



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**Guía práctica de micología médica**

**(Parte II)**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

**PRESENTA:**

**RICARDO CÉSAR DOMÍNGUEZ CANO**

**ASESOR. Q.F.B LETICIA CUBILLO CARRILLO**

**CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO**

**2018**



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.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

**ASUNTO: VOTO APROBATORIO**

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

**Guía práctica de micología médica (Parte II).**

Que presenta el pasante: **Ricardo César Domínguez Cano**

Con número de cuenta: 309093152 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

**ATENTAMENTE**

**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 03 de Septiembre de 2018.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Dr. Enrique Salas Téllez	
<b>VOCAL</b>	Dra. Alma Lucila Nuñez del Arco	
<b>SECRETARIO</b>	Q.F.B. Leticia Cubillo Carrillo	
<b>1er. SUPLENTE</b>	M. en C. Socorro Sandra Martínez Robles	
<b>2do. SUPLENTE</b>	Q.F.B. Alma Susana García Barrón	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga\*

## ***Dedicatoria***

Primero quiero dar gracias a Dios por darme la oportunidad de llegar hasta aquí después de tantos años de esfuerzo y dedicación los cuáles el día de hoy rinden frutos.

A mi asesora de tesis Leticia Cubillo Carrillo que me acompañó en este recorrido desde que inicie mi servicio social con ella, por su paciencia, dedicación y profesionalismo para ayudarme a lograr mis metas y así poder aplicar y reforzar mis conocimientos adquiridos durante toda la licenciatura.

A mi familia, en especial a mis padres Marisela Cano Orozco y Trinidad Domínguez Morales que han sido mi apoyo y motor en todo momento de mi vida, ya que sin sus consejos y experiencias hubiera sido un camino difícil para mi, este logro es para ellos y una manera de agradecerles el esfuerzo que han hecho durante tantos años.

A mis amigos que me apoyaron en las buenas y malas con palabras de aliento, con un hombro para poder llorar cuando lo necesite y como soporte para no caer, a todos ellos muchas gracias ya que han sido, son y serán parte fundamental en mi vida.

A mis compañeros de trabajo y jefes de trabajo Alicia Aguilar y Christian Vázquez por darme la oportunidad de poder iniciar mi carrera laboral y por el apoyo y comprensión brindado para que pudiera culminar esta etapa de mi vida.

Y muy en especial a mi segunda madre mi madrina Lupita, que aunque ya no se encuentra físicamente, nunca dejo de apoyarme para poder lograr mis objetivos hasta el final con muestras de cariño y motivación, siempre le agradeceré infinitamente lo que hizo por mi durante toda su vida. Por siempre estará en mi corazón.

Y finalmente a mi querida Universidad, la que me brindo todas sus instalaciones y a los mejores académicos para forjarme como un buen profesionista, que siempre pensará en apoyar a lo sociedad y mejorar continuamente para dar lo mejor de mi y poder servir con dignidad a mi país.

Mi corazón azul y oro siempre será.

A todos ellos..... MUCHAS GRACIAS.

## ÍNDICE

<b>Objetivo general y particulares</b>	1
<b>Justificación</b>	2
<b>Introducción</b>	3
<b>Metodología</b>	4
<b><i>Tema: Micetoma</i></b>	5
<u><i>Subtemas:</i></u>	
a) Introducción	5-7
b) Siembra en agares selectivos	8
Agar BHI	8
Agar Sangre	9
Agar Caseína	10
Agar Tirosina	11
c) Tinción de Ziehl-Neelsen y Gram	12-14
<b><i>Tema: Micosis producidas por Cándida</i></b>	15
<u><i>Subtemas</i></u>	
a) Introducción	15-18
b) Siembra en agares selectivos	19
Agar SDA	19
Agar Biggy	20
CHROMagar Candida	21
Agar Harina de Maíz	22-23
Agar Lactrimel (HALEMi)	24-25
c) Tinción de Gram	26-27
c) Tubo germinativo	28

<b><i>Tema: Micosis producidas por Cryptococcus</i></b>	29
<b><u>Subtemas</u></b>	
a) Introducción	29-31
b) Siembra en agares selectivos	32
Agar SDA	32
Agar Niger	33
Agar Dextrosa Urea	34
c) Tinción de Gram	35-36
d) Tinción de Cápsula	37
<b><i>Tema: Micosis producidas por Aspergillus</i></b>	38
<b><u>Subtemas</u></b>	
a) Introducción	38-40
b) Siembra en agares selectivos	41
Agar SDA	41-44
Agar Extracto de Malta	45-46
Agar Czapek-Dox	47-48
c) Tinción Azul de Algodón	49-52
d) Microcultivo	53-55
e) Medio de arroz	56-59

<b>Anexos</b>	60
1) Tabla de identificación para especies de Candida en CHROMagar	61
2) Técnica de Dalmau	62
3) Tabla de identificación de Cándida por reducción de carbohidratos	63
4) Preparación de medios de cultivo	64
4.1) Medio Agar Dextrosa Saboraud (SDA)	64
4.2) Medio Brain Heart Infusion (BHI)	64
4.3) Medio Agar Sangre (AS)	64
4.4) Medio Caseína	65
4.5) Medio Tirosina	65
4.6) Medio Lactrimel (HALEMi) modificado	65
4.7) Medio Biggy	66
4.8) Medio Harina de Maíz (Corn Meal)	66
4.9) Medio Niger	66
4.10) Medio Agar Dextrosa Urea	67
4.11) Medio Czapek-Dox	67
4.12) Medio Extracto de Malta	67
4.13) Medio de Arroz	67
5) Tabla de coloración de diferentes especies de Candida en medio Biggy	68
<b>Referencias</b>	69-74

### **Objetivo general:**

-Realizar una guía práctica de Laboratorio de Micología para la carrera de Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica con la finalidad de que el alumno adquiera los conocimientos y habilidades necesarias en esta área.

### **Objetivos particulares:**

- Apoyar a los alumnos con dicha guía que se encuentran cursando el laboratorio para que en conjunto con los apuntes tomados durante el semestre, comprendan mejor los temas y obtengan mejores resultados durante el curso.

- Conocer las diferentes técnicas utilizadas en Micología para la correcta identificación de los diferentes géneros de interés médico e industrial.

**Justificación:**

La asignatura de Micología se encuentra en el 7° semestre del plan de estudios de la licenciatura en Bioquímica Diagnóstica, es fundamental su conocimiento para el diagnóstico a nivel clínico y en algunas ocasiones industrial, farmacéutico y alimenticio.

Al estar ligada con algunas asignaturas como Microbiología general e Inmunobiología principalmente, los conocimientos previamente adquiridos ayudan al proceso de aprendizaje, sin embargo en los últimos semestres la carga de trabajo aumenta así como la dificultad en algunas asignaturas, lo cual complica adquirir los conocimientos de Micología debido a la falta de tiempo para consultar alguna fuente bibliográfica referente al área que sirva como apoyo.

Por lo tanto la finalidad de este trabajo es poder brindarle al alumno el conocimiento básico necesario en el área de Micología de manera didáctica.

## **Introducción:**

Las infecciones por hongos constituyen un problema de salud pública en muchos países del mundo. En México se han hecho numerosas aportaciones que confirman la existencia de la mayoría de hongos patógenos descritos hasta la fecha. Las infecciones por hongos se pueden presentar en cualquier tejido del cuerpo, sin embargo, las principales son en piel y pulmones. **(Lopez, 2009)**

La micología médica es una rama de la microbiología, interrelacionada con todas las especialidades de medicina que tiene por objeto estudiar las enfermedades producidas por hongos y los hongos que las producen. Originalmente los hongos se consideraron plantas inferiores en la categoría de las criptógamas y en el filo (phylum) Thallopites. En 1969, Robert H. Whittaker los clasificó en el reino *Fungae* y agrupó a los seres vivos en cinco reinos en la escala biológica: Mónera, Protista, *Fungae*, *Plantae*, Animalia. El reino Mónera incluía las bacterias, los actinomicetos y algunas algas verdes y azules; el reino Protista (Protoctista), los protozoarios y el resto de las algas; el *Plantae*, los vegetales superiores, y el Animalia, los animales superiores. En 2002, Bryce Kendrick, fundamentado en otras técnicas (inmunología y biología molecular), los clasificó en 7 reinos: Archaeobacteria, Eubacteria, Chromista, Protozoa, Fungi, *Plantae* y Animalia. Los dos primeros tienen células procariontes y también se llaman dominios; los demás son eucariontes; desde el punto de vista filogenético, los animales están cercanos a los hongos, en los cuales los hongos inferiores (Zygomycota) están separados de los superiores (Basidiomycota y Ascomycota). Esa clasificación es la que se acepta en la actualidad. **(Arenas, 2014)**

## Metodología:

Se recopiló toda la información necesaria de los temas a desarrollar basándose en el Manual de Prácticas de Micología Médica ya existente, se consultaron páginas electrónicas y libros para obtener la bibliografía de referencia.

A la vez se realizó la parte práctica del trabajo que consistió en:

- 1) Preparar todos los medios de cultivo que se emplean para cada género de hongo.
- 2) Sembrado de cada cepa en sus respectivos agares.
- 3) Inoculación en microcultivos para las cepas que lo requieren.
- 4) Tinciones que permitieron identificar la morfología del microorganismo.

\*Se tomaron fotografías de los medios de cultivo de cada una de las prácticas con una cámara de alta resolución, así como de las respectivas tinciones con la cámara AmScope UCMOS SERIES Microscope Camera.

\*\*Las cepas fueron donadas por el laboratorio 10 de Microbiología Unidad de Posgrado FESC Campo 1.

Las prácticas que se desarrollaron fueron:

- 1) *Micetoma*
- 2) Micosis producidas por *Candida*
- 3) Micosis producidas por *Cryptococcus*
- 4) Micosis producidas por *Aspergillus*

Cada práctica cuenta con los siguientes puntos:

- Breve introducción
- Fundamentos (Inoculación en medios de cultivo, tinciones)
- Metodología
- Fotografías

## MICETOMA

### Introducción:

Se define como un síndrome anatomoclínico de tipo inflamatorio crónico, constituido por aumento de volumen, deformación de la región que afecta y lesiones de aspecto nodular, fistulizadas, de donde drena un exudado filante que contiene las formas parasitarias denominadas “granos”; es una infección subcutánea por implantación; por su etiología se divide en dos tipos: eumicetoma, causado por hongos filamentosos y actinomicetoma, por diversos actinomicetos filamentosos aerobios. **(Guevara, 2003)**

Actinomicetoma o micetoma actinomicético: Es causado por actinomicetos filamentosos (microsifonados), aerobios, grampositivos; la mayoría de los casos están comprendidos en tres géneros: *Nocardia*, *Actinomadura* y *Streptomyces*. En México los dos principales agentes etiológicos son *Nocardia brasiliensis* (85%) y *Actinomadura madurae* (8 a 10 %). **(Bonifaz, 2015)**

Eumicetoma o micetoma eumicético: Es causado por hongos filamentosos (macrosifonados), tabicados, pigmentados o negros y hialinos o blancos. Los agentes etiológicos quedan comprendidos en varios géneros, dentro de los que destacan: hongos negros como *Madurella*, *Pyrenochaeta*, *Exophilia*, *Leptosphaeria* y *Curvularia*; los más frecuentes son *Madurella mycetomatis* y *Trematosphaeria grisea*; y hongos blancos como *Pseudallescheria*, *Acremonium* y *Fusarium*, donde la especie que más se aísla es *Pseudallescheria boydii*. **(Bonifaz, 2015)**

Para la correcta identificación del hongo es necesario realizar una serie de tinciones e inoculación en agares:

