. posadasii</i> (Difásico)	1993			3
<i>H. capsulatum</i>	1988			1
<i>P. brasiliensis</i>	1969	1990		4
<i>S. schenckii</i>	1989	2015		3
Hialinos				
<i>Acremonium sp.</i>	2015			1
<i>A. clavatus</i>	2015			1
<i>A. flavus</i>	1989	2015		2
<i>A. fumigatus</i>	2015			1
<i>A. glaucus</i>	2015			1
<i>A. nidulans</i>	2015			1
<i>A. niger</i>	1990	2015		3
<i>A. ochraceus</i>	2015			1
<i>A. terreus</i>	2015			1
<i>A. versicolor</i>	2015			1
<i>Beauveria sp.</i>	2015			1
<i>F. oxysporum</i>	2015			1
<i>F. solani</i>	2015			1
<i>Paecilomyces sp.</i>	2015			1
<i>Penicillium sp.</i>	1990	2015		2
<i>S. brevicaulis</i>	2015			1
<i>Trichoderma sp.</i>	2015			1
<i>Tritirachium sp.</i>	2015			1
Dematiáceos				
<i>Alternaria sp.</i>	1989	2015		2

<i>C. carrionii</i>	1989	2015		2
<i>Cladosporium sp.</i>	2015			1
<i>Curvularia sp.</i>	2015			1
<i>Drechslera sp.</i>	1990	S/A		4
<i>F. compacta</i>	1989	1990		2
<i>F. pedrosoi</i>	1989	2015		3
<i>H. werneckii</i>	1990			2
<i>Madurella sp.</i>	2015			1
<i>S. apiospermum</i>	2015			1
<i>S. chartarum</i>	2015			1
Zigomicetos				
<i>Cunninghamella sp.</i>	2015			1
<i>Mucor sp.</i>	1989	2015		3
<i>Rhizomucor sp.</i>	2015			1
<i>Rhizopus sp.</i>	2015			1
<i>Syncephalastrum sp.</i>	2015			1
Actinomicetos				
<i>A. madurae</i>	S/A	1975	1989	4
<i>A. pelletieri</i>	1990			2
<i>N. asteroides</i>	S/A	1969		2
<i>N. brasiliensis</i>	1982			1
<i>N. otitidiscaviarum</i>	1989			3
Total				91

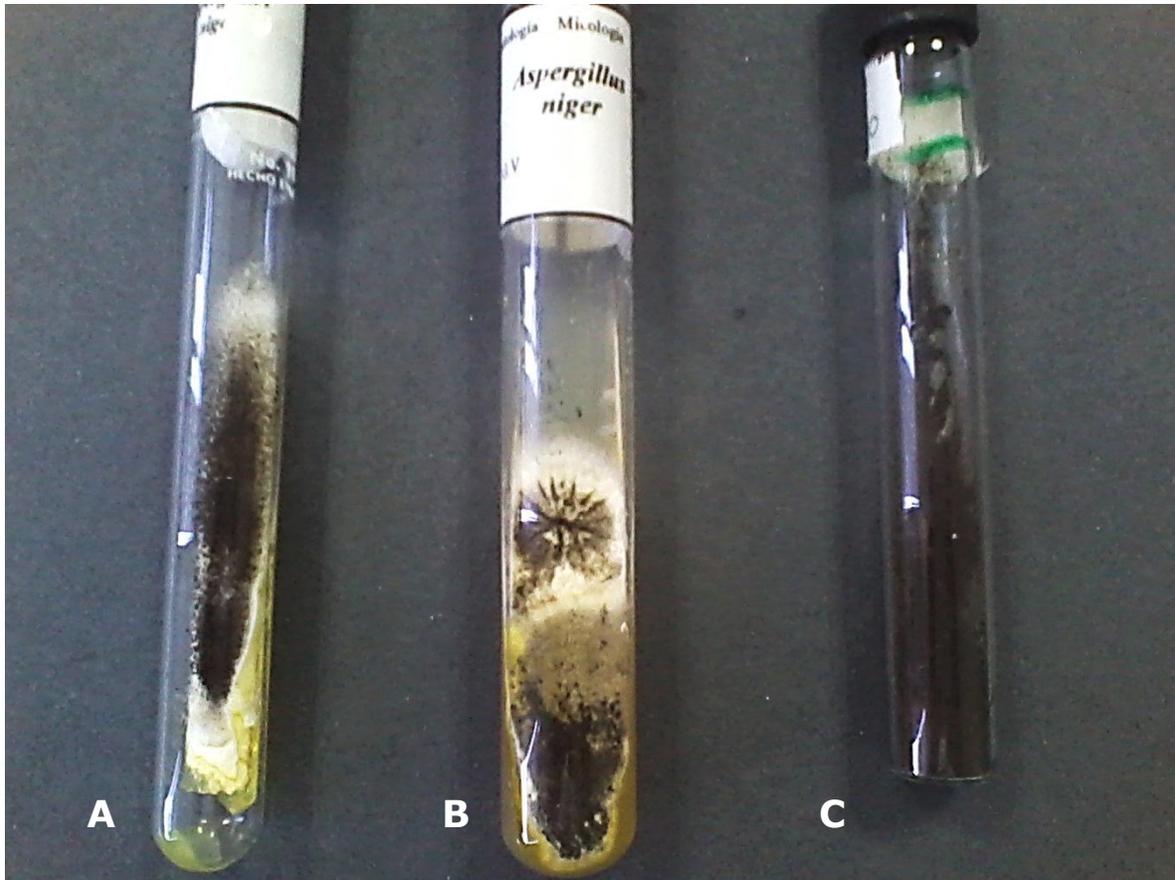


Imagen 5. Cultivos de cepas en ASD. **A)** *A. niger* momificada en 1990, **B)** *A. niger* momificada en 2015 y **C)** *A. niger* sin momificar.

Durante la estancia en el Laboratorio de Parasitología y Micología del INP, se agregaron cepas, además de las de trabajo (Cuadro 12).

	Total
Cepas conservadas	
Glicerol 10%	112
Arena	56
Chakirón	58
SSI 0.9%	19
Agua	135
Formol 10%	25
Preparaciones fijas	498
Cepas momificadas	91

Cuadro 11. Total final de material perteneciente a la Micoteca

Cuadro 12. Lista de nombres de cada microorganismo de la Micoteca.

Microorganismos		
Levaduras		
<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>Rhodotorula sp.</i>
<i>C. famata</i>	<i>C. utilis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>C. glabrata</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>T. asahii</i>
<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. uniguttulatus</i>	<i>T. cutaneum</i>
<i>C. krusei</i>	<i>Geotrichum sp.</i>	<i>T. inkin</i>
<i>C. lusitaniae</i>	<i>K. ohmeri</i>	<i>T. mucoides</i>
Dermatofitos		
<i>M. canis</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. rubrum</i>
<i>T. tonsurans</i>	<i>E. floccosum</i>	
Dimórficos		
<i>S. schenckii</i>	<i>B. dermatitidis</i>	<i>P. brasiliensis</i>
<i>H. capsulatum</i>	<i>C. posadasii</i>	
Hialinos		
<i>Acremonium sp.</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>P. lilacinus</i>
<i>A. amstelodami</i>	<i>A. terreus</i>	<i>Penicillium sp.</i>
<i>A. clavatus</i>	<i>A. versicolor</i>	<i>S. acremonium</i>
<i>A. flavus</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>S. brevicaulis</i>
<i>A. fumigatus</i>	<i>F. solani</i>	<i>Trichoderma sp.</i>
<i>A. niger</i>	<i>Fusarium sp.</i>	<i>Tritirachium sp.</i>
Dematiáceos		
<i>Alternaria sp.</i>	<i>Curvularia sp.</i>	<i>S. apiospermum</i>
<i>Cladophialophora sp.</i>	<i>F. pedrosoi</i>	<i>S. chartarum</i>
<i>Cladosporium sp.</i>	<i>Madurella grisea</i>	<i>H. werneckii</i>
<i>F. compacta</i>	<i>Drechslera sp.</i>	
Zigomicetos		
<i>Cunninghamella sp.</i>	<i>Rhizomucor sp.</i>	<i>Syncephalastrum sp.</i>
<i>Mucor sp.</i>	<i>Rhizopus sp.</i>	
Actinomicetos		
<i>N. brasiliensis</i>	<i>A. madurae</i>	<i>N. asteroides</i>
<i>N. otitidiscaviarum</i>	<i>A. pelletieri</i>	
Algas		
<i>Prototheca wickerhamii</i>		

6.4 Atlas (Anexo II)

Se realizó un atlas digitalizado de 163 páginas con cerca de 220 imágenes (macrocultivos: reverso y anverso, microfotografías, exámenes directos, casos de pacientes) y 68 especies diferentes. Con información de las micosis más comunes (ordenadas de acuerdo a la clasificación de Alexandro Bonifaz), medidas de las estructuras micóticas (Cuadro 13) y recomendaciones para una adecuada tipificación.

Cuadro 13. Comparación entre las medidas obtenidas con el microscopio Carl Zeiss y medidas obtenidas de referencias bibliográficas.^{10, 15,19}

Cepa	Medidas (µm)				
	Conidios		Conidióforo/ Esporangióforo	Vesícula/ Esporangio	Hifa/ Otros
	Micro	Macro			
Micosis superficiales					
<i>T. rubrum</i>	3.5 x 6.5 (2-3.5x3-5.5)				3-5
<i>T. mentagrophytes</i>	3.5-5 (4-6)				
<i>M. canis</i>	3.5 x 11	30x120-140 (10-25x35-110)			4-6
<i>E. floccosum</i>		9-12 x 42 (7-12 x 20-40)			
<i>M. gypseum</i>		14-18 x 68-86 (8-16 x 22-60)			

Micosis subcutáneas					
<i>S. schenckii</i>	2 x 3.5-4.5 (2-3 x 2-6)				1.5-2 (1.5-2)
<i>F. pedrosoi</i>	2.5-4.5 x 5-12 (1.5-3 x 2.5-6)				
<i>C. carrionii</i>	3-5.5 x 10 (1.5-3x2.5-6)				
Micosis profundas o sistémicas					
<i>H. capsulatum</i>		~19 (7-15)			
Micosis y seudomicosis por hongos oportunistas					
<i>C. albicans</i>	~8 (3.5-7 x 4-8)				
<i>C. parapsilosis</i>	4-6.5 (2.5-4 x 3-8)				
<i>C. glabrata</i>	4-8 (2-3 x 3-4)				
<i>C. kefyr</i>	5-9 (3-8 x 5-12)				
<i>C. krusei</i>	4-7.5 (2-6 x 4-10)				
<i>C. guilliermondii</i>	5.5-7 (2-5 x 3-7)				
<i>C. tropicalis</i>	4.5-9 (3.5-7x5.5-10)				
<i>C. neoformans</i>	4-8.5 (4-8)				
<i>Rhodotorula sp.</i>	3-6 (2.5-5x3-10)				

<i>Trichosporon sp.</i>	Blastoconidios: 6-8 (3.5-7.0x3.5-10) Arthroconidios: 2-3.5x6-9				
<i>Geotrichum sp.</i>	4.5-8 x 10.5-16.5 (4-10)				
<i>A. clavatus</i>	4 x 8 (2.5-4 x 3-6)		<1800 (500-2000)	48-71 x 150- 283 (40-60 x 250)	
<i>A. flavus</i>	5-6 (3-6)		19 x 589-1370 (8-18x400- 800)	~50 (20-65)	
<i>A. fumigatus</i>	~4 (2-3.5)		24-40	24 - 40 (20-30)	
<i>A. glaucus</i>	5-7 (5-8)		9-14 x 300 (8-15 x 300- 700)	21-28	Cleistotecios 71-111 (60-150)
<i>A. nidulans</i>	~5 (3-4)		62-197 (3-6 x 200)	14-20 (8-12)	Células Hüll 21-25 (10-25)
<i>A. niger</i>	4-6 (3.5-4.5)		11-30x1000- 4700 (12-17x400- 3000)	~75 (30-75)	
<i>A. ochraceus</i>	~5		7-17x132-523	33-43	
<i>A. terreus</i>	2-4 (2-2.5)		6-11 x 300 (4-7 x 300)	<30 (10-20)	
<i>A. versicolor</i>	~4 (2-3.5)		4-7 x 200-500 (6-300-500)	16-19 (9-16)	

<i>Cunninghamella sp.</i>	Diversos tamaños			Joven: 23 Maduras: 60 (14-65)	
<i>Mucor sp.</i>	~14 (4-8)			69-113 (50-100)	
<i>Rhizopus sp.</i>			(Hasta 3 mm)	185-264 (40-275)	
<i>Rhizomucor sp.</i>				<290 (40-100)	
<i>Syncephalastrum sp.</i>			Diversos tamaños	~52 (30-80)	Merosporangio 14-20 (12-40)
Hialohifomicosis y otras micosis poco frecuentes					
<i>Acremonium sp.</i>	2-3 x 8 (2-3 x 4-8)				1.5-4.5
<i>F. solani</i>	3-5 x 8.5-11.5	7-9.5 x 16-22	100-160 (largos)		
<i>F. oxysporum</i>	3.5-4.5	4-6.5 x 13-22	31-42 (Cortos)		
<i>P. lilacinus</i>	3 x 5 (2-2.2 x 2.5-3)				Fiálides ~17.5 Hifa~3
<i>S. brevicaulis</i>	6.5-13 (5-8)		4-8 x 22-26.5 (2.5-3.5x5- 10)		
<i>S. acremonium</i>	8.5-10.5 (5-6 x 8-14)G				
Hongos contaminantes					

<i>Neurospora sp.</i> (Anexo II)	Blastoconidios: 8x8-13 (5-10x10-15) Arthroconidios: 6-11.5				
<i>Penicillium sp.</i>	4.5 x 6.5 (2.5-5)				3-6 (1.5-5)
<i>Trichoderma sp.</i>	3.5-6 (2-5)				~5
<i>Tritirachium sp.</i>	~3				
<i>Alternaria sp.</i>		17.5-24x46.5-55 (8-16x23-50)			~6.5
<i>Cladosporium sp.</i>	8-14 (3-6x4-12)				~3.5
<i>Curvularia sp.</i>		Inmaduras: 14-20 x 31-40.5 Maduras: 20-24 x 56-73 (8-14x21-35)			
<i>Exserohilum sp.</i>		12-17x62.5-88 (14-80)			
<i>Nigrospora sp.</i>	~20 (14-20)				
<i>S. chartarum</i>	8-12x12-17 (4.5x9)				~7.5
<i>S. apiospermum</i>	7 x 12.5-18 (2-5 x 3-12)		2-4		~3

*Los datos entre paréntesis, son medidas teóricas.

***T. tonsurans*, *Malassezia sp.*, *H. werneckii*, *N. brasiliensis*, *Madurella grisea*, *P. carrionii*, *C. immitis*, *C. famata*, *C. utilis*, *K. ohmeri*, *Pneumocystis jirovecii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces sp.* También pertenecen al Atlas de Micología Médica.

6.5 Levaduras

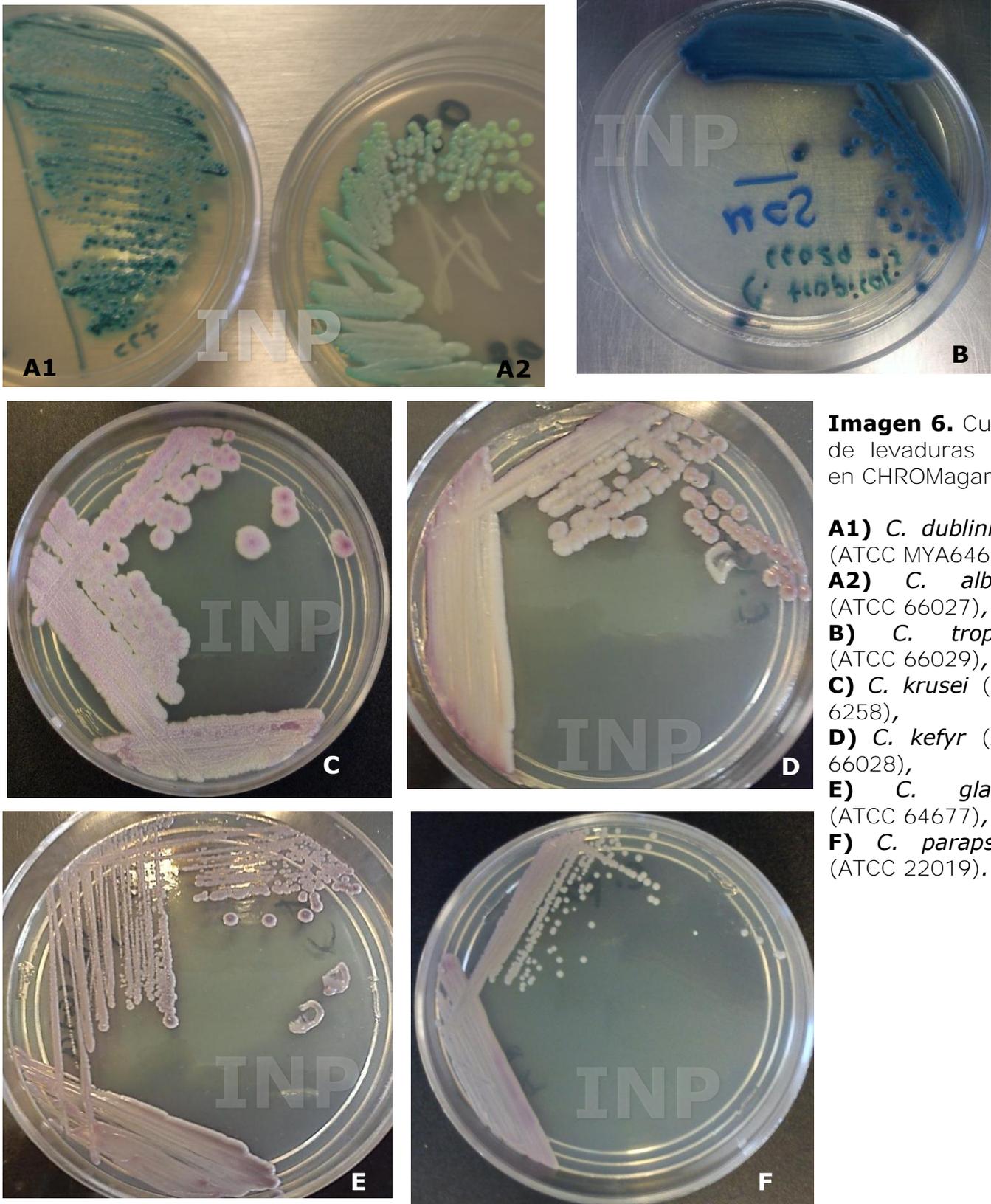


Imagen 6. Cultivos de levaduras ATCC en CHROMagar

- A1)** *C. dubliniensis* (ATCC MYA646),
- A2)** *C. albicans* (ATCC 66027),
- B)** *C. tropicalis* (ATCC 66029),
- C)** *C. krusei* (ATCC 6258),
- D)** *C. kefyr* (ATCC 66028),
- E)** *C. glabrata* (ATCC 64677),
- F)** *C. parapsilosis* (ATCC 22019).

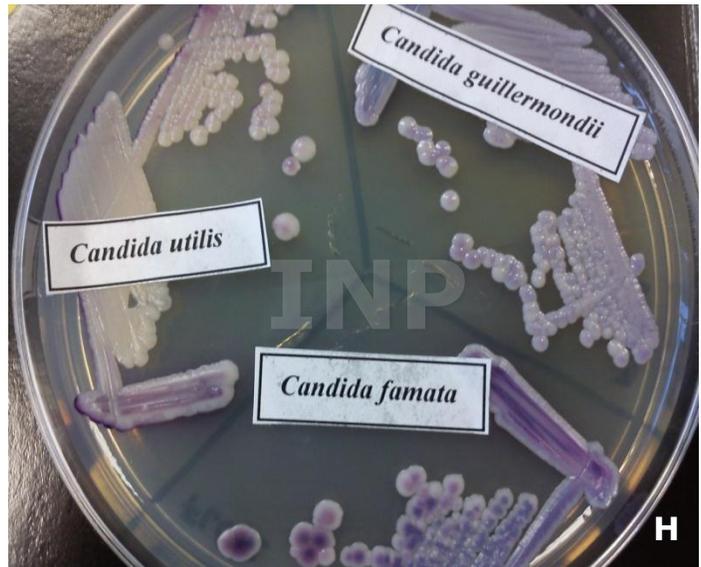


Imagen 6 (Continuación). Cultivos de levaduras en CHROMagar
G) *K. ohmeri* (aislada de cavidad bucal),
H) *C. utilis* (aislada de muestra de Orina), *C. guilliermondii* (aislada de muestra biológica) y
C. famata (aislada de cavidad bucal),
I) *Rhodotorula sp.* (aislada de muestra de Orina) ,
J) *S. cerevisiae* (aislada de muestra de Orina),
K) *Trichosporon sp.* (aislada de muestra biológica)
 Tipificadas con MicroScan® y Api 32®

Cuadro 14. Temperatura de crecimiento óptima observada para los diferentes géneros de levaduras.

Levadura	Temperatura de crecimiento (°C)
<i>C. albicans</i>	37
<i>C. famata</i>	
<i>C. glabrata</i>	
<i>C. kefyri</i>	
<i>C. krusei</i>	
<i>C. tropicalis</i>	
<i>Saccharomyces sp.</i>	
<i>C. dubliniensis</i>	28
<i>C. guilliermondii</i>	
<i>C. parapsilosis</i>	
<i>C. utilis</i>	
<i>Cryptococcus sp.</i>	
<i>Geotrichum sp.</i>	
<i>K. ohmeri</i>	
<i>Rhodotorula sp.</i>	
<i>Trichosporon sp.</i>	
<i>Zygosaccharomyces sp.</i>	

Cuadro 15. Prueba de hidrólisis de Esculina en API ID 32® para los diferentes géneros de levaduras.

Levadura	Esculina
<i>C. albicans</i>	Negativa
<i>C. dubliniensis</i>	
<i>C. glabrata</i> (V ⁻)	
<i>C. krusei</i>	
<i>C. parapsilosis</i>	
<i>C. tropicalis</i>	
<i>K. ohmeri</i>	
<i>Rhodotorula sp.</i>	
<i>C. famata</i>	Positiva
<i>C. guilliermondii</i>	
<i>C. kefyri</i>	
<i>C. lusitaniae</i>	
<i>C. neoformans</i>	
<i>Trichosporon sp.</i> *	
<i>Zygosaccharomyces sp.</i>	

*Para todas las variantes del género *Trichosporon sp.*

VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este proyecto se analizaron diversas metodologías para conservar las cepas de hongos miceliales y levaduriformes, tomando en cuenta los recursos tanto económicos como de personal. Tal como lo establece la WFCC, en una Micoteca, las cepas deben estar conservadas en por lo menos dos técnicas y una de ellas debe ser la liofilización, pero al ser un método muy costoso, se buscaron otros más accesibles y que se pudieran mantener a temperatura ambiente, y por lo menos a temperatura de -70°C (criopreservación), con el fin de establecer un procedimiento para cada hongo en específico.

Cada técnica usada requiere de evaluaciones, porque el almacenamiento puede inducir a cambios morfológicos y alteraciones en la composición de la pared como también la pérdida de la virulencia en algunas cepas.¹²

Los dermatofitos presentan problemas en su conservación, anteriormente en el Laboratorio de Parasitología y Micología del INP el único método de conservación era en agua, sin embargo en este medio de conservación los dermatofitos son muy susceptibles a la contaminación por bacterias, también pierden la capacidad de desarrollar sus características morfológicas y bioquímicas e inclusive pierden viabilidad. Brillhante (2004) propone conservar a *M. canis* en SSI al 0.9% más glicerol al 10% con aceite mineral estéril a temperatura ambiente. Haciendo una modificación a esta propuesta, se decidió conservar a los dermatofitos únicamente en SSI al 0.9%, pues como se ve en los cuadros 3 y 6, el glicerol al 10% es letal para estos microorganismos. En la recuperación de los dermatofitos en PDA se pudo observar una alta conidiogénesis (Imagen 2A) y el desarrollo de pigmento, lo que demuestra tener una alta estabilidad morfológica, además el 80% de las cepas fueron viables y sólo el 20% (Cuadro 5)

mostraron contaminación por bacterias (que pudieran haber estado presentes anteriormente). También se observó que este protector se puede utilizar para aquellas cepas que no sean capaces de sobrevivir en Glicerol al 10% o en Agua, como en el caso de *P. wickerhamii*.¹⁴

En el Cuadro 3, se puede ver que el porcentaje de recuperaron de las cepas fue del 81.3% cuando estuvieron conservadas en arena, siendo la mayoría hongos hialinos, dematiáceos y Zigomicetos. En el resto (24.7 %) se encuentran los dermatofitos y *S. brevicaulis* pues desde un inicio no hubo desarrollo; *A. versicolor* y *Cladosporium sp.* que mostraron contaminación con otras especies de hongos (posible contaminación previa) y, *Trichoderma sp.* *Acremonium sp.*, *S. apiospermum* y *S. chartarum* fueron perdiendo la capacidad de conidiación con el tiempo, lo que nos indica que no es el método adecuado de conservación ya que con el tiempo no fueron viables, posiblemente uno de los factores que afectaron la viabilidad de estas cepas fue el protector utilizado, quizá el uso de otros protectores pudieran prolongar la viabilidad, como lo son la glucosa, lactosa, etc.