**-Tinción de Gram:** Es una tinción de carácter diferencial que sirve para distinguir a las bacterias Gram (+) de las Gram (-) a partir de su morfología celular principalmente con la ayuda de diferentes colorantes; el cristal violeta (colorante catiónico) penetra en todas las células bacterianas dando la primer coloración

(morado-azul), el lugol es un compuesto formado principalmente por yodo (I<sub>2</sub>) y yoduro de potasio (KI), este actúa como mordiente fijando con mayor intensidad al cristal violeta a la pared celular de la bacteria, por su parte la mezcla de alcohol-acetona sirve para realizar la decoloración, ya que en la misma es soluble el complejo I<sub>2</sub>/cristal violeta; los organismos Gram (+) no se decoloran mientras que los negativos si. Para poner de manifiesto a las bacterias Gram (-) se utiliza un colorante de contraste como la safranina. Después de esta coloración quedarán las bacterias Gram (+) de un color violeta mientras las Gram (-) serán rojas, esta tinción ayuda a denotar la morfología de *N. brasiliensis* ya que es un hongo de etiología bacteriana inducida por actinomicetos siendo un bacilo Gram (+). **(Rodríguez, 2005)**

**-Tinción de Ziehl-Neelsen:** Es fundamental ya que las bacterias ácido-alcohol resistentes son bacterias Gram (+) que resisten la decoloración con soluciones de etanol en ácido clorhídrico. Esta resistencia se debe a ácidos grasos específicos de la pared (ácidos micólicos). El resultado es la formación de una pared lipídica (hidrófoba). En consecuencia la pared dificulta la difusión de las moléculas hidrofílicas a través de su envoltura celular. El alcohol-clorhídrico no las decolora, por lo que se observan de color rojo. Cualquier otra célula es decolorada, por lo que admite la tinción por un segundo colorante (azul de metileno). En esta caso *N. brasiliensis* es una bacteria ácido-alcohol parcialmente resistente debido a que tiene afinidad por el azul de metileno y la decoloración es baja. **(Rodríguez, 2005)**

**-Agar Caseína y Tirosina:** Son medios sólidos recomendados para diferenciar a los actinomicetos aerobios con base a la hidrólisis de estos sustratos. Las proteínas están formadas por varias cadenas de aminoácidos unidas entre sí por enlaces peptídicos, y los microorganismos hidrolíticos tienen la capacidad de romper los enlaces peptídicos. Al momento de esta ruptura se forma un halo alrededor de donde creció la colonia representando así la hidrólisis de dichas proteínas, fenómeno que es notorio al momento del crecimiento de una cepa de *N. brasiliensis*. La morfología colonial de estos hongos es muy variable, aunque

suelen presentar un aspecto ceráceo, de superficie rugosa, blanca amarillenta o naranja. **(Hardy Diagnostics, 2016)**

Propiedades	<i>N. asteroides</i>	<i>N. farcinica</i>	<i>N. abscessus</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. nova</i>	<i>N. otidiscaviarum</i>
Caseína	-	+	-	+	-	-
Gelatina	-	-	-	+	-	-
Esculina	-	-	-	+	-	+
Hipoxantina	-	-	-	+	-	+
Tirosina	+/-	-	-	+	-	-
Xantina	-	-	-	-	-	+
Nitrato-reductasa	-	-	+	+	+	+
Ureasa	+	+	+	+	+	+
Citrato	-	-	+	+	-	-
L-ramnosa	-	+	-	-	-	-
D-sorbitol	-	-	-	-	-	-
Crec. 45°C	+/-	-	-	-	-	+/-

**(Bonifaz, 2015)**

**-Agar Sangre:** Es especial para el crecimiento de microorganismo exigentes ya que la infusión de músculo de corazón, sangre y peptona aportan los nutrientes esenciales, además de que permite ver hemólisis en el medio. Es básico para el crecimiento de *N. brasiliensis* ya que es un microorganismo exigente y es difícil hacerlo crecer en cualquier otro medio de cultivo. Su morfología colonial presenta un aspecto rugoso, blanco amarillento o naranja. **(Koneman, 2008)**

**-Agar BHI (Brain Heart Infusion):** Es un medio de uso general adecuado para el cultivo de una amplia variedad de tipos de organismos, incluidos las bacterias, levaduras y hongos filamentosos, se recomienda actualmente como medio universal para bacteriología aerobia y para la recuperación primaria de hongos y Actinomycetales a partir de muestras clínicas y no clínicas. El agar aporta los nutrientes de la infusión de cerebro y corazón, la peptona y la glucosa. Las peptonas y la infusión son fuentes de nitrógeno orgánico, carbono, azufre, vitaminas y sustancias de traza. La glucosa es la fuente de carbohidratos que los microorganismos utilizan mediante fermentación. Se utiliza fosfato disódico como tampón en el medio. **(Becton Dickinson, 2013)**

## INÓCULO DE MEDIOS DE CULTIVO

### **Medio Brain Heart Infusion BHI (Ver anexo 4.2):**

1. De una cepa pura de *Nocardia brasiliensis* tomar un pequeño inóculo con un asa de pequeño calibre (0.05 ml) previamente esterilizada.
2. Sembrar por técnica americana o masiva.
3. Incubar por 3 días a 25°C.
4. Pasado el tiempo de incubación observar el tipo de crecimiento colonial.  
**(Stainer, 1996)**



**Imagen 1.** Crecimiento de *Nocardia brasiliensis* en agar BHI, tomada por Ricardo César Domínguez Cano en el laboratorio 10 Unidad de posgrado FESC Campo 1. Se observan colonias ceráceas, rugosas, blanquecinas amarillentas.

**Medio Agar Sangre (Ver Anexo 4.3):**

1. De una cepa pura de *Nocardia brasiliensis* tomar un pequeño inóculo con un asa de pequeño calibre (0.05 ml) previamente esterilizada.
2. Sembrar por técnica americana o masiva.
3. Incubar por 3 días a 25°C.
4. Pasado el tiempo de incubación observar el tipo de crecimiento colonial y si hubo un cambio en el medio de cultivo (hemólisis).  
**(Stainer, 1996)**



**Imagen 2.** Crecimiento de *Nocardia brasiliensis* en agar Sangre, tomada por Ricardo César Domínguez Cano en el laboratorio 10 Unidad de posgrado FESC Campo 1. Se observan colonias ceráceas, rugosas, blanquecinas.

**Medio Caseína (Ver Anexo 4.4):**

1. De una cepa pura de *Nocardia brasiliensis* tomar un pequeño inóculo con un asa de pequeño calibre (0.05 ml) previamente esterilizada.
2. Trazar dos estrías en la parte central del medio dejando una separación entre cada estría.
3. Incubar por 3 días a 25°C.

**NOTA:** En caso de no ser visible la hidrólisis revelar con lugol.  
**(Stainer, 1996)**



**Imagen 3.** Crecimiento de *Nocardia brasiliensis* en agar Caseína, tomada por Ricardo César Domínguez Cano en el laboratorio 10 Unidad de posgrado FESC Campo 1. Se observa la hidrólisis de caseína alrededor del crecimiento colonial (color amarillo)

**Medio Tirosina (Ver Anexo 4.5):**

1. De una cepa pura de *Nocardia brasiliensis* tomar un pequeño inóculo con un asa de pequeño calibre (0.05 ml) previamente esterilizada.
2. Trazar dos estrías en la parte central del medio dejando una separación entre cada estría.
3. Incubar por 3 días a 25°C.

**NOTA:** En caso de no ser visible la hidrólisis revelar con lugol.  
**(Stainer, 1996)**



**Imagen 4.** Crecimiento de *Nocardia brasiliensis* en agar Tirosina, tomada por Ricardo César Domínguez Cano en el laboratorio 10 Unidad de posgrado FESC Campo 1. Se observa la hidrólisis de Tirosina alrededor del crecimiento colonial (amarillo-marrón)

## **METODOLOGÍA:**

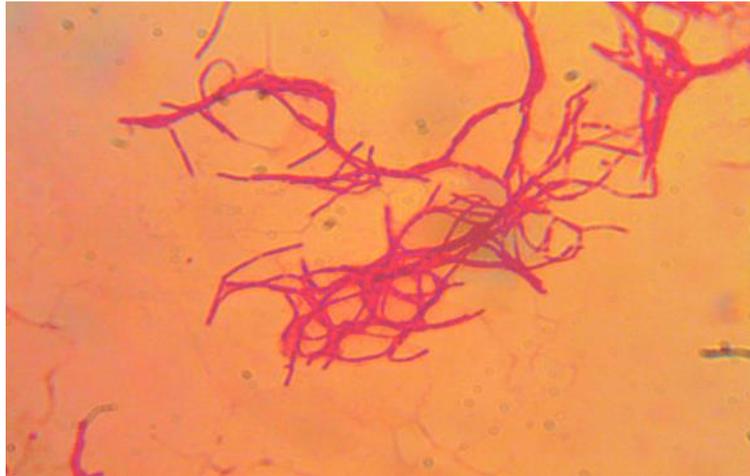
### **TINCIONES**

#### ***Tinción de Ziehl-Neelsen:***

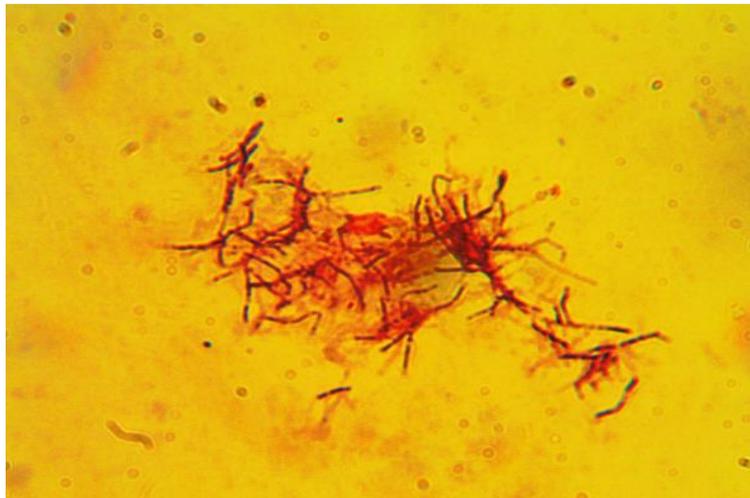
1. De una cepa pura de *Nocardia brasiliensis* tomar un pequeño inóculo con un asa de pequeño calibre (0.05 ml) previamente esterilizada.
2. Realizar un frotis de la cepa.
3. Cubrir todo el portaobjetos con fucsina.
4. Calentar hasta la emisión de vapores (por 10 min)
5. Cubrir con solución alcohol-ácido durante 2 min.
6. Lavar con agua.
7. Cubrir con azul de metileno por 1 min.
8. Lavar con agua.
9. Una vez seco observar al microscopio con el objetivo de 100x. (**Britania Lab, 2013**)

**Tinción de Gram:**

1. De una cepa pura de *Nocardia brasiliensis* tomar un pequeño inóculo con un asa de pequeño calibre (0.05 ml) previamente esterilizada.
2. Realizar un frotis de la cepa.
3. Agregar cristal violeta a modo que cubra toda la muestra el colorante y esperar un minuto.
4. Enjuagar con agua no directamente sobre la muestra.
5. Agregar lugol y esperar 30 segundos.
6. Decantar el excedente de lugol sin enjuagar la muestra.
7. Agregar alcohol acetona y esperar 2 segundos.
8. Enjuagar con agua.
9. Agregar safranina 1 minuto.
10. Enjuagar levemente con agua.
11. Observar al microscopio con el objetivo de 100x agregando previamente una gota de aceite de inmersión. **(Esaú, 2014)**



**Imagen 5.** *Nocardia brasiliensis* observado con objetivo 100x en tinción de Ziehl-Neelsen, tomada por Ricardo César Domínguez Cano en el laboratorio 10 Unidad de posgrado FESC Campo 1. Se observan bacilos filamentosos ácido-alcohol resistente.