La conservación en Chakirón fue obtenida de Marcos F. G. Rocha (2012), que propone esta técnica para el mantenimiento de los Zigomicetos, pero se probó para todas cepas miceliales con excepción de los dermatofitos, ya que Brillhante (2004) menciona que estos no soportan temperaturas menores de -20 °C. En el cuadro 4, se puede ver que *S. brevicaulis*, *Curvularia sp.*, *M. grisea*, *Cunninghamella sp.* y *Rhizopus sp.* su viabilidad es de corto tiempo; y para el caso de *Cladosporium sp.* la mantiene estable solo que al hacer resiembras había ocasiones que dejaba de crecer y con el tiempo crecían nuevamente, posiblemente a una baja inoculación. Estas cepas solo representan el 8.4 %. Cabe destacar que resultó un excelente método para la preservación de hongos dimórficos como *S. schenckii*, ya que

conservó sus características microscópicas, macroscópicas y patógenas (producción de pigmento melánico), esto es importante mencionarlo, ya que en la literatura existe poca información acerca de la conservación de este hongo.¹⁴

Para las levaduras se realizó la conservación en Glicerol al 10%, una técnica que se menciona en la mayoría de los artículos, resultando esta, una técnica que mantienen a las cepas estables, conservando sus características bioquímicas (color en CHROMagar y pruebas de identificación), variando sólo un poco su tiempo de crecimiento de 24 horas a 48 horas. Como se puede ver en el cuadro 6, es una técnica que no mantiene viables a *C. neoformans*, *N. brasiliensis*, *P. wickerhamii* y los dermatofitos. En el caso de *C. neoformans* es posible que no haya crecido, ya que era una cepa que había tenido varias resiembras antes de su almacenamiento.

En el Cuadro 7, se compara el tiempo de preservación de las cepas conservadas en agua con las otras técnicas. Se encontraron cepas con más de 12 años de preservación como *C. guilliermondii* que en la imagen 6H se puede observar cómo se conservan sus características morfológicas y bioquímicas. Al recuperar las cepas conservadas en agua, todas mostraron una alta estabilidad morfológica, aunque en agua, sino hay un adecuado manejo del vial, puede ser muy susceptible a la contaminación por bacterias. Para los demás métodos, en la mayoría de ellos las cepas lograron mantenerse viables durante los 6 meses del protocolo. Sin embargo, algunos hongos son menos aptos para su sobrevivencia en el medio; como *Trichoderma sp.* y *Acremonium sp.* que aunque se mantiene estable morfológicamente solo lo hace por un tiempo corto (120 días) en arena, pero más de 180 días en chakirón; otros como *S. apiospermum* en arena es viable por 60 días y en

Chakirón 120 días, posiblemente por la presencia de glicerol al 10%, ya que en agua lleva cerca de 3 años, lográndose una buena recuperación.

Finalmente, las estructuras conservadas en formol al 10%, procedentes de muestras biológicas muestran una alta estabilidad y tiempo de preservación como se puede observar en la imagen 1, que después de casi un año, siguen viéndose como la primera vez que se ven al microscopio.

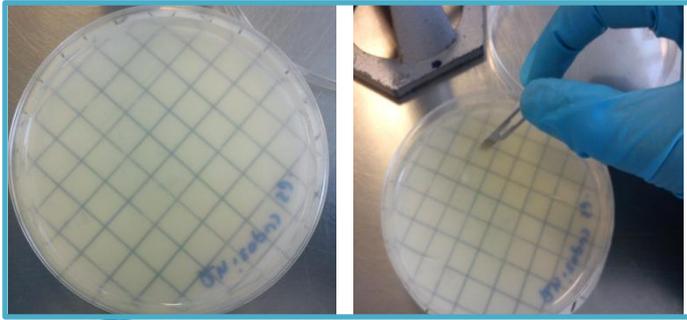
Cuadro 16. Ventajas y desventajas de cada método de conservación.

Método	Ventajas	Desventajas
Glicerol al 10%	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Rápido ▶ Económico ▶ Estable a temperatura ambiente ▶ Las cepas se mantienen viables y con una alta estabilidad morfológica ▶ Poco susceptible a contaminación 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Tóxico para los dermatofitos y otras cepas.
Arena	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Moderadamente rápido ▶ Económico ▶ Estable a temperatura ambiente ▶ Las cepas se mantienen viables y con una alta estabilidad morfológica ▶ Poco susceptible a contaminación ▶ Alta cantidad de material para recuperar las cepas 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Al no adherirse al asa, la arena tiende a caerse ▶ Tarda en absorberse el protector ▶ Algunas cepas no soportan la desecación
Chakirón	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Las cepas se mantienen viables y con una alta estabilidad morfológica ▶ Poco susceptible a contaminación 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Laborioso ▶ El alginato es caro ▶ Los chakirones se caen muy fácil
Agua	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Las cepas se mantienen viables y con una alta 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Alta susceptibilidad a

	<ul style="list-style-type: none"> estabilidad morfológica ▶ Largo tiempo de conservación ▶ Económico ▶ Rápido ▶ Estable a temperatura ambiente 	la contaminación por bacterias
SSI 0.9 %	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Mantiene estable a cepas de dermatofitos, algas, y hongos en lo que el glicerol es tóxico ▶ Poco susceptible a contaminación ▶ Económico ▶ Rápido ▶ Estable a temperatura ambiente 	
Formol al 10%	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Una buena conservación de las estructuras fúngicas ▶ Rápido ▶ Económico ▶ No es susceptible a contaminación por bacterias ▶ Fija las estructuras, por lo que no requiere ser manipulado en mechero 	

Otra parte del proyecto, fue el ordenamiento y etiquetado de las preparaciones anteriormente contenidas en la Micoteca (microcultivos), así como la aplicación de un nuevo método más práctico, sencillo y rápido, para la realización de preparaciones fijas. Se realizó la técnica modificada de Huber, que utiliza PVA como agente fijador en vez de resina, además de que no hay necesidad de realizar microcultivos y la tinción, ahorrando material y tiempo (Diagrama 10A y 10B).

Microcultivo (Técnica modificada de Ridell)



1 Recortar cuadro (1x1 cm) de medio de cultivo

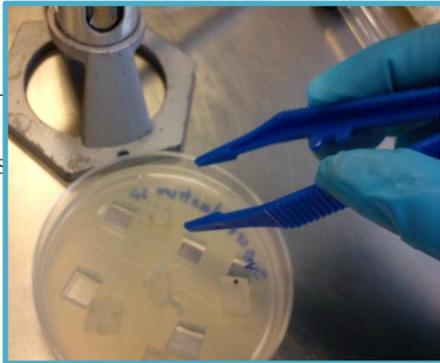
Materiales



2 Colocar los cuadros sobre el medio de cultivo



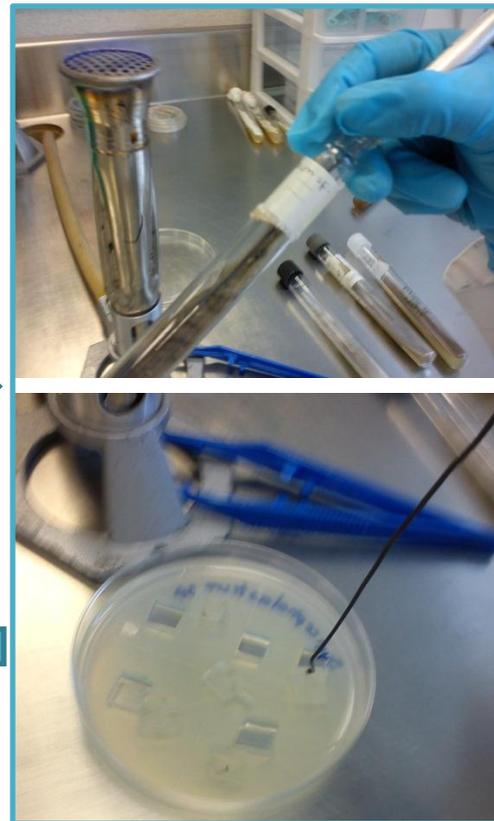
4 Colocar un cubreobjetos



5 Incubar, cuidando el tiempo de conidiación de cada cepa



3 Inocular cepa (alta conidiación), picando en cada lado del cuadro de medio de cultivo

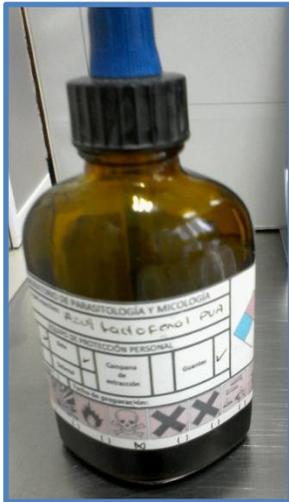


6 Realizar tinción con AAL/ácido (Diagrama 5)



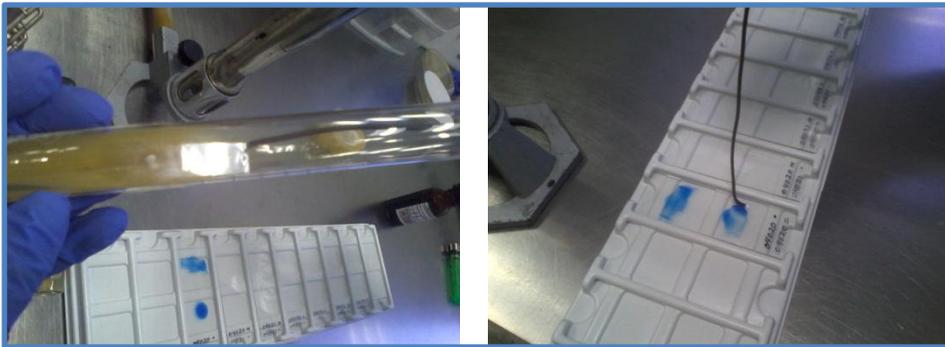
Diagrama 10A. Realización de la técnica modificada de Ridell, aprendida en el V curso de Micología/LEMI-UNIFESP (Mayo, 2008)

Técnica modificada de montaje fijo con PVA de Huber



- 1 Colocar una gota de AAL + PVA en un portaobjetos limpio

Materiales



- 2 Realizar la técnica de la cinta adhesiva transparente Rush-Munro



- 3 Colocar cubreobjetos y dejar secar durante 1 semana (Sin mover)

Preparaciones

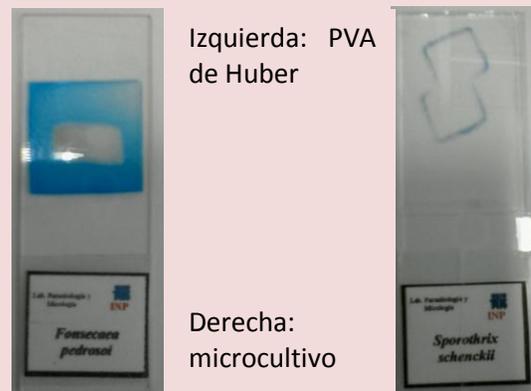


Diagrama 10B. Realización de la técnica modificada de montaje fijo con PVA der Huber

Este método, preserva en mejores condiciones las estructuras fúngicas, ya que el tratamiento con metanol (como fijador) puede dañar algunas estructuras, como se puede observar en la imagen 2, los macroconidios de *M. canis* pierden el grosor de la pared al ser teñidas con AAL y PAS, y en ocasiones el colorante no penetra a la célula. Sin embargo, al usar AAL + PVA los macroconidios se conservan íntegros, logrando apreciar la morfología microscópica completa. En la imagen 3, se observan a *A. niger* montada con AAL+PVA donde se logra apreciar la cabeza aspergilar redonda, la doble serie de fiálides y los microconidios espiculados; mientras que teñidas en PAS no se logra diferenciar las fiálides y finalmente teñido con AAL sólo se ve un aglomerado del cuerpo fructífero. Mientras tanto para los zigomicetos, ninguno de los tres métodos mantiene las estructuras, posiblemente debido a que son muy frágiles (Imagen 4). También la superficie que abarca la preparación es mayor cuando se utiliza AAL+PVA.