**Imagen 6.** *Nocardia brasiliensis* Bacilo Gram (+), objetivo 100x con tinción de Gram, tomada por Ricardo César Domínguez Cano en el laboratorio 10 Unidad de posgrado FESC Campo 1. Se observan bacilos filamentosos morados correspondientes al actinomiceto.

## MICOSIS PRODUCIDAS POR *CANDIDA*

### Introducción:

Es una micosis primaria o secundaria ocasionada por levaduras endógenas y oportunistas del género *Candida*, en especial *C. albicans*. Las manifestaciones clínicas son localizadas, diseminadas o sistémicas; puede afectar piel, mucosas, estructuras profundas y órganos internos. Las alteraciones histopatológicas varían desde inflamación mínima hasta supuración o granuloma. La evolución es aguda, subaguda o crónica. **(Arenas, 2014)**

Es cosmopolita. Se considera una de las infecciones oportunistas más frecuentes en humanos. La incidencia se ha elevado durante los últimos 30 años. Entre las micosis, abarca el 7.45% y constituye 25% de las micosis superficiales. Afecta a individuos de cualquier edad, grupo étnico o sexo. No tiene relación con el clima, la situación geográfica ni el estado socioeconómico; sin embargo, se han encontrado algunas diferencias regionales, por ejemplo, la candidosis interdigital de los pies es más frecuente en lugares tropicales y la onicomicosis sin paroniquia, en los más fríos. **(Arenas, 2014)**

*C. albicans*, la especie más importante, es parte de la flora normal de las vías gastrointestinales, las mucosas bucal (31 a 55%) y vaginal (13% de mujeres), así como de la piel periorificial de individuos sanos (25 a 50%). *Candida* vive en equilibrio con otros microorganismos del cuerpo humano, y coexiste como comensal, pero cuando este equilibrio se pierde, se torna patógena y causa afección mucocutánea. **(Arenas, 2014)**

Estos hongos se encuentran distribuidos en la naturaleza, pero *C. albicans*, la cual es la especie más frecuente, sólo se encuentra como endosaprófito del tubo digestivo de mamíferos y aves; la segunda especie de importancia es *C. tropicalis*, se aísla de la orofaringe y *C. glabrata* de vagina. En los humanos, son comensales de la cavidad bucal (1.5 a 41.4% [*C. albicans*, 75%; *C. tropicalis*, 8%, y *C. krusei*, 3 a 6%]), aparato digestivo (0 a 55% [*C. albicans*, 50%]), mucosa vaginal (2.2 a 68% [*C. albicans*, 75%; *C. tropicalis*, y *C. parapsilosis*]). La mayor parte de las

levaduras también se encuentran en piel sana, excepto *C. albicans* y *C. tropicalis*, que llegan a aislarse de la región perianal, peribucal y de dedos. En humanos también se ha aislado *C. lusitanae*. **(Koneman, 2008) Ver Anexo 3**

Para la correcta identificación del hongo es necesario realizarse una serie de tinciones e inoculación en agares:

**-Tinción de Gram:** Es una tinción de carácter diferencial que sirve para distinguir a las bacterias Gram (+) de las Gram (-) a partir de su morfología celular al igual que diferentes hongos y levaduras principalmente con la ayuda de diferentes colorantes; el cristal violeta (colorante catiónico) penetra en todas las células de la levadura dando la primer coloración (morado-azul), el lugol es un compuesto formado principalmente por yodo ( $I_2$ ) y yoduro de potasio (KI), este actúa como mordiente fijando con mayor intensidad al cristal violeta a la pared celular de la levadura, por su parte la mezcla de alcohol-acetona sirve para realizar la decoloración, ya que en la misma es soluble el complejo  $I_2$ /cristal violeta; los organismos Gram (+) no se decoloran mientras que los negativos si. Para poner de manifiesto a las levaduras Gram (-) (*Cryptococcus neoformans* principalmente) se utiliza un colorante de contraste como la safranina o fucsina que son de color rojo. **(Rodríguez, 2005)**

Esta tinción permite apreciar levaduras únicas o en gemación (blastoconidios) con o sin la presencia de pseudomicelio. En frotis las estructuras son Gram positivas. Se da mayor validez al papel patógeno de *Candida*, cuando se aprecian más de cuatro levaduras por campo, cuando son observadas a un aumento de 40x y/o existe pseudomicelio. **(Castañón, 2016).**

La mayoría de los agares para este género son selectivos, es decir específicos para su crecimiento debido a sus componentes y como ayudan al crecimiento del mismo.

**-Agar Dextrosa Sabouraud (SDA):** Favorece el crecimiento de hongos en general ya que proporciona al medio peptona y glucosa como nutrientes, además de que posee un pH bajo que favorece su crecimiento, permitiendo identificar su morfología vegetativa para su clasificación. **(Salas, 2011)**

**-Agar Biggy (Bismuth Glucose Glycine Yeast):** Es un medio selectivo y diferencial utilizado para el aislamiento e identificación presuntiva de especies de *Candida*. La diferencia está basada en la morfología colonial y la pigmentación típica que se presenta en este medio. **(López, 2005) Ver Anexo 5**

El extracto de levadura proporciona nutrientes esenciales para el crecimiento, tales como nitrógeno, vitaminas y aminoácidos. La glicina es utilizada para estimular el crecimiento, además por su alta concentración, también inhibe a ciertos grupos bacterianos. La dextrosa es el carbohidrato fermentable, la fuente de carbono y de energía. El citrato de amonio y bismuto y el sulfito de sodio actúan como inhibidores del desarrollo bacteriano. Las especies de *Candida* a través de un proceso de reducción del sustrato, reducen la sal de bismuto a bismuto y el sulfito a sulfuro, estos se combinan, manifestándose en un precipitado negro o café que pigmenta a las colonias y que en ocasiones se difunde en el medio. **(MCD LAB, 2007)**

**-CHROMagar Candida:** Es un medio selectivo y de diferenciación para el aislamiento de hongos. Con la inclusión de sustratos cromógenos en el medio, las colonias de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei* producen colores diferentes, lo que permite la detección directa de estas especies de levaduras en la placa de aislamiento. Las peptonas especialmente seleccionadas son los nutrientes en el medio. La mezcla cromogénica consiste en sustratos artificiales (cromógenos), los cuales colorean los diferentes compuestos producidos por la degradación con las diferentes enzimas específicas. Las colonias de *C. albicans* presentan un color de verde claro a mediano, las colonias de *C. tropicalis*, de azul verdoso a azul metálico y las colonias de *C. krusei*, rosado claro con borde blancuzco. Es posible que otras especies de levaduras produzcan su color natural (crema) o presenten un color rosado o malva de claro a oscuro. **(Rambach, 2014)**

**-Agar Harina de Maíz (Corn Meal):** Favorece la formación de pseudohifas, blastoconidios y clamidiosporas (forma de resistencia); a su vez debe agregarse Tween 80 (polisorbato) a una concentración final de 0.02% para reducir la tensión superficial y aumentar la producción de hifas y blastoconidios. **(Linares, 2005)**

**-Tubo Germinativo:** Permite el desarrollo de extensiones filamentosas de la levadura que suelen ser hifas, utilizando suero humano (Grupo O de sexo masculino), de conejo, fetal bovino o equino como medio de crecimiento obteniendo los nutrientes necesarios. Permite diferenciar *C. albicans* del resto de *Candidas* ya que es la única especie en producir verdaderos tubos germinales. **(Linares, 2005)**

**-Agar Lactrimel (HALEMi):** Es un medio compuesto por caldo de harina de arroz al 3% mas 5% de leche entera mas 1% de miel de abeja, la mezcla de todos los componentes ayudan al crecimiento y desarrollo de la levadura favoreciendo la producción eficaz de clamidoconidios. **(Cuenca, 2002)**

Es importante mencionar que algunas especies de *Candida* pueden asimilar (Auxonograma) o fermentar (Zimograma) algunos carbohidratos como sorbitol, glucosa, rafinosa, manitol, xilosa, adonitol entre otros; estas son pruebas poco usadas actualmente para la identificación de la levadura pero que nos permite poder diferenciar entre especies a partir de los resultados que se obtienen. **(Prats, 2005) Ver Anexo 3**

## INÓCULO DE MEDIOS DE CULTIVO

### **Medio SDA (Ver Anexo 4.1):**

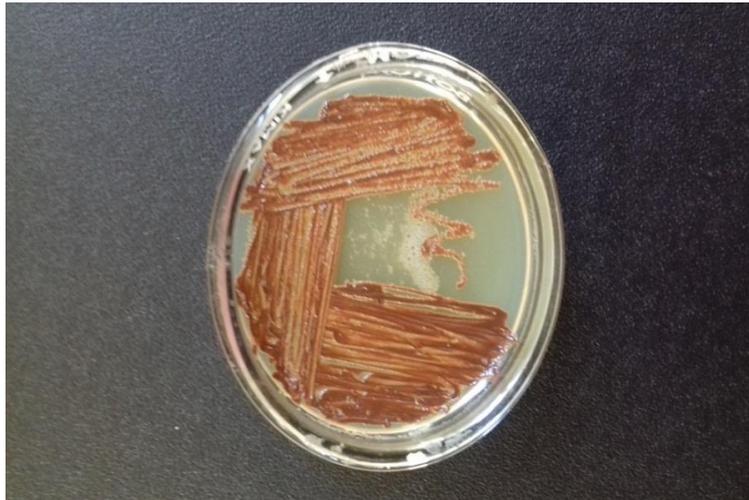
1. De una cepa pura de *Candida albicans* tomar un pequeño inóculo con un asa de pequeño calibre (0.05 ml) previamente esterilizada.
2. Sembrar por técnica americana.
3. Incubar por 24-48 hrs. a 37°C.
4. Pasado el tiempo de incubación observar el tipo de crecimiento colonial desarrollado en el medio de cultivo. **(López, 2009)**



**Imagen 7.** Crecimiento de *Candida albicans* en agar SDA a 37°C/48 hrs., se observan colonias cremosas, blanquecinas. Tomada por Ricardo César Domínguez Cano en el laboratorio 10 Unidad de posgrado FESC Campo 1

**Medio Biggy (Ver Anexo 4.7):**

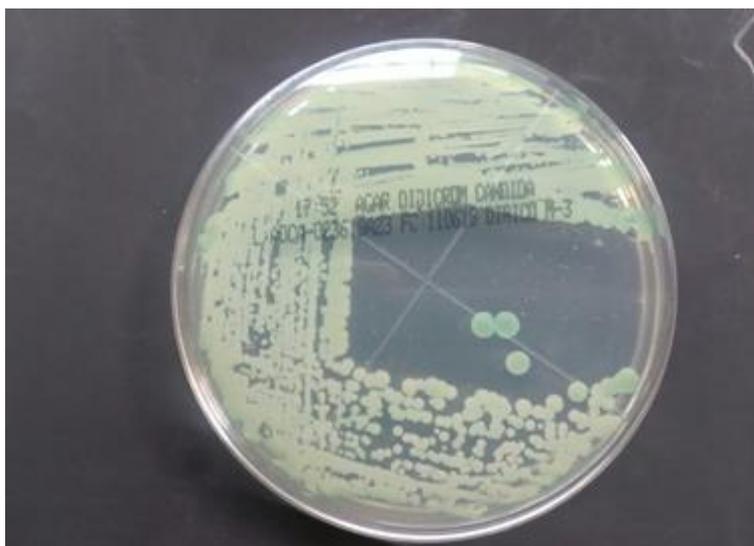
1. De una cepa pura de *Candida albicans* tomar un pequeño inóculo con un asa de pequeño calibre (0.05 ml) previamente esterilizada.
2. Sembrar por técnica americana.
3. Incubar por 48 hrs. a 37°C.
4. Pasado el tiempo de incubación observar el tipo de crecimiento colonial y la coloración que desarrollo en el medio de cultivo. **(Stainer, 1996)**



**Imagen 8.** Crecimiento de *Candida albicans* en agar Biggy, se observan colonias cremosas marrones. Tomada por Ricardo César Domínguez Cano en el laboratorio 10 Unidad de posgrado FESC Campo 1

**Medio CHROMagar Candida (Ver Anexo 1):**

1. De una cepa pura de *Candida albicans* tomar un pequeño inóculo con un asa de pequeño calibre (0.05 ml) previamente esterilizada.
2. Sembrar por técnica americana.
3. Incubar por 48 hrs. a 37°C.
4. Pasado el tiempo de incubación observar el tipo de crecimiento colonial y la coloración que desarrollo en el medio de cultivo. **(Stainer, 1996)**



**Imagen 9.** Crecimiento de *Candida albicans* en Chromagar, se observan colonias cremosas verduzcas. Tomada por Ricardo César Domínguez Cano en el laboratorio 10 Unidad de posgrado FESC Campo 1

**Medio Harina de Maíz (Corn Meal) Ver Anexo 4.8:**

1. De una cepa pura de *Candida albicans* tomar un pequeño inóculo con un asa de pequeño calibre (0.05 ml) previamente esterilizada.
2. Sembrar por técnica de Dalmau **Ver anexo 2. (Lazarde, 2000)**
3. Incubar a 37 °C durante 48 horas.
4. Examinar el cubreobjetos al microscopio con el objetivo de 100x la formación de pseudomicelios y clamidosporas. **(Lazarde, 2000)**

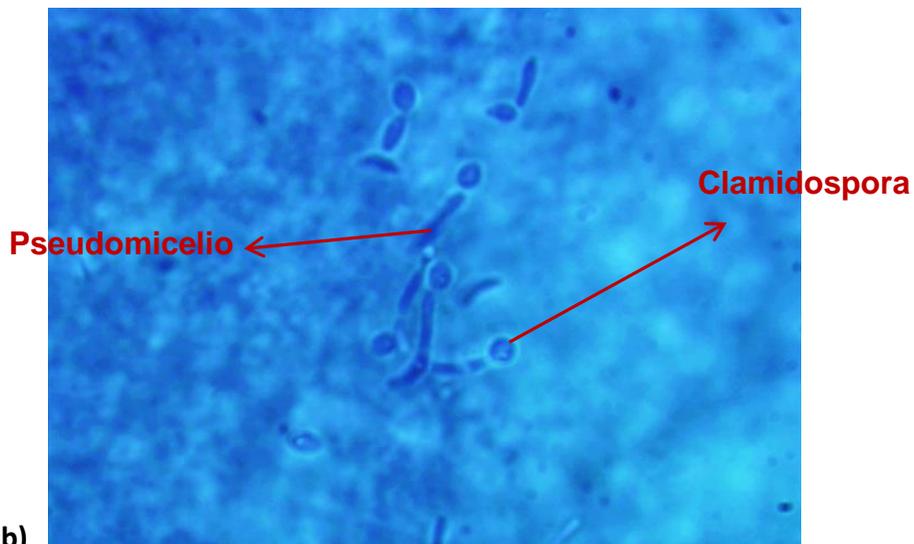
**NOTA:** Colocar una gota de azul de algodón para contrastar.



**Imagen 10.** Crecimiento de *Candida albicans* en agar harina de maíz, se observan colonias cremosas, blanquecinas. Tomada por Ricardo César Domínguez Cano en el laboratorio 10 Unidad de posgrado FESC Campo 1



a)

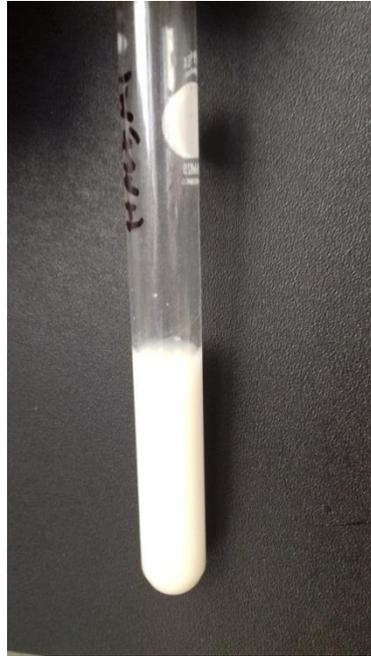


b)

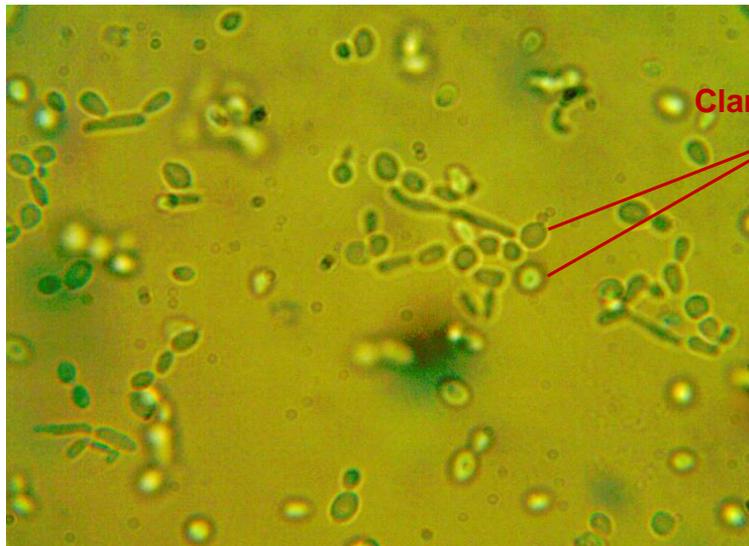
**Imagen 11. a)** Crecimiento de *Candida albicans* en agar harina de maíz tomada por Ricardo César Domínguez Cano. **b)** Pseudomicelios y Clamidosporas de *Candida albicans* en agar Harina de Maíz a 100x tomada por Ricardo César Domínguez Cano en el laboratorio 10 Unidad de posgrado FESC Campo 1

**Medio Lactrimel (HALEMi) Ver Anexo 4.6:**

1. De una cepa pura de *Candida albicans* tomar un pequeño inóculo con un asa de pequeño calibre (0.05 ml) previamente esterilizada.
2. Sembrar por inóculo pesado.
3. Incubar por 48 hrs. a 37°C.
4. Tomar un pequeño inóculo del medio, depositarlo en un portabjetos limpio y colocarle una gota de azul de algodón, colocar un cubreobjetos y examinar la muestra con el objetivo de 100x para observar la formación de clamidiosporas. **(Koneman, 2008)**



a)



Clamidiosporas

b)

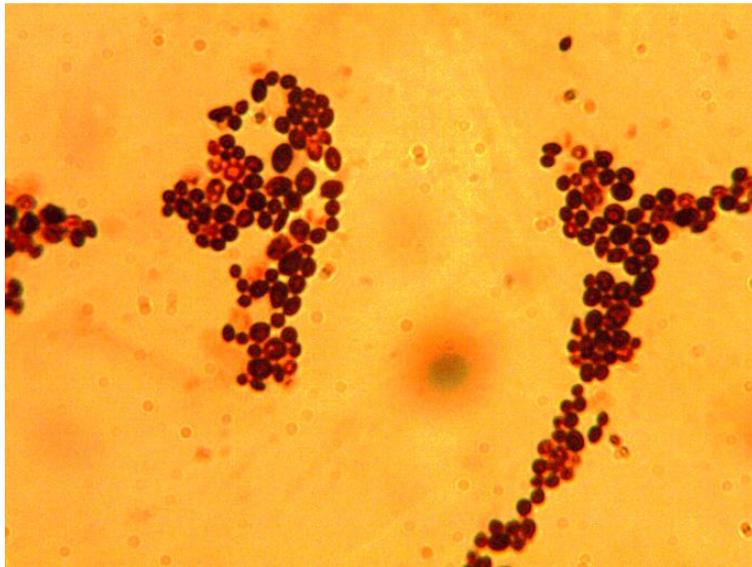
**Imagen 12. a)** Medio de cultivo Lactrimel tomada por Ricardo César Domínguez Cano **b)** Clamidiosporas de *Candida albicans* en agar Lactrimel a 100x, tomada por Ricardo César Domínguez Cano en el laboratorio 10 Unidad de posgrado FESC Campo 1

## **METODOLOGÍA:**

### **TINCIONES**

#### ***Tinción de Gram***

1. De una cepa pura de *Candida albicans* tomar un pequeño inóculo con un asa de pequeño calibre (0.05 ml) previamente esterilizada.
2. Realizar un frotis de la cepa.
3. Agregar cristal violeta a modo que cubra toda la muestra el colorante y esperar un minuto.
4. Enjuagar con agua no directamente sobre la muestra.
5. Agregar lugol y esperar 30 segundos.
6. Decantar el excedente de lugol sin enjuagar la muestra.
7. Agregar alcohol acetona y esperar 2 segundos.
8. Enjuagar con agua.
9. Agregar safranina 1 minuto.
10. Enjuagar levemente con agua.
11. Observar al microscopio con el objetivo de 100x poniendo previamente una gota de aceite de inmersión. **(Esaú, 2014)**



**Imagen 13.** *Candida albicans* levadura Gram (+) a 100x con tinción de Gram, tomada por Ricardo César Domínguez Cano en el laboratorio 10 Unidad de posgrado FESC Campo 1

**Prueba Tubo Germinativo:**

1. De una cepa pura de *Candida albicans* tomar un pequeño inóculo con un asa de pequeño calibre (0.05 ml) previamente esterilizada.
2. Resuspender la colonia aislada en 0.5 ml de suero fetal bovino.
3. Incubar a 37 °C durante 3 horas.
4. Depositar una gota sobre un portaobjetos limpio y posteriormente colocar un cubreobjetos.
5. Observar con el microscopio con el objetivo de 100x la formación de los tubos germinales. **(López, 2009)**



**Imagen 14.** Tubos Germinativos de *Candida albicans* en fresco a 100x, tomada por Ricardo César Domínguez Cano en el laboratorio 10 Unidad de posgrado FESC Campo 1

## MICOSIS PRODUCIDAS POR *CRYPTOCOCCUS*

### Introducción:

Es una micosis de curso subagudo o crónico, causada por levaduras patógenas oportunistas denominadas *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*; se caracteriza por afectar inicialmente pulmones, y después diseminarse a la piel y vísceras, con una clara predilección hacia el sistema nervioso central (SNC). **(Bonifaz, 2015)**

Es una enfermedad cosmopolita, hasta 1995 se habían descrito 300 casos en la literatura médica mundial. En EUA en el decenio de 1990-1999 se calculaban 200 a 400 casos de la forma cerebromeningea, y sólo en Nueva York, 15 000 infecciones subclínicas al año. Hoy día se calculan un millón de casos de meningitis y 625 000 defunciones. **(Bonifaz, 2015)**

Se presentaba en 6 a 13% y hasta 50% de los pacientes con SIDA; era la cuarta infección más importante en infectados por virus de la inmunodeficiencia humana (HIV); después de la etapa retroviral muy activa (HAART) ha disminuido a cifras de 0.2 a 0.9 casos por 100 000 habitantes. En África, junto con la tuberculosis, es la infección oportunista más importante especialmente en el SIDA, pero muchos casos se han informado mediante los registros nacionales en Francia y Atlanta. **(Arenas, 2014)**