Por otro lado, se momificaron cepas miceliales, que harán más práctica la enseñanza y la comparación con las cepas obtenidas en el laboratorio. En la imagen 5, se nota la diferencia de entre *A. niger* preservado y fijado con formaldehído al 40% contra otro que no está momificado (5C), en este último se puede ver una alta conidiación que no permite observar las características macroscópicas de la cepa. También se recuperaron y reetiquetaron cepas anteriormente fijadas, que se han conservado estables morfológicamente por años (imagen 5A), siendo *P. brasiliensis* la cepa más antigua (1969), lo que demuestra que este material puede ser útil por más de 46 años.

Una parte importante del proyecto, fue la elaboración de un Atlas de Micología Médica, que contiene cerca de 220 imágenes que complementan la enseñanza, pues se hace alusión a consejos u observaciones que no son mencionados en los libros de texto. También se realizó la medición de las estructuras fúngicas, encontrando una gran concordancia entre las medidas tomadas con las de las fuentes bibliográficas (Cuadro 13). Solo en algunos casos hubo diferencia, como en el de *C. glabrata* que se encontró que los blastoconidios miden de 4.0 a 8.0 μm , pero Larone (2011) menciona que estas miden entre 2-3 x 3-4 μm y mientras tanto en la página www.mycology.adelaide.edu.au establece que son de un tamaño de 2.0-3.5 x 3.0-4.5 μm , esto se puede deber a que los autores no mencionan en qué fase de crecimiento tomaron las microfotografías.²⁶

C. parapsilosis es de un tamaño similar a *C. glabrata*, donde los blastoconidios miden de 4.0 – 6.5 μm (referencia: 2.5-4.0x3.0-8.0), por lo que esto demuestra que no se pueden diferenciar especies de *Candida* únicamente mediante el examen directo. Otro caso que sobresalió, fue *Rhizomucor sp.* que en los datos obtenidos el esporangio llegó a medir hasta 290 μm mientras que Larone (2011) establece que mide entre 40-100 μm , tres veces menos a lo encontrado, siendo esto de gran importancia ya que este libro, propone a los diferentes tamaños del esporangio como clave de diferenciación entre *Rhizopus sp.*, *Mucor sp.* y *Rhizomucor sp.*²⁶

También se realizó la digitalización (Excel) del registro del material contenido en la Micoteca, como lo es la información de las cepas conservadas en las diferentes metodologías, de las cepas momificadas y de las preparaciones fijas. Esto para un mayor control y registro de cada una de las nuevas cepas que se vayan obteniendo con el tiempo (Imagen 7).

	A	B	C
1	Posición	Microorganismo	Cantidad de preparaciones
2	B01-B03	Células fumagoides (Escamas)	3
3	B04-B06	<i>Coccidioides posadasii</i>	3
4	B07-B10	<i>Histoplasma capsulatum</i>	4
5	B11-B13	Levaduras	3
6	B14	<i>Candida sp.</i>	1
7	B15-B22	<i>Candida albicans</i>	8
8	B23-B25	<i>Candida famata</i>	3
9	B26-B28	<i>Candida glabrata</i>	3
10	B29-B31	<i>Candida guilliermondii</i>	3
11	B32-B34	<i>Candida krusei</i>	3
12	B35-B37	<i>Candida lusitaniae</i>	3
13	B38-B40	<i>Candida parapsilosis</i>	3
14	B41-B43	<i>Candida tropicalis</i>	3
15	B44-B51	<i>Cryptococcus neoformans</i>	8
16	B52-B57	<i>Geotrichum sp.</i>	6
17	B58-B66	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	9
18	B67-B77	<i>Aspergillus clavatus</i>	11
19	B78-B96	<i>Aspergillus flavus</i>	19
20	B97-B100	<i>Aspergillus fumigatus</i>	4
21		Total	100
22			
23			
24			

Imagen 7. Ejemplo de registro digital de las preparaciones fijas.

Las cepas anteriormente conservadas se transfirieron a crioviales para tenerlas todas en un mismo contenedor (Imagen 8). Ya que no se había establecido un recipiente para ello.

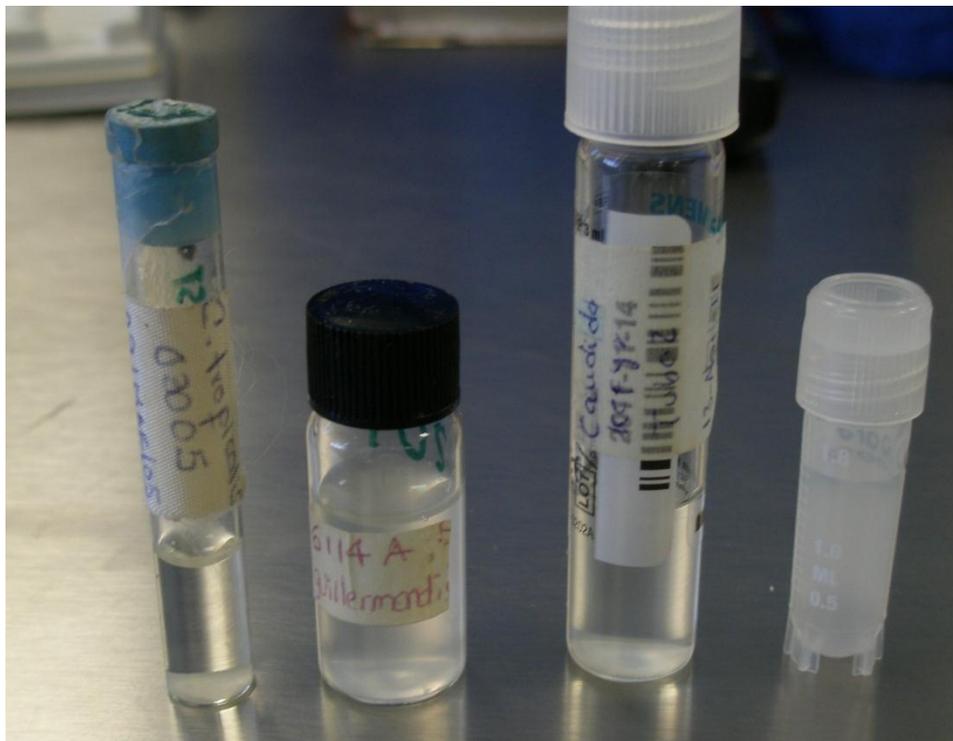


Imagen 8. Contenedores de cepas conservadas en agua, que fueron transferidas a crioviales (recipiente blanco, lado derecho)

Y finalmente el material como lo son las preparaciones fijas, las cepas conservadas y las cepas momificadas, fueron ordenadas en un mueble diseñado específico para la Micoteca que se puede observar en la Imagen 9. Ya que anteriormente, las cepas no tenían un orden y un lugar establecido para su almacenamiento (Imagen 10).



Imagen 9. Mueble diseñado por el autor de la tesis para almacenar material de la Micoteca.



Imagen 10. Micoteca almacenada en cajas



A

En la imagen 11 (A, B) se muestra la aplicación de la Micoteca en la impartición del curso Herramientas Aplicables para el control de calidad Microbiológico Industrial II (BD), externo al hospital.



B

Imagen 11 (A, B). Impartición de curso con uso de la Micoteca del INP.

Levaduras

En el Laboratorio de Parasitología y Micología, la gran parte de aislamientos son levaduras, ya que son los agentes causantes de la mayoría de las micosis, por lo que es necesario hacer una adecuada tipificación, pues de esto dependerá el tratamiento al cual será sometido el paciente.

Se hicieron diversos hallazgos, uno de ellos es el uso de CHROMagar[®] como medio auxiliar para los métodos de identificación (MicroScan[®] y API ID 32[®]). En el instructivo de CHROMagar[®] menciona que solo es útil para diferenciar *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei*. Como se puede observar en la imagen 6, *C. albicans* muestra un color verde claro, pero si la descarga del inóculo es alta este puede dar un color verde azulado como en el caso de *C. dubliniensis* (que puede ser diferenciada por el crecimiento a una temperatura de 28-35°C y en el crecimiento en caldo hipertónico, principalmente). El desarrollo de un color azul marino, podría dar indicios de que se trata de *C. tropicalis*, pero se ha observado que *K. ohmeri* (aislado principalmente de cavidad bucal) desarrolla un color similar, en un inicio es de un color rosa pálido y con el tiempo (72 horas) muestra un color azul parecido al de *C. tropicalis*. Las cepas de *C. parapsilosis* desarrollan un color rosa pálido, son pequeñas, pero *C. utilis* desarrolla un color muy similar. Mientras que *C. glabrata* son colonias con centro lila y un halo blanco, pero esta característica la puede desarrollar también *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii* y *C. famata*. Que en ocasiones el color lila puede ser muy fuerte que puede ser similar a la coloración que desarrolla *S. cerevisiae*. El género *Trichosporon sp.* muestra una colonia muy característica, verde azuladas, rugosas y duras, pero el medio no ayuda a diferenciar entre las diversas especies y finalmente *Rhodotorula sp.* presenta su

coloración característica por la producción de pigmentos carotenoides (rosa coral).

También se observó que las levaduras crecen a diferentes temperaturas (Cuadro 14), donde exponen mejor sus características bioquímicas, y que muchas de ellas difieren a lo establecido en las referencias bibliográficas. Por ejemplo, *C. guilliermondii* en la literatura menciona que crece mejor a 37°C, pero se ha observado que su desarrollo se favorece a 28°C, y esto marca la diferencia en la tipificación en MicroScan, que es una técnica que esta validada a 37°C.

Y finalmente, se estableció el patrón de la prueba de hidrólisis de esculina (Cuadro 15), que es una prueba adicional en API ID 32[®], que no está integrada en el manual de identificación de este y que tampoco se han encontrado en la literatura.

Cepas ATCC

Para las cepas de referencia ATCC (Cuadro 17), se propuso el Diagrama 9, para optimizar la **conservación** y **recuperación** de las cepas (después de congeladas), para así garantizar y preservar sus características bioquímicas y morfológicas.

Para la **conservación**, se planteó que una vez hecha la suspensión del inculó en Glicerol al 10%, se deje actuar el agente crioprotector durante 15 minutos y no más de 45-60 minutos.

Posteriormente para la **recuperación**, el criovial, en vez de descongelarse por cambios de temperatura, se debe descongelar en baño maría a 37°C durante 2 minutos esto para evitar un desequilibrio osmótico.

Y realizar resiembras de cada cepa ATCC cada 15 días durante 3 meses, aunque se ha observado que las cepas se mantienen viables hasta por 6 meses.

Al igual se propusieron dos formatos para llevar a cabo el control de las cepas y que estas estén cumpliendo su función como cepas de referencia (Formato 1 y 2).

Cuadro 17. Cepas ATCC pertenecientes a la Micoteca.