No tiene predilección por sexo, quizá se observa ligero predominio en varones. Es más frecuente en personas de 30 a 60 años de edad y rara en niños. Afecta más a individuos debilitados por enfermedad de Hodgkin, leucemia, diabetes, sarcoidosis, colagenopatías, así como a los sujetos en tratamiento con antibióticos, glucocorticoides o inmunosupresores, o con trasplante de órgano, y fundamentalmente en aquellos con SIDA. La mortalidad es de 15 a 30%. Es más frecuente en personas expuestas a excremento de palomas o al aire acondicionado contaminado con este, por lo que puede adquirirse en el lugar de trabajo. **(Trombetta, 2005)**

Para la correcta identificación del hongo es necesario realizarse una serie de tinciones e inoculación en agares:

**-Tinción de Gram:** Es una tinción de carácter diferencial que sirve para distinguir a las bacterias Gram (+) de las Gram (-) a partir de su morfología celular. Se emplea para teñir productos biológicos líquidos, exudados de lesiones, improntas y macerados de biopsias. Todos los hongos son positivos a dicha coloración, excepto *Cryptococcus*, que por la presencia de cápsula no capta adecuadamente los colorantes. Esta tinción también es útil para teñir algunos Actinomicetales causantes de seudomicosis. **(López, 2012)**

La mayoría de estos microorganismos se aprecian de color lila con esta tinción por lo que son levaduras Gram positivo que presentan una gruesa capsula que también es teñida por dichos colorantes, pueden encontrarse en gemación o como levaduras individuales. **(Castañón, 2015)**

**-Tinción de Tinta China:** La tinción negativa de cápsulas es una tinción estructural, ya que pone de manifiesto las cápsulas sin teñir a los microorganismos. Tiñe el fondo de color negruzco y permite ver los microorganismos sin colorear sobre dicho fondo. De este modo genera el contraste suficiente como para permitir su visualización al microscopio.

Para esta tinción se pueden utilizar dos colorantes diferentes: nigrosina o tinta china, ambos desarrollando la misma función. La nigrosina es un colorante aniónico de color negro que es repelido por las cápsulas, lo que imposibilita su penetración dentro de los microorganismos. Permite la visualización de cápsulas bacterianas y fúngicas como el caso de *Cryptococcus*. **(Rodríguez, 2017)**

**-Agar Dextrosa Sabouraud (SDA):** Favorece el crecimiento de hongos en general ya que proporciona al medio peptona y glucosa como nutrientes, además de que posee un pH bajo que favorece su crecimiento, permitiendo identificar su morfología vegetativa para su clasificación. **(Koneman, 2008)**

**-Agar Niger:** Es un medio utilizado para aislar *Cryptococcus neoformans* por ser la única especie del género que al metabolizar la *Guizotia abyssinica* (negrilla), se obtienen colonias con pigmentos café-marrón, debido a que el hongo transforma el ácido cafeínico que contiene la semilla en un compuesto polimérico similar a la melanina por acción de la enzima fenol-oxidasa producida por la levadura. **(Tangarife, 2011)**

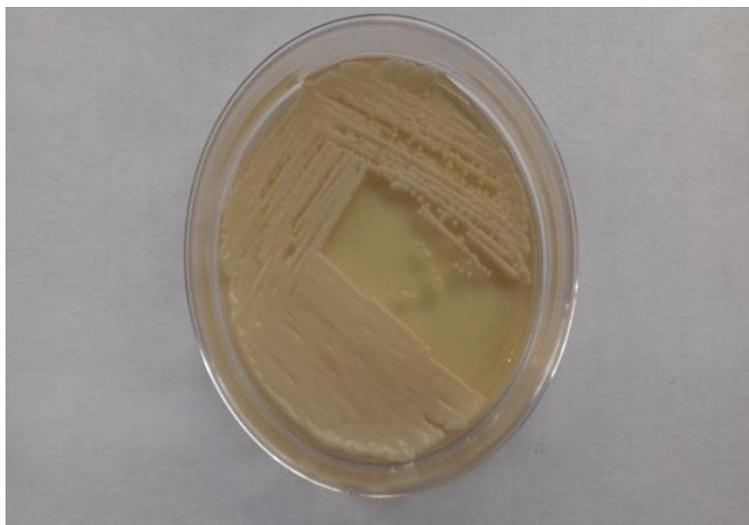
Este proceso llamado melanogénesis puede realizarse in vitro como una prueba adicional en la identificación de este hongo. La producción de melanina mediante la prueba de la L - DOPA - citrato férrico, es realizada por la enzima difenoloxidasa (laccasa) que por oxidación convierte las catecolaminas (difenoles) tales como la 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) en dopaquinona. Esto permite diferenciar a *Cryptococcus* spp. de otros géneros y especies. **(Canelo, 2000)**

**-Agar Dextrosa Urea:** Es un medio ligeramente regulado por un buffer que contiene urea y rojo de fenol, un indicador de pH; cuando los organismos utilizan urea, se forma amoníaco que convierte el medio alcalino. El indicador rojo fenol, cambia el color del medio de amarillo pálido a rojo-rosado generando un ambiente alcalino. La peptona de gelatina promueve el crecimiento rápido de bacilos gramnegativos entéricos, lo que permite una disminución en el tiempo de incubación, por su parte la dextrosa estimula la actividad de la ureasa en aquellos organismos que hidrolizan la urea lentamente; ayuda a diferenciar *Cryptococcus* de otras levaduras (como *C. albicans*, *kruseii*) debido a su rápida hidrólisis de urea (24 horas aproximadamente). **(Larone, 2002)**

## INÓCULO DE MEDIOS DE CULTIVO

### **Medio SDA (Ver Anexo 4.1):**

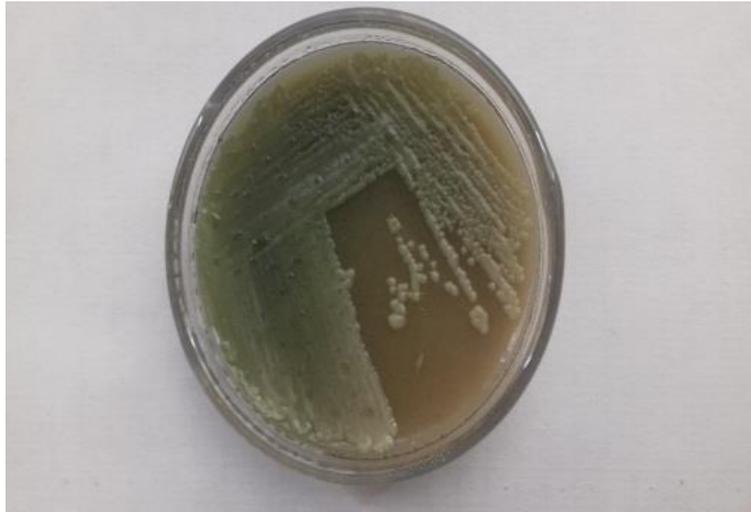
1. De una cepa pura de *Cryptococcus neoformans* tomar un pequeño inóculo con un asa de pequeño calibre (0.05 ml) previamente esterilizada.
2. Sembrar por técnica americana.
3. Incubar por 48 hrs. a 37°C.
4. Pasado el tiempo de incubación observar el tipo de crecimiento colonial desarrollado en el medio de cultivo. **(Rodríguez, 2005)**



**Imagen 15.** Crecimiento de *Cryptococcus neoformans* en agar SDA, se observan colonias cremosas, blanquecinas. Tomada por Ricardo César Domínguez Cano en el laboratorio 10 Unidad de posgrado FESC Campo 1

**Medio Niger (Ver Anexo 4.9):**

1. De una cepa pura de *Cryptococcus neoformans* tomar un pequeño inóculo con un asa de pequeño calibre (0.05 ml) previamente esterilizada.
2. Sembrar por técnica americana.
3. Incubar por 48 hrs. a 37°C.
4. Pasado el tiempo de incubación observar el tipo de crecimiento colonial y la coloración que desarrollo en el medio de cultivo. **(Valdés, 2003)**



**Imagen 16.** Crecimiento de *Cryptococcus neoformans* en agar Niger (48 hrs.), se observan colonias cremosas, marrones. Tomada por Ricardo César Domínguez Cano en el laboratorio 10 Unidad de posgrado FESC Campo 1

**Medio Dextrosa Urea (Ver Anexo 4.10):**

1. De una cepa pura de *Cryptococcus neoformans* tomar un pequeño inóculo con un asa de pequeño calibre (0.05 ml) previamente esterilizada.
2. Sembrar por estriado a lo largo del tubo de ensayo.
3. Incubar por 48 hrs. a 37°C.
4. Pasado el tiempo de incubación observar el tipo de crecimiento colonial y la coloración que desarrollo en el medio de cultivo. **(Merck, 2017)**



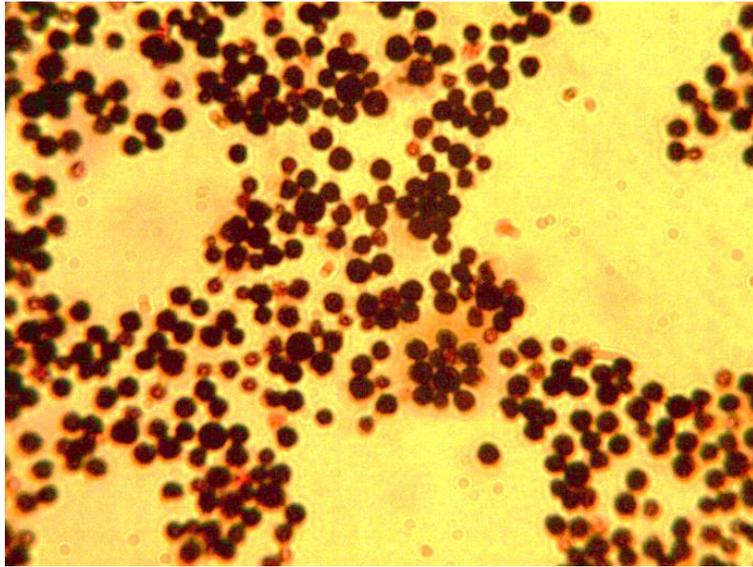
**Imagen 17.** Crecimiento de *Cryptococcus neoformans* en agar Dextrosa Urea, se observa cambio en la coloración de naranja a rosa mexicano por la hidrólisis de urea. Tomada por Ricardo César Domínguez Cano en el laboratorio 10 Unidad de posgrado FESC Campo 1

## METODOLOGÍA:

### TINCIONES

#### *Tinción de Gram:*

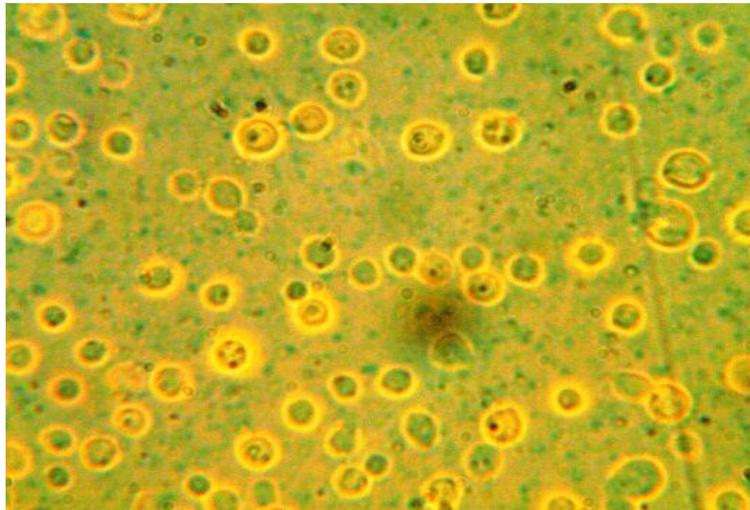
1. De una cepa pura de *Cryptococcus neoformans* tomar un pequeño inóculo con un asa de pequeño calibre (0.05 ml) previamente esterilizada.
2. Realizar un frotis de la cepa.
3. Agregar cristal violeta a modo que cubra toda la muestra el colorante y esperar un minuto.
4. Enjuagar con agua no directamente sobre la muestra.
5. Agregar lugol y esperar 30 segundos.
6. Decantar el excedente de lugol sin enjuagar la muestra.
7. Agregar alcohol acetona y esperar 2 segundos.
8. Enjuagar con agua.
9. Agregar safranina 1 minuto.
10. Enjuagar levemente con agua.
11. Observar al microscopio con el objetivo de 100x poniendo previamente una gota de aceite de inmersión. **(Esaú, 2014)**