Levadura	Número ATCC
<i>Candida albicans</i>	66027
<i>Candida albicans</i>	14053
<i>Candida albicans</i>	2091
<i>Candida dubliniensis</i>	CD36
<i>Candida dubliniensis</i>	MYA654
<i>Candida glabrata</i>	64677
<i>Candida glabrata</i>	2001
<i>Candida guilliermondii</i>	6260
<i>Candida kefyr</i>	66028
<i>Candida krusei</i>	6258
<i>Candida parapsilosis</i>	22019
<i>Candida tropicalis</i>	66029
<i>Candida tropicalis</i>	750
<i>Cryptococcus albidus</i>	66030



CONTROL DE CEPAS ATCC

Nombre de cepa: _____

No. ATCC: _____

							Sensibilidades		
Fecha de descongelación							Resiembra/ Fecha	Patrón de sensibilidad	
								Sí	No
No. de resiembra									
Medio de conservación									
Control de BACTEC	Fecha								
	No. micológico								
	No. frasco/ Celda								
Pruebas bioquímicas	CHROMagar (Fecha)								
	MicroScan (Fecha)								
	API (Fecha)								
Observaciones									

Responsable: _____

Formato 1. Control de cepas ATCC y sí cumplen con los patrones de sensibilidad.



CONTROL DE CEPAS ATCC

Nombre de cepa: _____

No. ATCC: _____

Fecha de descongelación										
No. de resiembra										
Medio de conservación										
Control de BACTEC	Fecha									
	No. micológico									
	No. frasco/ Celda									
Pruebas bioquímicas	CHROMagar (Fecha)									
	MicroScan (Fecha)									
	API (Fecha)									
Observaciones										

Responsable: _____

Formato 2. Control de cepas ATCC.

IX. CONCLUSIONES

Por los resultados obtenidos, se puede concluir lo siguiente:

- ∞ La determinación de los métodos de conservación para cada cepa de hongos miceliales y levaduriformes se establece en el diagrama 11.
- ∞ Para asegurar la viabilidad, pureza y estabilidad morfológica, cada cepa se debe conservar en por lo menos dos métodos.
- ∞ La conservación en agua, es el mejor método para actinomicetos, hongos miceliales y levaduriformes; con excepción de los dermatofitos y algas que se conservan mejor en SSI al 0.9%, reduciendo el riesgo de pleomorfismo y la contaminación por bacterias, asimismo la conservación en chakirón para *S. schenckii*.
- ∞ El montaje de exámenes directos con AAL + PVA comparado con lo microcultivos, mostró una importante ventaja, ya que este permite un mantenimiento de las estructuras fijas, además de que se realiza en menor tiempo.
- ∞ La momificación de cepas es de larga duración, logrando preservar las características macroscópicas por más de 40 años. Siendo este de gran utilidad para la impartición de cursos y la enseñanza en el laboratorio, además como guía para la identificación de cepas miceliales.
- ∞ El contar con un registro digital del contenido de la Micoteca, permitirá un mayor control de lo que se va adicionando, además de saber con qué cepas se cuenta y poder acceder a ellas fácilmente.
- ∞ El uso de CHROMagar[®] sirve únicamente como complemento para la identificación y detectar una micosis mixta, ya que diversas levaduras pueden presentar una similar coloración, dando un

resultado equivocado, lo que puede afectar el tratamiento al que va ser sometido el paciente.

- ∞ La adecuada preservación y conservación de las cepas ATCC, permite asegurar el funcionamiento de los medios de cultivo, así como de los equipos e instrumentos necesarios para el aislamiento e identificación de hongos de interés clínico.
- ∞ La Micoteca consta de una colección de 305 cepas preservadas en alguna de las diferentes técnicas (Glicerol 10%: 112, Arena: 56, Chakirón: 58, SSI al 0.9%: 19, Agua: 135, Formol 10%: 25), 498 preparaciones fijas de las estructuras micóticas y 91 cepas momificadas, con el objetivo de seguir ampliando la colección.
- ∞ El Atlas de Micología Médica, está conformado por 163 páginas, 220 fotografías, en formato digital, con la finalidad de seguirlo ampliando. Con la información necesaria para lograr una identificación veraz, efectiva y oportuno. Al igual que sirve como un material de apoyo de consulta y capacitación para el personal de laboratorio y estudiantes.
- ∞ El material que cuenta la Micoteca es útil para la capacitación del personal del laboratorio, enseñanza de la Micología médica a alumnos y médicos rotantes, y para la impartición de cursos dentro y fuera del INP.

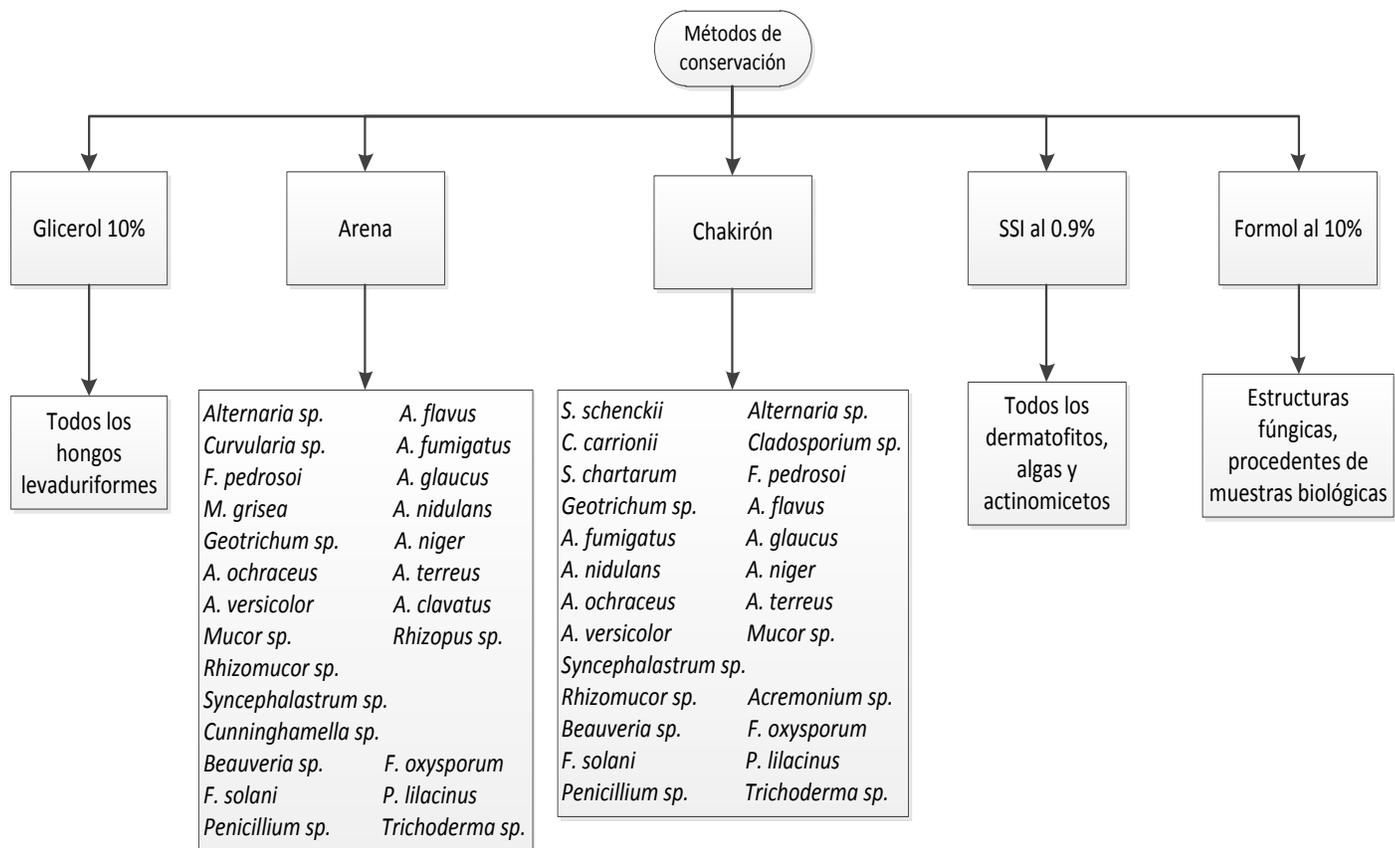


Diagrama 11. Guía para la conservación, de cada cepa micelial y levaduriforme.

X. REFERENCIAS

1. Alanís, S. (2012). *Métodos de conservación de Fitopatógenos* [diapositivas de PowerPoint]. Obtenido de: http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/cursometodosfito/13_Metodos_conservacion.pdf. Fecha de consulta: 23 de marzo de 2015
2. Anónimo. (s.a.). *Organelos con una membrana: dictiosomas, vesícula y microcuerpos*. Obtenido de: <http://botanucarum.webs.com/Examen%20I/023%20ornanelos%20con%20una%20membrana%20dictiosomas%20vesiculas%20microcuerp1.pdf>. Fecha de consulta: 15 de marzo de 2015
3. Arango, A. M., y Castañeda, G., E. (2003). *Micosis Humanas. Procedimientos Diagnósticos: Exámenes Directos*. (2ª ed.). Bogotá: Corporación para Investigaciones Biológicas.
4. Arenas, R. (1993). *Micología Médica Ilustrada*. México: Interamericana. McGraw Hill.
5. Arenas, R. (2011). *Micología médica ilustrada*. (4ª ed.). México: McGraw-Hill.
6. ATCC® (2014). *Mycology Culture Guide: tips and techniques for culturing yeasts and filamentous fungi*. Obtenido de: <http://www.atcc.org/Guides/Guides.aspx>. Fecha de consulta: 20 de octubre de 2014
7. ATCC®. (2014). *Thermo Scientific Nalgene and Nunc Cryopreservation Guide*. Obtenido de: <http://www.atcc.org/>. Fecha de consulta: 24 de octubre de 2014
8. Berlanga, A., Hernández, V. (2003). *Conservación de hongos entomopatógenos en gel de sílice* [ficha técnica]. SAGARPA: Senasica
9. Bitnun, A., y Nosal, M. R. (1999). *Stachybotrys chartarum (atra) contamination of the indoor environment: Health implications*. Pediatric Child Health. 4 (2), 125-128.

10. Bonifaz Alexandro. (2012). *Micología Médica Básica*. (4^a ed.). México: McGraw Hill.
11. Borman, A., Szekely, A., Campbell, C., Johnson, E. (2006). *Evaluation of the viability of pathogenic filamentous fungi after prolonged storage in sterile water and review of recent published on storage methods*. Mycopathologia. 161. 361-368
12. Brilhante, R., Cavalcante, C., Soares-Júnior, F., Monteiro, A., Brito, R., Sidrim, J., Rocha, M. (2004). *Evaluation of Microsporium canis in different methods of storage*. Medical Mycology. 42. 499-504
13. Cornejo, J. P., Rangel, C. A., y Soto, R. L. (2000). *Geotricosis pulmonar en un paciente con trasplante renal*. Enfermedades Infecciosas y Microbiología. 20(1), 24-27
14. Cuenca, M., Gadea, I., Martín, E., Pemán, J., Pontón, J., Rodríguez, J. (2006). *Diagnóstico microbiológico de las micosis y estudios de sensibilidad a antifúngicos*. España: Seimc.
15. Ellis, D., y Kidd, S. (2015). *Micology Online*. Obtenido de <http://www.mycology.adelaide.edu.au/>. Fecha de consulta: 20 de marzo de 2015
16. EMLab P&K, A TestAmerica Co. (2014). *Tritirachium spp.* Obtenido de: <https://www.emlab.com/app/fungi/Fungi.po?event=fungi&type=secondary&species=126&name=Tritirachium>. Fecha de consulta: 25 de marzo de 2015
17. Fernández, C., Martínez, G., Perurena, M., Illnait, T., Valdés, I. (2005). *La colección de cultivos de hongos del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí": funciones y retos*. Revista Cubana de Medicina Tropical. 57(3).
18. Ferreti, R., de Moraes, C. (2001). *Viability, morphological characteristics and dimorphic ability of fungi preserved by different methods*. Revista Iberoamericana de Micología. 18. 191-196

19. Fisher, F., y Cook, B. N. (1998). *Fundamentals of Diagnostic Mycology*. E.U.A.: Saunders.
20. García, M., Uruburu, F. (s.a.). *La conservación de cepas microbianas*. Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Obtenido de: http://semicrobiologia.org/pdf/actualidad/SEM30_12.pdf. Fecha de consulta: 17 de mayo de 2015
21. Gené, J., Guarro, J. (2007). *Identificación de otros hongos miceliales*. Revista Iberoamericana de Micología. Capítulo 13.
22. Guevara, M., Urcia, F., Casquero, J. (2007). *Manual de procedimientos y técnicas para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas*. Lima: Ministerio de Salud (Instituto Nacional de Salud).
23. Herrera, T., Ulloa, M. y Ruiz, M. (2005) *El reino de los hongos: Micología básica y aplicada*. México: Fondo de Cultura Económica
24. IBT. (s.f.). *Conservación y control de cepas microbianas* [diapositivas de PowerPoint]. Obtenido de: www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/canovas/colecc~1.ppt. Fecha de consulta: 24 de marzo de 2015
25. Laet, P., Bruno, R., Höfling, J. (2007). *Storage procedures for yeast preservation: phenotypic and genotypic evaluation*. Annals of Microbiology. 57 (3), 461-465
26. Larone, D. H. (2011). *Medically Important Fungi: a Guide to identification* (5ª ed.). Washington, DC: ASM PRESS.
27. Lennette, H. E., Balows, A., Hausler, J. W., y Truant, P. J. (1982). *Manual de Microbiología Clínica* (3ª ed.). (Traducción. Landes, D.). Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
28. Linares, S., Solís, F. (2007). *Identificación de levaduras*. Revista Iberoamericana de Micología. Capítulo 11.

29. Llovo, J., Pontón, J. (2007). *Diagnóstico microscópico de las micosis. Revista Iberoamericana de Micología*. Capítulo 14a.
30. López, R. (2005). *Ecología de los hongos patógenos para el hombre. Revista Mexicana de Micología*. (21). 85-92
31. Macola, S. (s.a.). *Generalidades de Micología. Microbiología y Parasitología Médica*. 359-463
32. Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P., Clark, D. (2009). *Brock: Biología de los microorganismos* [Traducción: Barrachina, C., García, C.].
33. Martínez, I. M. (2013). *Kodamaea ohmeri: causa de fungemia en un paciente con carcinoma vesical invasivo*. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2013.03.007>. Fecha de consulta: 26 de enero de 2015
34. Microbiologics. (2010). *Inserto de uso de Kwik-Stik*. Obtenido de: <http://microbiologics.com/Products/KWIK-STIK>
35. Nucci, M., Queiroz, F., Tobón, A., Restrepo, A., Colombo, A. (2010). *Epidemiology of Opportunistic Fungal Infections in Latin America*. Clinical Infectious Diseases. 51 (5), 561-570.
36. Nucci, M., Queiroz, F., Alvarado, T., Tiraboschi, N., Cortes, J., Zurita, J. (2013). *Epidemiology of Candidemia in Latin America: A Laboratory-Based Survey*. PLOS ONE. 8 (3)
37. Palacio, A., Villar, J. y Alhambra, A. (2009). *Epidemiología de las candidiasis invasoras en población pediátrica y adulta*. Revista Iberoamericana de Micología. 26 (1), 2-7.
38. Panizo, M., Reviákina, V., Montes, W., González, G. (2005). *Mantenimiento y preservación de hongos en agua destilada y aceite mineral*. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 25 (1)

39. Paya, G. E., Zubieta, A. M., Díaz, J. C., y Piontelli, L. E. (2000). *Fungemia asociada a colonización de catéter venoso permanente por Fusarium oxysporum en un paciente pediátrico con cáncer*. Revista Chilena de Infectología. 17 (1), 34-38.
40. Pemán, J., Salavert, M. (2012). *Epidemiología general de la enfermedad fúngica invasora*. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 30 (2), 90-98
41. Pérez, C., Mata-Essayags, S., Hartung de Capriles, C, Roseló, A., Collela, M., Olaizola, C., Ladaeta, M. (2003). *Mantenimiento de Cryptococcus sp. con el método de Castellani*. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 23 (2).
42. Ramírez, R., Luna, B., Velázquez, O., Vierna, L., Mejía, A., Tsuzuki, G., Hernández, L., Müggenburg, I., Camacho, A., Urzúa, M.(2011). *Manual de prácticas de microbiología general*. Facultad de Química: UNAM.
43. Rex, J.H., McGinnis, M., Arikan, S., Rodríguez, L., y Kirisch, M. (2001). *Doctor Fungus*. Obtenido de <http://www.doctorfungus.org/>.
44. Rezusta, A., Sánchez, A., Gil, J. (2007). *Fundamentos básicos para el diagnóstico micológico*. Revista Iberoamericana de Micología. Capítulo 3.
45. Rocha, M., Lima, D., Brilhante, R., Cordeiro, R., Monteiro, A., Teixeira, C., Ribeiro, J., Castelo-Branco, D., Sidrim, J. (2012). *Glucose and lactose as cryoprotectants for fungal strains immobilized in sodium alginate: an emphasis on the conservation of Zygomycetes Rhizopus and Mucor*. Mycoses: Diagnostics, Therapy and Prophylaxis of Fungal Diseases. 56. 321-326

46. Ruiz-Aragón, J., García-Martos, P., Puerto, J., Marín, P., Saldarreaga, A., Moya, P. (2003). *Evaluación de un nuevo medio CHROMagar Candida para la identificación presuntiva de levaduras*. Revista de Diagnóstico Biológico. 52 (1).
47. Salavert, M., Jarque, I. y Pemán, J. (s.a.). *Aspectos epidemiológicos cambiantes de la candidemia y sus implicaciones clínico-terapéuticas*. Control de Calidad SEIMC.
48. Souza, G. C., Mattos, O. F., y Severo, L. (2013). *Infección por Saccharomyces cerevisiae*. Revista Iberoamericana de Micología. <http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2013.03.001>.
49. Tangarife, C. V., (2011). *Aspergillus spp.* Obtenido de <http://aprendeenlinea.udea.edu.co/lms/moodle/mod/resource/view.php?inpopup=true&id=100812>
50. Toun, F., y Costa, S. (2008). *Rhodotorula infection. A systematic review of 128 cases from literature*. Revista Iberoamericana de Micología. 25, 135-140.
51. Unda, F., Agüero, J., Fariñas, C., Martínez-Martínez, L. (2011). *Identificación de hongos de importancia clínica mediante técnicas moleculares*. Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica. 29 (4). 282-285
52. Uribarren, T., Castañon, L. (2011). *Generalidades de Micología*. Obtenido: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/generalidades.html>.
53. Weng, Z., Díaz, O., Álvarez, I. (2005). *Conservación de microorganismos: ¿qué debemos conocer?*. Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología. 43 (3).
54. WFCC. (2010). *Recomendaciones para el establecimiento y funcionamiento de cultivos de microorganismos* [traducción: Comité Ejecutivo de WFCC]. (3ª ed.). Obtenido de: <http://www.wfcc.info/>. Fecha de consulta: 20 de marzo de 2015

ANEXO I

1. Colorantes

A) AAL

El AAL es usado para montaje de preparaciones. El ácido láctico actúa como un agente aclarante y ayuda en la preservación de las estructuras fúngicas, el fenol actúa como un agente que fija a los microorganismos, y el azul algodón tiñe a las estructuras.

Ácido Láctico.....20 mL

Cristales de Fenol.....20 g

Glicerol (o glicerina).....40 mL

Agua destilada.....20 mL

Azul algodón.....0.05 g

1. Disolver el fenol en el ácido láctico, glicerol, y agua constante calentamiento.
2. Añadir azul algodón
3. Mezclar bien.

B) AAL + PVA (Medio de montaje modificado de Huber PVA)

Esta modificación de montaje plástica de Huber (Huber y Caplin, 1947) es excelente para hacer montajes permanentes de los hongos. Se seca en aproximadamente 1 semana, estos montajes son permanentes y no se disuelven con éter, xileno, o alcohol, las estructuras fúngicas permanecen perfectas por años.

1. Añadir 7.5g de alcohol polivinílico en polvo en 50 mL de agua desionizada fría en un matraz.
2. Transferir el matraz en un plato de calentamiento y añadir una barra magnética para un correcto mezclado.
3. Monitorear la temperatura.
4. Añadir 22g de ácido láctico (Después añadir el fenol)
5. Añadir 22g de cristales de fenol.
6. Añadir 0.05g de azul de anilina.
7. Calentar la solución hasta que alcance una temperatura de 90°C. Evitar que llegue a ebullición.

C) Azul de Metileno

Azul de Metileno.....0.01 g

Agua destilada.....10 mL

Citrato de sodio dihidratado.....2 g

1. Disolver 0.01 g de azul de metileno en 10 mL agua destilada.
2. Añadir 2 g de citrato de sodio dihidratado hasta disolver.
3. Filtrar solución.

D) KOH al 20%

Hidróxido de potasio (KOH).....20 g

Glicerina.....10 mL

Agua Destilada.....70 mL

2. Medios de Cultivo

A) ADS y ADS más Cloranfenicol

Peptona digerida de tejido animal.....5 g

Digerido pancreático de caseína.....5 g

Dextrosa.....40 g

Agar.....15 g

Agua destilada.....1000 mL

pH 5.6 ± 0.2

Para preparar ASD más antibiótico, se añade 500 mg de Cloranfenicol.

B) PDA

Papa en trozos.....4 g

Dextrosa.....20 g

Agar.....15 g

Agua destilada.....1000 mL

pH 5.6 ± 0.2

C) Agar Mycosel

Harina de soya digerida por enzimas papaicas10 g

Dextrosa.....10 g

Agar.....15.5 g

Cicloheximida.....400 mg

Cloranfenicol.....50 mg

Agua destilada.....1000 mL

pH 6.9 ± 0.2

D) Agar Alpiste Negro

Alpiste negro (triturado).....70 g

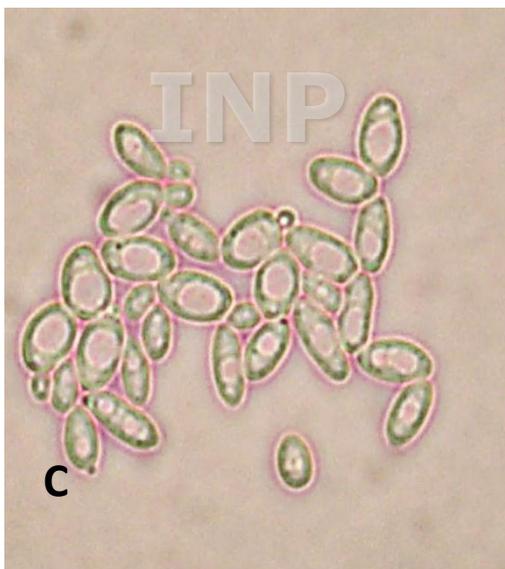
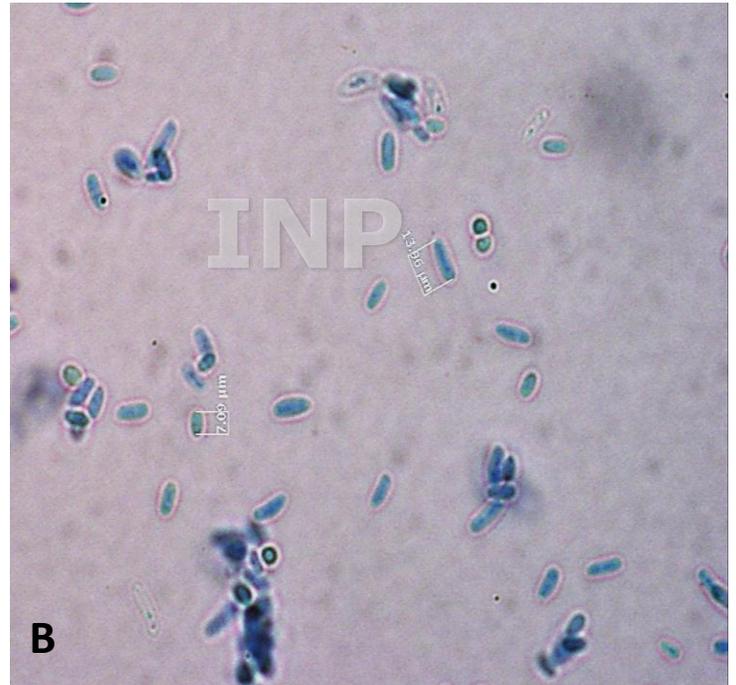
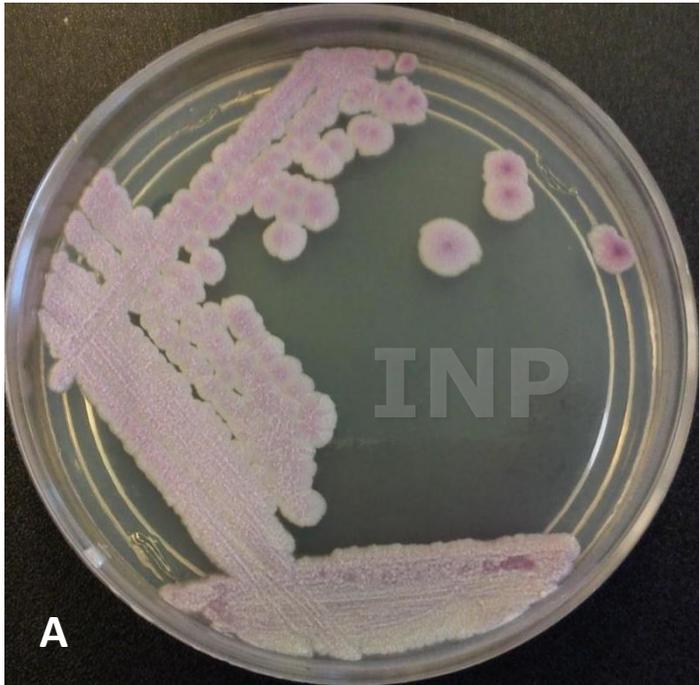
Agar Bacteriológico.....20 g

1. Remojar el Alpiste negro en agua.
2. Hervir por 30 minutos (el matraz debe permanecer cerrado).
3. Posteriormente filtrar con gasa y papel filtro.
4. Aforar a la cantidad deseada y agregar el agar bacteriológico hasta disolver.