**Imagen 18.** *Cryptococcus neoformans* levadura Gram (+) a 100x con tinción de Gram, tomada por Ricardo César Domínguez Cano en el laboratorio 10 Unidad de posgrado FESC Campo 1

**Tinción de Cápsula (Tinta China):**

1. De una cepa pura de *Cryptococcus neoformans* tomar un pequeño inóculo con un asa de pequeño calibre (0.05 ml) previamente esterilizada.
  2. Añadir al portaobjetos una gota de tinta china.
  3. Mezclar con el asa estéril.
  4. Colocar un cubreobjetos.
  5. Observar la preparación en el microscopio óptico con el objetivo de 40x.
- (Rodríguez, 2017)**



**Imagen 19.** Cápsulas de *Cryptococcus neoformans* a 100x con tinción de tinta china, tomada por Ricardo César Domínguez Cano en el laboratorio 10 Unidad de posgrado FESC Campo 1

## MICOSIS PRODUCIDAS POR *ASPERGILLUS*

### Introducción:

La aspergilosis es una micosis de animales y humanos causadas por hongos oportunistas del género *Aspergillus*, en especial *A. fumigatus*, *A. niger*, y *A. flavus*, que causan 95% de las infecciones. Pueden provocar enfermedad pulmonar alérgica o invasiva, aspergiloma, diseminarse al SNC u otros órganos o localizarse produciendo otomicosis, onicomiosis, queratitis y micetoma. En personas inmunodeficientes es sistémica y mortal. **(Arenas, 2014)**

La aspergilosis es una enfermedad cosmopolita y rara. Afecta a cualquier grupo de edad o étnico, y a ambos sexos; predomina en varones adultos; 12% de los aspergilomas se ha visto en pacientes tuberculosos curados, pacientes con bronquiectasias y personas con cavitaciones por histoplasmosis. Las presentaciones alérgicas parecen más frecuentes en campesinos y en quienes trabajan con granos, como los empleados de silos y molinos. **(Arenas, 2014)**

Los factores predisponentes son neutropenia; desnutrición, antecedentes de absceso hepático amebiano, alcoholismo crónico, carcinomas pulmonares; uso de antibióticos de amplio espectro, citotóxicos, glucocorticoides; incremento en los niveles de hierro sérico. **(Carrasco, 2004)**

La presentación alérgica y la mayor parte de los casos por invasión o sin ella, dependen de *A. fumigatus* (56 a 90%) los aspergilomas principalmente son causados por *A.niger*, *A. flavus* y *A. fumigatus*. *Aspergillus* tiene distribución en climas con estaciones secas y húmedas alternadas. El aspergiloma predomina en Francia, Inglaterra y otros países nórdicos; es poco frecuente en América y zonas tropicales. La forma paranasal se ha observado sobre todo en Sudán y en las regiones calientes y húmedas del sudeste de EUA, donde constituye una enfermedad ocupacional. En México, la incidencia es del 5% en pacientes con neumopatías. **(Bonifaz, 2015)**

Para la correcta identificación del hongo es necesario realizarse una serie de tinciones e inoculación en agares:

**-Tinción Azul de Algodón:** Es útil para realizar el examen directo de cultivos, ya que es una técnica rápida que tiñe la pared, lo que permite visualizar perfectamente las estructuras fúngicas. Es una tinción simple (un sólo colorante) y como tal está basada en la afinidad del colorante por componentes de las células, en este caso por las estructuras fúngicas.

El azul de lactofenol tiene tres características que lo hacen especial para observar dichas estructuras en los hongos obtenidos en los cultivos por aislamiento:

- 1) El fenol destruye la flora acompañante.
- 2) El ácido láctico conserva las estructuras fúngicas al crear una película que las protege provocando por un cambio de gradiente osmótico entre el interior y el exterior de dicha estructura.
- 3) El azul de algodón tiene la capacidad de adherirse a las hifas y conidios de los hongos microscópicos **(López, 2012)**

**-Agar Dextrosa Sabouraud (SDA):** Favorece el crecimiento de hongos en general ya que proporciona al medio peptona y glucosa como nutrientes, además de que posee un pH bajo que favorece su crecimiento, permitiendo identificar su morfología vegetativa para su clasificación. **(Salas, 2011)**

**-Medio de Arroz:** Se considera una forma “alternativa” para el aislamiento y propagación masiva de hongos filamentosos, ya que provee de una temperatura idónea de crecimiento, humedad constante que libera el arroz al estar cocido y nutrientes que absorbe de la semilla para el crecimiento y desarrollo de su forma aérea micelial. **(Salas, 2011)**

**-Medio de Extracto de Malta:** Es particularmente adecuado para levaduras y hongos ya que contienen una alta concentración de maltosa y otros sacáridos

como fuentes de energía. Dextrina y Glicerina son la fuente de carbono, y la Peptona es una fuente de nitrógeno. El pH ácido es óptimo para el crecimiento de levaduras y hongos mientras restringe el crecimiento bacteriano. **(Probiotek, 2017)**

Es un medio que se conserva estable por varias semanas debido a su composición y es útil para el aislamiento y caracterización morfológica de la mayoría de hongos filamentosos, particularmente de *Aspergillus fumigatus*. **(López, 2012)**

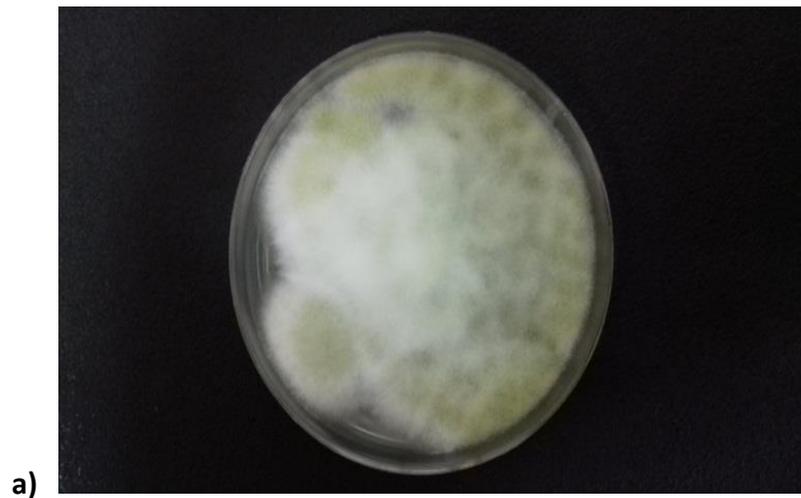
**-Medio Czapek-Dox:** El medio contiene sacarosa como única fuente de energía y nitrato como única fuente inorgánica de nitrógeno. Este agar produce un crecimiento exuberante de la mayoría de cepas de *Aspergillus* causando que los organismos produzcan micelios y conidios característicos. **(Hardy Diagnostics, 2017)**

**-Microcultivo:** Permite el desarrollo de las estructuras microscópicas de los hongos filamentosos, en particular las esporas asexuales (conidias y fiálides), sin alteración de las mismas. Proporciona humedad, nutrientes y temperatura para el crecimiento óptimo del hongo permitiéndonos diferenciarlo con otras especies a partir de sus estructuras de reproducción. **(Prats, 2005)**

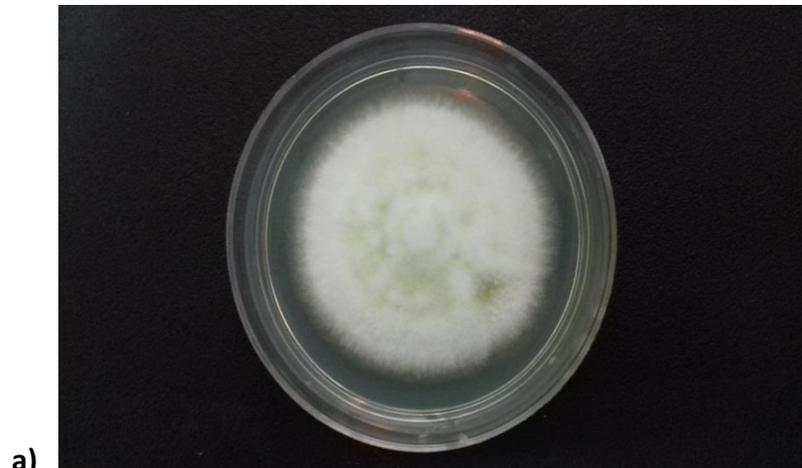
## **INÓCULO DE MEDIOS DE CULTIVO**

***Medio SDA (Ver Anexo 4.1):***

1. De una cepa pura de *Aspergillus* tomar un pequeño inóculo con un asa de pequeño calibre (0.05 ml) previamente esterilizada.
2. Sembrar por dos puntos aislados.
3. Incubar por 7 días a 25°C.
4. Pasado el tiempo de incubación observar el crecimiento colonial.  
**(Rodríguez, 2005)**



**Imagen 20. *Aspergillus fumigatus*** **a)** Crecimiento de micelio aéreo, se observan colonias algodonosas, verde-blanquecinas **(b)** Crecimiento de micelio vegetativo en medio SDA por 7 días/25°C, se observan colonias marrones, rugosas. Tomada por Ricardo César Domínguez Cano en el laboratorio 10 Unidad de posgrado FESC Campo 1.



**Imagen 21. *Aspergillus flavus*** **a)** Crecimiento de micelio aéreo, se observan colonias algodonosas blanquecinas **(b)** Crecimiento de micelio vegetativo en medio SDA por 7 días/25°C, se observan colonias marrones, rugosas. Tomada por Ricardo César Domínguez Cano en el laboratorio 10 Unidad de posgrado FESC Campo 1



**Imagen 22. *Aspergillus niger*** **a)** Crecimiento de micelio aéreo, se observan colonias polvosas, negras **(b)** Micelio vegetativo en medio SDA por 7 días/25°C, se observan colonias negras, rugosas. Tomada por Ricardo César Domínguez Cano en el laboratorio 10 Unidad de posgrado FESC Campo 1

**Medio Extracto de Malta (Ver Anexo 4.12):**

1. De una cepa pura de *Aspergillus* tomar un pequeño inóculo con un asa de pequeño calibre (0.05 ml) previamente esterilizada.
2. Sembrar por dos puntos aislados.
3. Incubar por 7 días a 25°C.
4. Pasado el tiempo de incubación observar el crecimiento colonial.  
**(Stainer, 1996)**



**Imagen 23.** Crecimiento de micelio aéreo de *Aspergillus fumigatus* en medio de Extracto de Malta por 7 días/25°C, se observan colonias algodonosas, verde-blanquecinas. Tomada por Ricardo César Domínguez Cano en el laboratorio 10 Unidad de posgrado FESC Campo 1