ANEXO II

En este anexo se muestran algunas imágenes y un resumen del texto, que se encuentran en el Atlas de Micología Médica.

1) *Candida krusei*

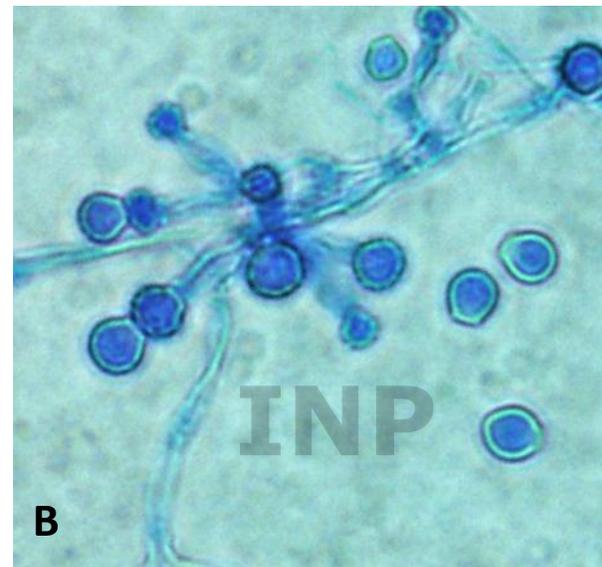
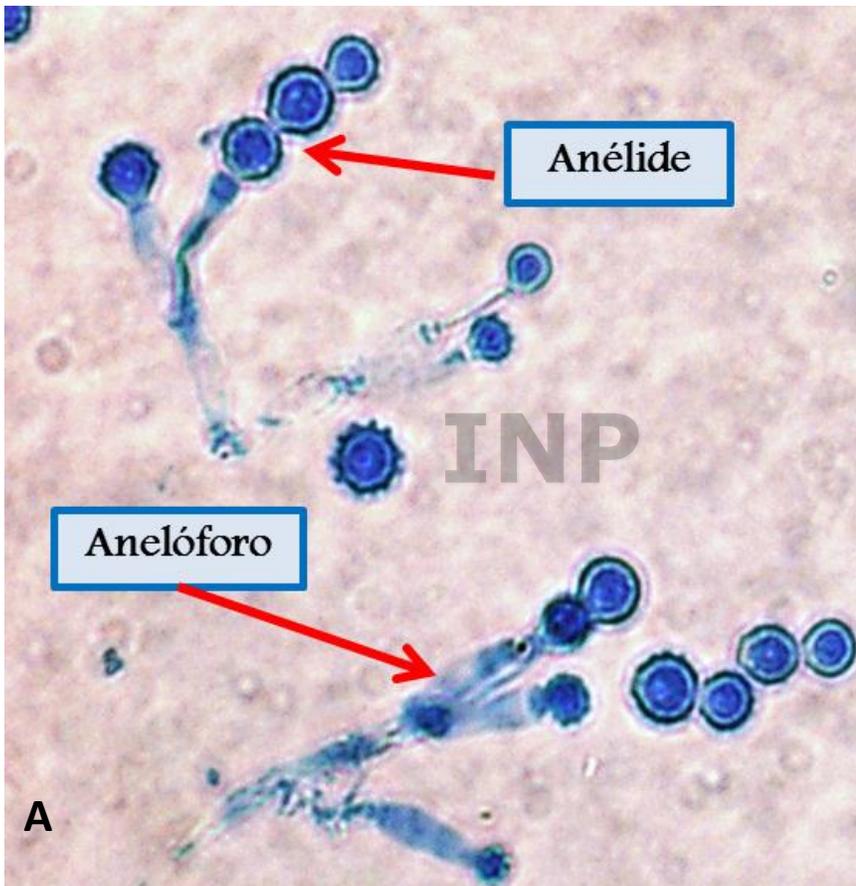


A) CHROMagar; colonia de color lila con un halo blanco o rosa pálido. La cepa es seca, dura, plana y opaca.

B) Examen con AAL. Se observan algunos blastoconidios redondos (4.0-7.5 μm), mientras que otros son curvados y alargados como *C. parapsilosis* y *C. kefyr*.

C) Examen directo de *Candida krusei* cultivada en BACTEC, donde se puede observar una vacuola en los blastoconidios (7.0-15.0 μm)

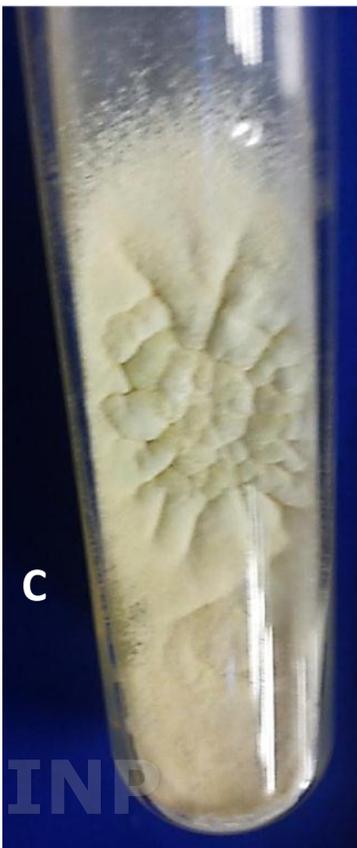
2) *Scopulariopsis brevicaulis*



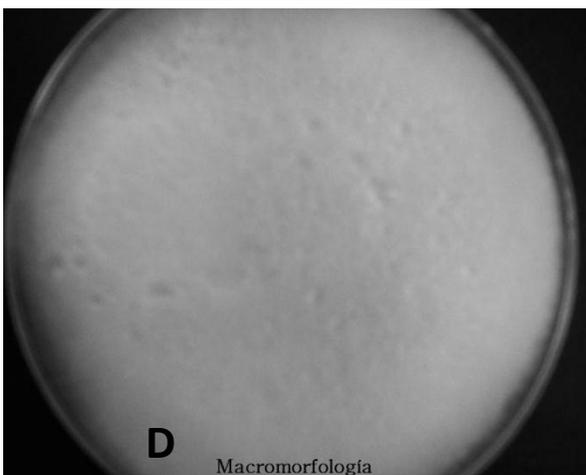
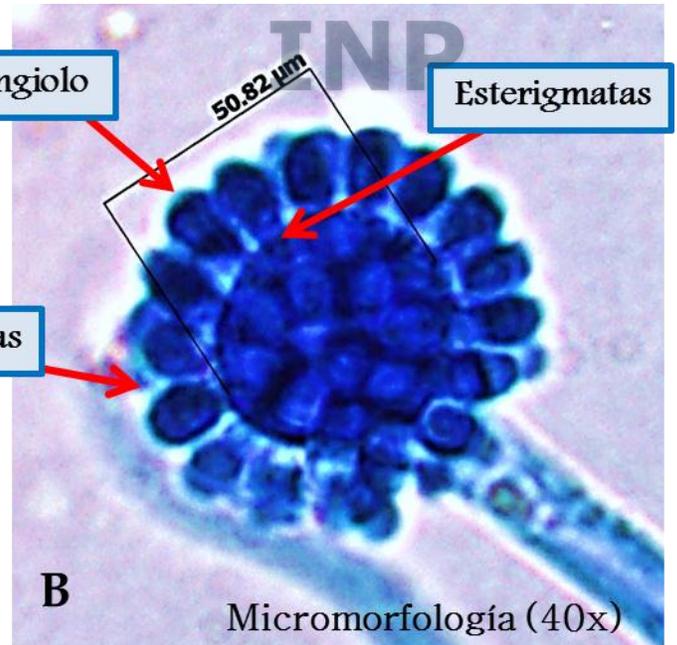
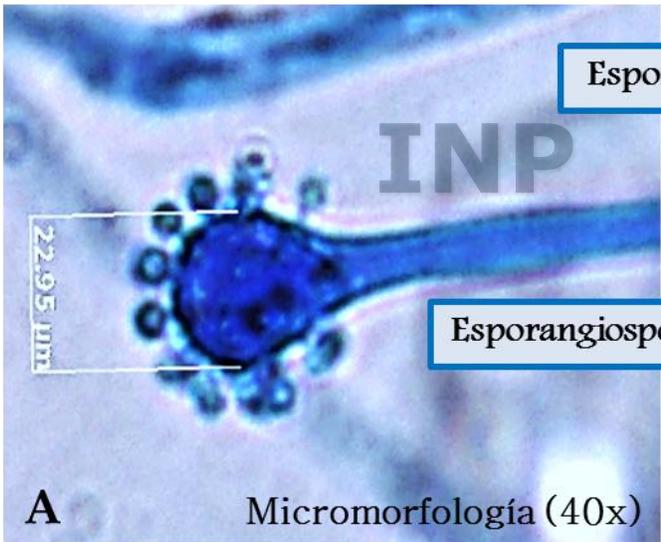
A) Los aneloconidios (6.5-13 μm) son espiculados (cuando alcanzan la madurez), en cadena, redondos, forman un anillo en el

ápice del conidio y la pared es gruesa. El anelóforo es septado, hialino y ramificado (4-8 x 22-26.5 μm).

C) La colonia se desarrolla de 5 a 7 días, a una temperatura de 28°C. En un inicio es blanca, plana, seca y cuando madura es de color beige, y cerebriforme. Este hongo es generador de onicomiosis y se suele confundir con *Penicillium sp.*



3) *Cunninghamella* sp.



A) La vesícula en las cepas jóvenes miden aproximadamente 23 µm,

B) mientras que las colonias maduras miden hasta 60 µm.

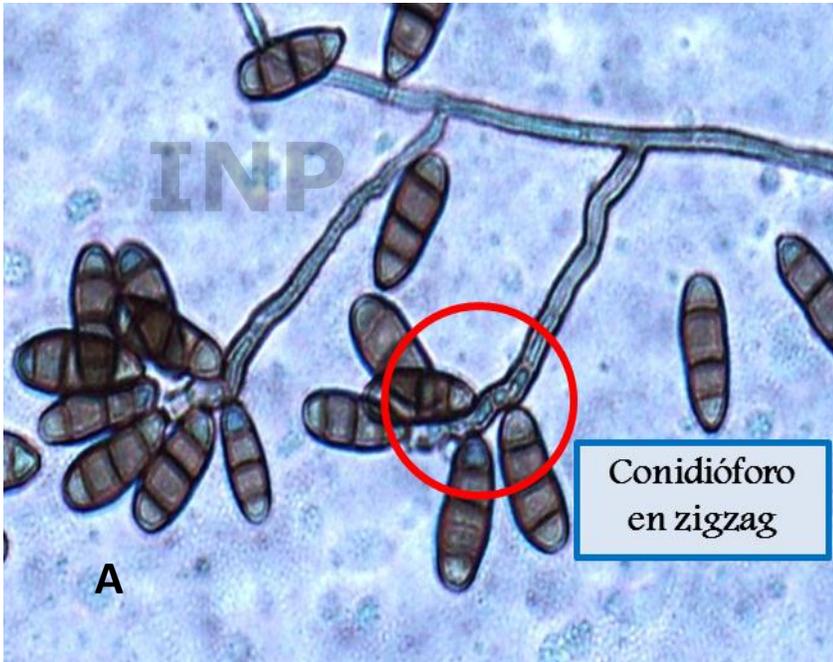
De las esterigmatas (talos cortos) nacen los esporangios globosos (uniesporados), que originan a las esporangiosporas o esporangioconidios ovales.