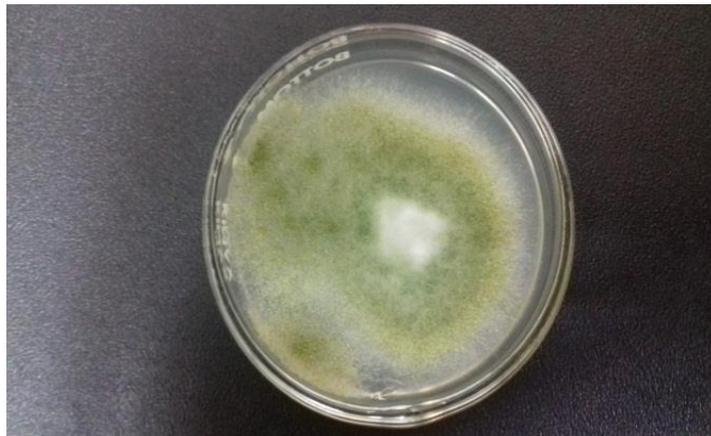
**Imagen 24.** Crecimiento de micelio aéreo de *Aspergillus flavus* en medio de Extracto de Malta por 7 días/25°C, se observan colonias algodonosas, blanquecinas. Tomada por Ricardo César Domínguez Cano en el laboratorio 10 Unidad de posgrado FESC Campo 1



**Imagen 25.** Crecimiento de micelio aéreo de *Aspergillus niger* en medio de Extracto de Malta por 7 días/25°C, se observan colonias polvosas, negras. Tomada por Ricardo César Domínguez Cano en el laboratorio 10 Unidad de posgrado FESC Campo 1

**Medio Czapek-Dox (Ver Anexo 4.11):**

1. De una cepa pura de *Aspergillus* tomar un pequeño inóculo con un asa de pequeño calibre (0.05 ml) previamente esterilizada.
2. Sembrar por dos puntos aislados.
3. Incubar por 7 días a 25°C
4. Pasado el tiempo de incubación observar el crecimiento colonial.  
**(Stainer, 1996)**



**Imagen 26.** Crecimiento de micelio aéreo de *Aspergillus fumigatus* en medio Czapek-Dox por 7 días/25°C, se observan colonias algodonosas verdes. Tomada por Ricardo César Domínguez Cano en el laboratorio 10 Unidad de posgrado FESC Campo 1



**Imagen 27.** Crecimiento de micelio aéreo de *Aspergillus flavus* en medio Czapek-Dox por 7 días/25°C, se observan colonias algodonosas blanquecinas. Tomada por Ricardo César Domínguez Cano en el laboratorio 10 Unidad de posgrado FESC Campo 1



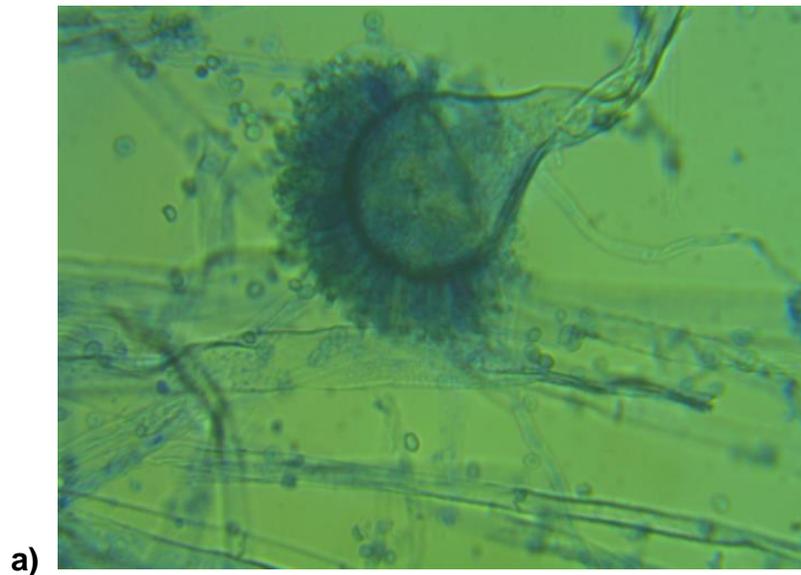
**Imagen 28.** Crecimiento de micelio aéreo de *Aspergillus niger* en medio Czapek-Dox por 7 días/25°C, se observan colonias polvosas negras. Tomada por Ricardo César Domínguez Cano en el laboratorio 10 Unidad de posgrado FESC Campo 1

## **METODOLOGÍA:**

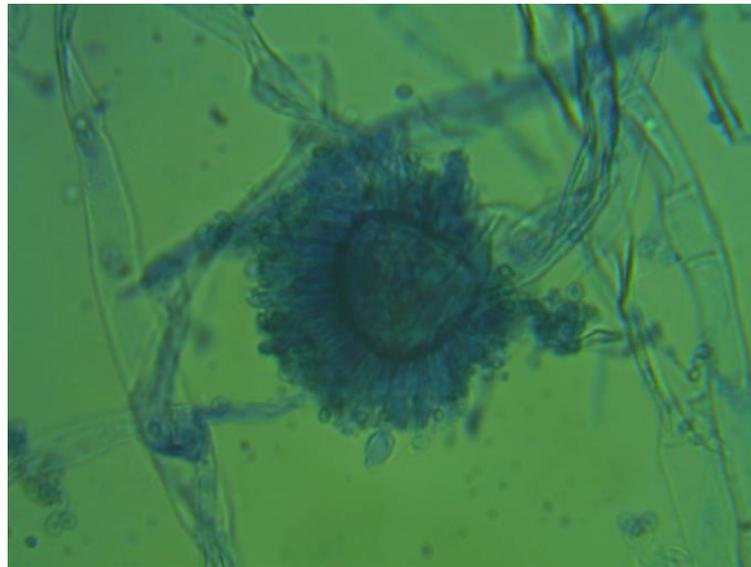
### **TINCIONES**

#### ***Tinción Azul de Algodón:***

1. De una cepa pura de *Aspergillus (fumigatus, flavus y niger)* tomar un pequeño inóculo de la superficie de la colonia con un trozo de cinta adhesiva transparente.
2. Depositar una gota de colorante sobre un portaobjetos limpio.
3. Colocar la cinta adhesiva sobre la gota de colorante y fijarla al portaobjeto.
4. Colocar una gota de colorante encima de la cinta adhesiva.
5. Colocar un cubreobjetos.
6. Observar con objetivo 40x. **(López, 2012)**

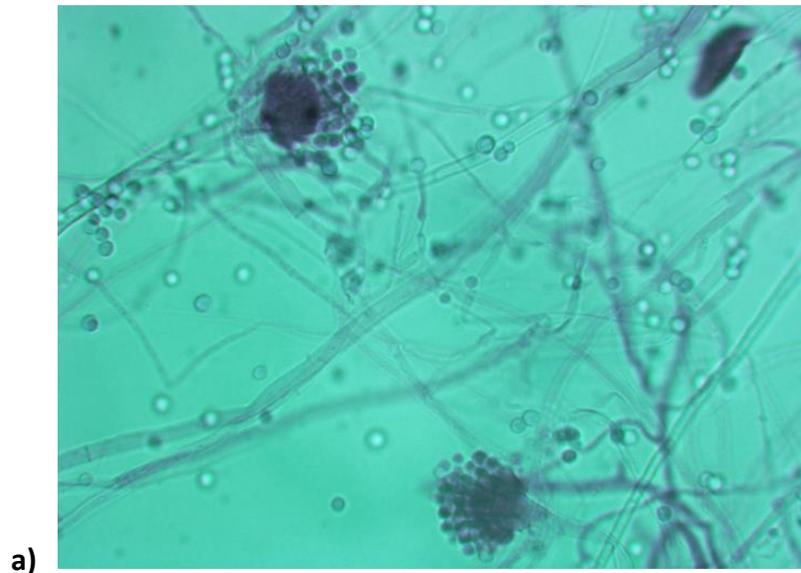


a)

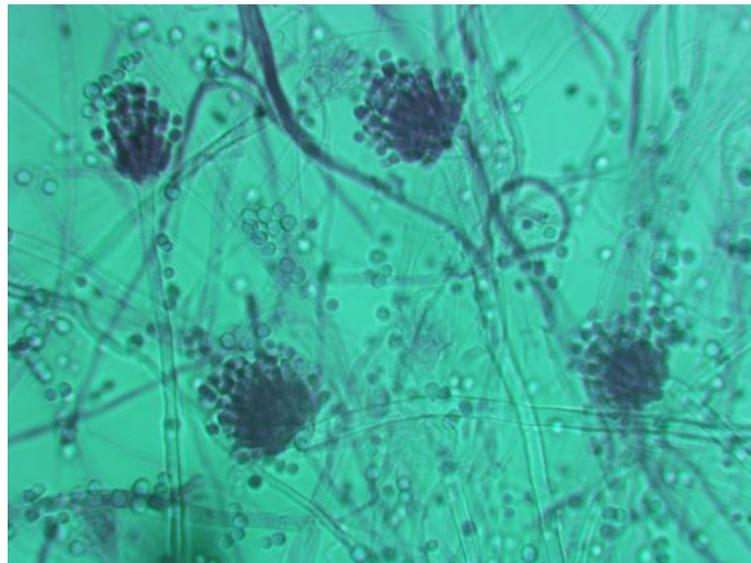


b)

**Imagen 29. a y b)** *Aspergillus fumigatus* a 40x con tinción de Azul de Algodón del medio SDA por técnica de diurex, tomada por Ricardo César Domínguez Cano en el laboratorio 10 Unidad de posgrado FESC Campo 1



a)



b)

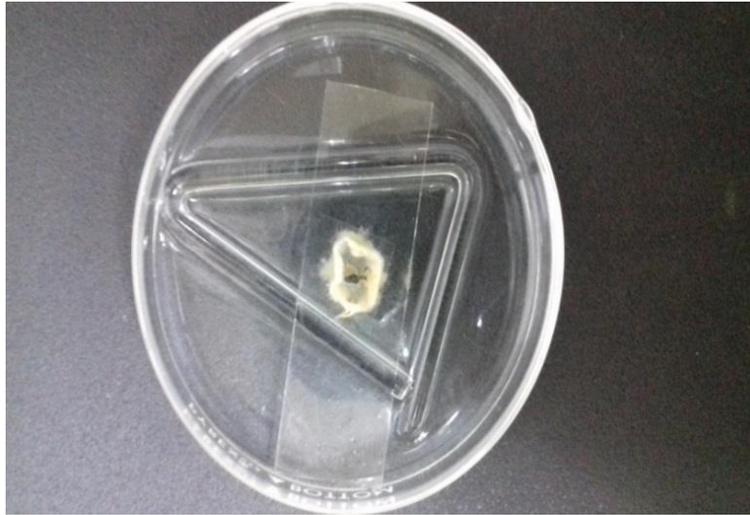
**Imagen 30. a y b)** *Aspergillus flavus* a 40x con tinción de Azul de Algodón del medio SDA por técnica de diurex, tomada por Ricardo César Domínguez Cano en el laboratorio 10 Unidad de posgrado FESC Campo 1



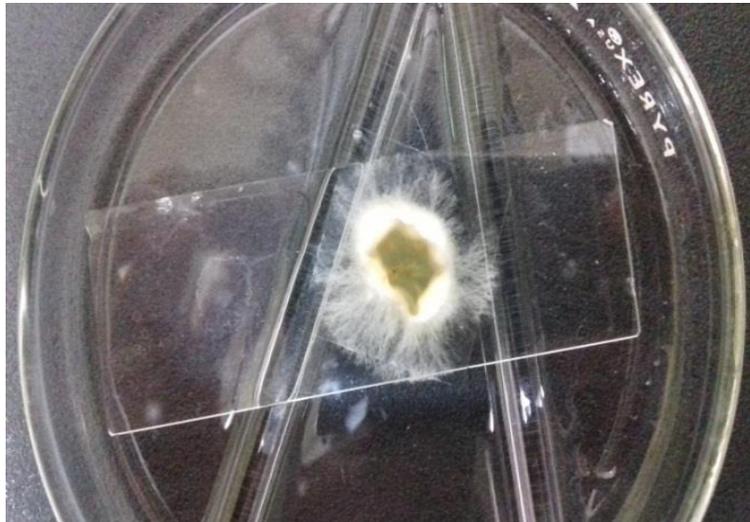
**Imagen 31.** *Aspergillus niger* a 40x con tinción de Azul de Algodón del medio SDA por técnica de diurex, tomada por Ricardo César Domínguez Cano en el laboratorio 10 Unidad de posgrado FESC Campo 1