El micelio es cenocítico, recto, con ramas solitarias, macrosifonado y hialino de diversos tamaños.

C) Modalidad de la hifa pectinada.

D) El desarrollo de la colonia es rápida (3 días, 28°C) en medios como Agar Sabouraud, Agar Sabouraud con Cloranfenicol y Agar papa. Tienden a cubrir todo el medio, es algodonosa, de blanco a grisácea con el tiempo y seca

4) *Curvularia sp.*



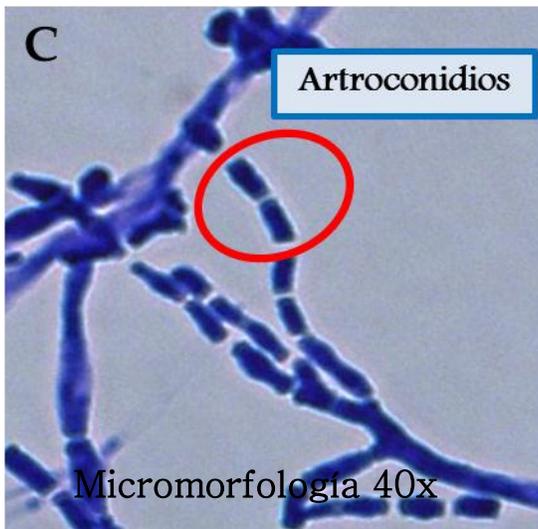
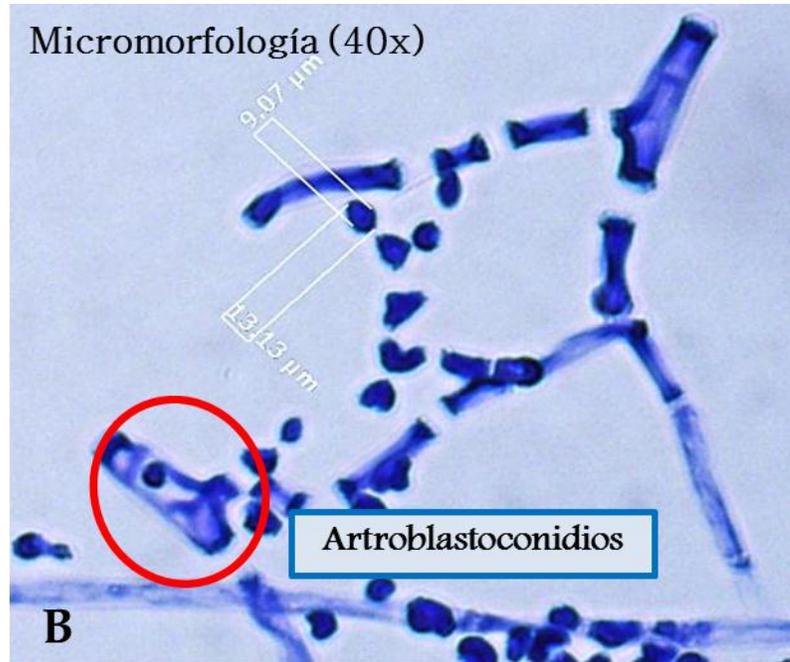
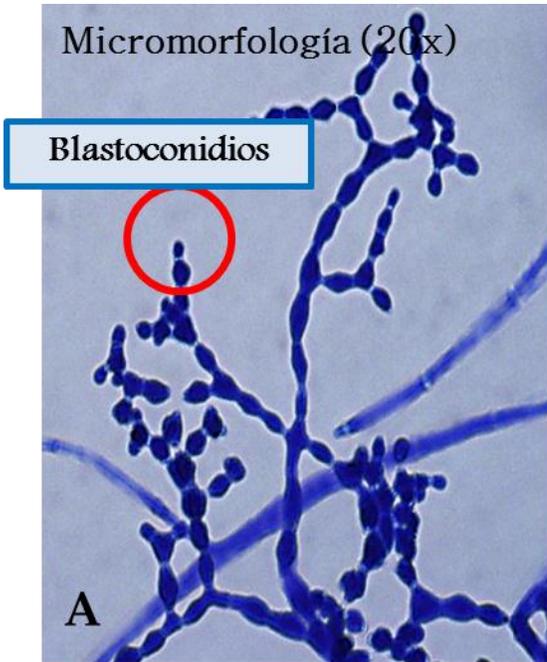
A) El micelio es macrosifonado, café y septado. El conidióforo también es septado y en la parte terminal está en zigzag. Macroconidios simpodiales (en forma de bumerán), ovalados y por lo general con cuatro septos transversales. Con el tiempo en algunos

macroconidios la célula central se curva. Cuando los macroconidios son inmaduros miden de 14-20 x 31-40.5 μm y cuando maduran miden de 20-24 x 56-73 μm .

B) El hongo crece a 28°C de 5 a 7 días en medios como ASD, ASD más Cloranfenicol y PDA. En el anverso este es aterciopelado, plano, ilimitado y de color verde olivo a negro. Y en el reverso produce un pigmento negro

difusible al medio.

5) Neurospora sp.



Las hifas son septadas, hialinas, dicotómicas y macrosifonadas.

Los conidios se presenta en tres formas:

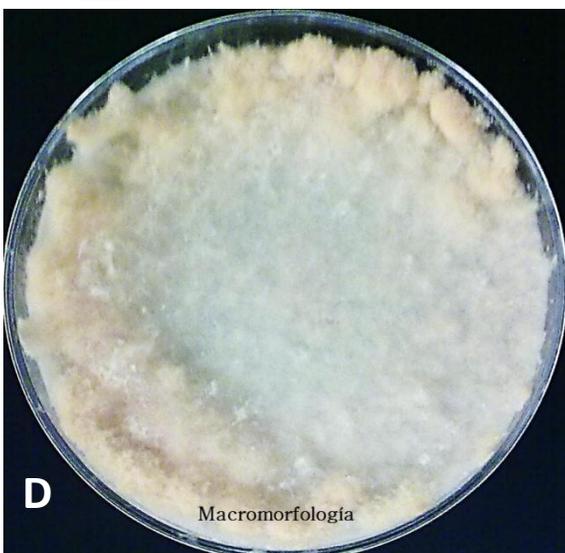
A) blastoconidios (8 x 8-13 μm)

B) arthroblastoconidios y

C) arthroconidios (6-11.5 μm).

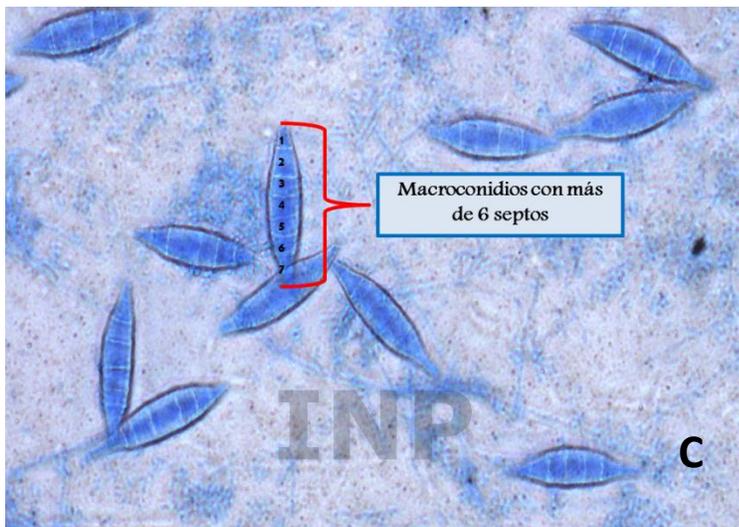
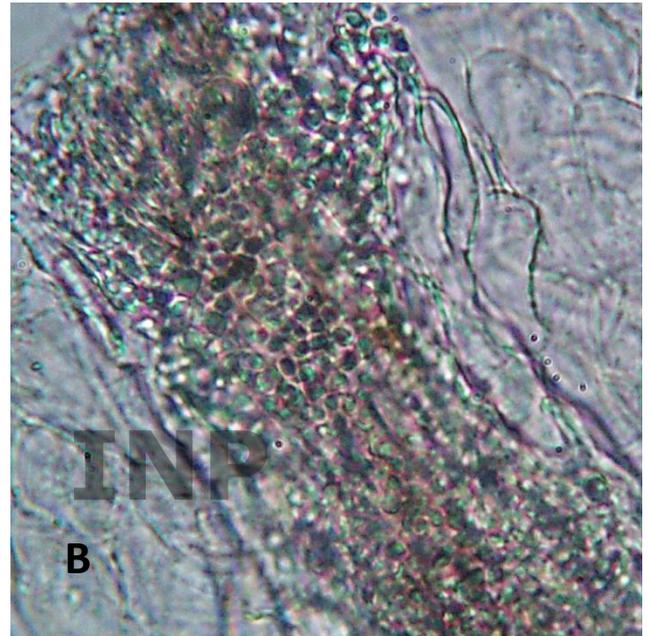
D) La cepa madura rápido en 3 días a 28°C, la colonia es vellosa, de color salmón o rosa, muy delicada (frágil) y llega a cubrir todo el medio.

Es el hongo más contaminante y raramente está involucrado en infecciones. Puede confundirse con cepas de *Coccidioides immitis* o *Geotrichum sp.*



6) Tiña del cuerpo

Tiña de cuerpo en dos hermanos infectados por un gato callejero.



A) Las lesiones son placas circulares eritemato-escamosas muy pruriginosas con un borde periférico.

B) Pelo con KOH al 20%, donde se ven cúmulos de microconidios en parasitación endótrix.

C) Abundantes

macroconidios, de más de 6 septos, pared gruesa (30 x 120-140 μm).

D) Colonias vellosa, plana, de color blanco, con un crecimiento radial, que se adhiere al tubo, pigmento color amarillo difusible al medio.

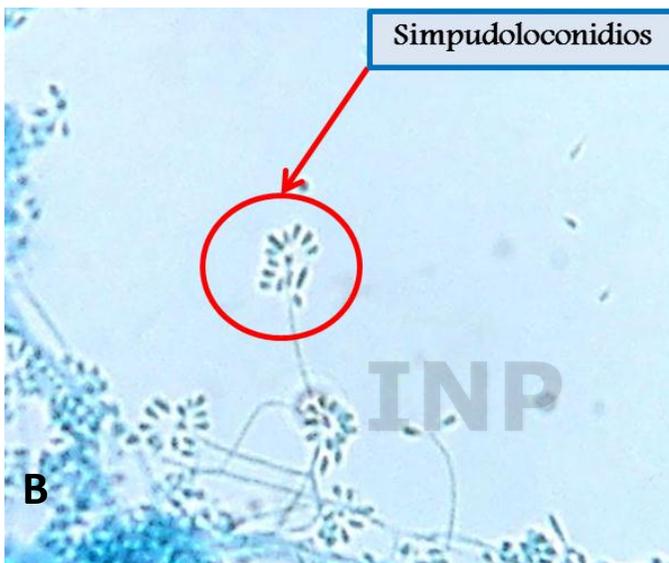
7) Esporotricosis

Caso de un paciente masculino de 12 años de edad, procedente de Guerrero que trabaja en el campo.



A) Lesiones en brazo nódulo-gomosas elevadas con periferia hiperpigmentadas.

B) Simpoduloconidios (2.0 x 3.5-4.5 μm) son redondos y periformes «en forma de semilla de ajonjolí», que



nacen del conidióforo en forma de flor de durazno y otros que nacen de la hifa sostenidos por pequeños denticulos (raduloconidios).

C) Microconidios en forma de semilla de ajonjolí con residuos de fragmentos de micelio. Obtenidos del cultivo del hongo en agar gelosa sangre (37°C, 7 días).

D) Cultivo en ASD, cepa membranosa, dura, aterciopelada, de 2 a 3 semanas (28°C) produce un pigmento de color negro (melánico).