**Microcultivo:**

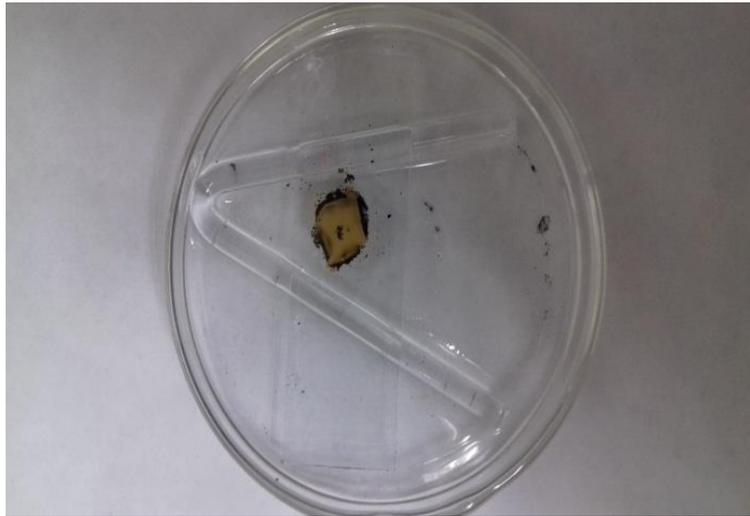
1. Colocar sobre una caja de Petri de vidrio una varilla de vidrio doblada en forma de "V" y sobre la varilla colocar un portaobjetos y depositar en la misma caja un cubreobjetos, posteriormente envolver con papel.
2. Esterilizar el material durante 15 minutos a 15 libras de presión.
3. Tomar una caja Petri con medio SDA grueso y cortar en cuadros de 10 mm por lado con un bisturí estéril.
4. Colocar un cuadro del medio en el centro del portaobjetos de la caja Petri.
5. De una cepa pura de *Aspergillus* tomar un pequeño inóculo con un asa en "L" previamente esterilizada e inocularlo en cada uno de los lados del fragmento de medio de cultivo.
6. Colocar el cubreobjetos sobre el medio inoculado.
7. Adicionar a la caja aproximadamente 10 ml de agua glicerizada al 10%, teniendo cuidado de no mojar el portaobjetos.
8. Incubar durante 7 días a 25°C.
9. Retirar el cubreobjetos y colocarlo sobre un portaobjetos limpio en el que previamente se ha depositado una gota de azul de algodón.
10. Observar al microscopio con el objetivo de 40x las estructuras fúngicas desarrolladas. **(López, 2012)**



**Imagen 32.** *Aspergillus fumigatus* desarrollado en Microcultivo por 7 días/25°C, tomada por Ricardo César Domínguez Cano en el laboratorio 10 Unidad de posgrado FESC Campo 1



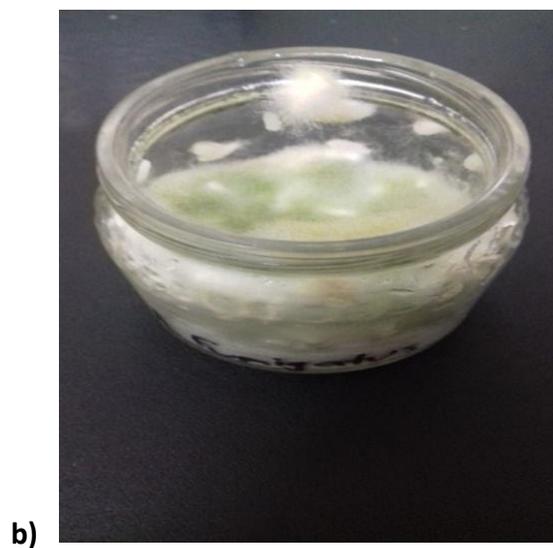
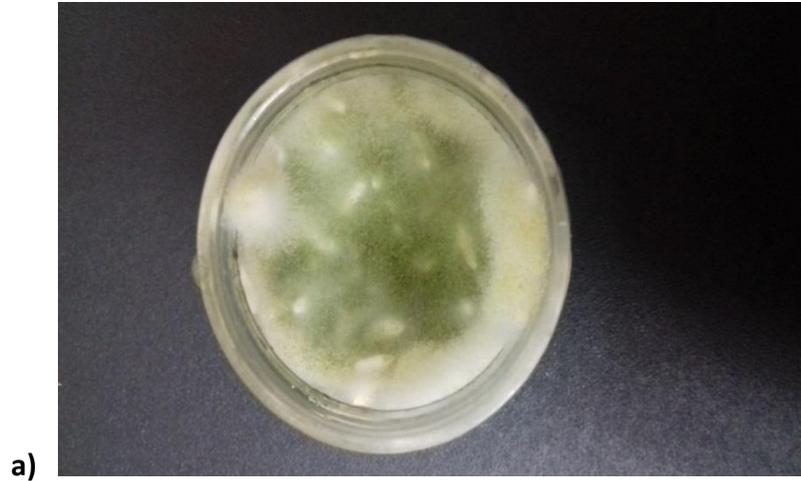
**Imagen 33.** *Aspergillus flavus* desarrollado en Microcultivo por 7 días/25°C, tomada por Ricardo César Domínguez Cano en el laboratorio 10 Unidad de posgrado FESC Campo 1



**Imagen 34.** *Aspergillus niger* desarrollado en Microcultivo por 7 días/25°C, tomada por Ricardo César Domínguez Cano en el laboratorio 10 Unidad de posgrado FESC Campo 1

**Medio de Arroz (Ver Anexo 4.13):**

1. De una cepa pura de *Aspergillus* tomar un pequeño inóculo con un asa en forma de “L” previamente esterilizada.
2. Inocular por picadura en 3 puntos de la superficie del medio.
3. Incubar durante 7 días a temperatura ambiente.
4. Pasado el tiempo de incubación observar el tipo de crecimiento colonial y la coloración que desarrollo en el medio de cultivo. **(Salas, 2011)**



**Imagen 35. a y b)** Micelio aéreo de *Aspergillus fumigatus* desarrollado en Medio de Arroz, tomada por Ricardo César Domínguez Cano en el laboratorio 10 Unidad de posgrado FESC Campo 1



**Imagen 36. a y b)** Micelio aéreo de *Aspergillus flavus* desarrollado en Medio de Arroz, tomada por Ricardo César Domínguez Cano en el laboratorio 10 Unidad de posgrado FESC Campo 1



a)



b)

**Imagen 37. a y b)** *Micelio aéreo de Aspergillus niger desarrollado en Medio de Arroz, tomada por Ricardo César Domínguez Cano en el laboratorio 10 Unidad de posgrado FESC Campo 1*

# **ANEXOS**

**ANEXO 1: TABLA DE IDENTIFICACIÓN DE COLOR PARA ESPECIES DE CANDIDA EN CHROMAGAR**

<b>Cepa</b>	<b>Color</b>	<b>Características morfológicas</b>
<i>Candida albicans</i>	Verde	Colonias lisas
<i>Candida glabrata</i>	Rosa-rojizo-púrpura	Colonias lisas
<i>Candida krusei</i>	Rosa pálido	Colonias grandes, planas y rugosas con amplios bordes blancos
<i>Candida parapsilosis</i>	Blanco-marfil	Colonias lisas
<i>Candida tropicalis</i>	Azul-violáceo	Colonias lisas con halo púrpura-marrón

(Lee, 2015)

## ***ANEXO 2: TÉCNICA DE DALMAU:***

1. Tomar con un asa previamente esterilizada una pequeña colonia de la cepa a analizar.
2. Realizar tres estrías paralelas con el asa en el agar dejando aproximadamente 1 cm de separación entre ellos.
3. Esterilizar un cubreobjetos y una vez frío colocarlo sobre el inóculo.
4. Pasado el tiempo de incubación retirar el cubreobjetos y observarlo al microscopio con el objetivo de 100x. **(Lazarde, 2000)**

### ANEXO 3: TABLA DE IDENTIFICACIÓN DE CANDIDA

			Auxograma																			
Morfología			Indispensable							Efectivo				Zimograma				Otras características				
Micelio o pseudomicelio	Clamidosporas	Filamentación en suero a 37°C	Glucosa	Maltosa	Sacarosa	Galactosa	Lactosa	Rafinosa	Inositol	Celobiosa	Xilosa	Trehalosa	Glucosa	Maltosa	Sacarosa	Galactosa	Lactosa	Rafinosa	Ureasa	Reducción tetrazolio	Resistente a Actidione	Utilización de KNO3
<i>Candida albicans</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+/-	+	-	-	-	B	+	-
<i>C. stellatoidea</i>	+	+/-	+/-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	R	+	-
<i>C. tropicalis</i>	+	-	-	+	+	+	+	-	-	v	+	+	+	+	+	+	-	-	-	Vi	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	R	-	-
<i>C. krusei</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	B	-	-
<i>C. pseudotropicalis</i>	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	v	-	+	-	+	+	+	+	-	R	+	-
<i>C. guilliermondii</i>	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	R	+	-
<i>C. zeylanoides</i>	+	-	-	+	+	+	v	-	-	-	-	+	v	-	-	-	-	-	-	R	-	-

(Arenas, 2014)

## **ANEXO 4: PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO**

### **4.1 Medio SDA (BD Bioxon):**

Rehidratar 65 g del medio en un litro de agua destilada. Reposar 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 lbs de presión) durante 15 minutos. Enfriar aproximadamente a 45°C. Vaciar en cajas de Petri estériles. Cuando se requiera el medio en tubo de ensayo, distribuir el volumen requerido antes de esterilizar y posteriormente enfriar en posición inclinada. Conservar en refrigeración de 2 a 8°C. **(Arenas, 2014)**

### **4.2 Medio BHI (BD Bioxon):**

Disolver 47 gramos de medio en 1 litro de agua destilada. Calentar hasta ebullición agitando, para su total homogeneización. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 lbs de presión) durante 15 minutos. Vaciar en cajas Petri estériles. No sobrecalentar, para evitar el oscurecimiento y caramelización del medio. **(Negroni, 2008)**

### **4.3 Medio AS (BD Bioxon):**

Disolver 40 gramos de polvo en un litro de agua destilada. Calentar hasta disolver el polvo hasta obtener una solución homogénea, aplicar el calor lentamente en constante agitación y no permitir la ebullición, de esta forma aseguramos que los nutrientes no se desnaturalicen. Esterilizar a 121 °C (15 lbs de presión) durante 15 minutos. Posteriormente medir pH del medio que se debe registrar a 7.3 +/- 0.2

Enfriar hasta 50° C, agregar la sangre y homogeneizar. Vaciar en placas Petri estériles. **(Bonifaz, 2015)**

#### **4.4 Medio Caseína:**

Suspender 40 gramos del medio en un litro de agua destilada. Mezclar y calentar con frecuente agitación. Ebullición por 1 minuto o hasta que el medio se disuelva completamente. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos. Enfriar a 45-50°C y servir en cajas Petri estériles. **(Arenas, 2014)**

#### **4.5 Medio Tirosina:**

Disolver 23 g de agar bacteriológico en un litro de agua destilada. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 lbs de presión) durante 15 minutos. Agregar por filtración en condiciones de esterilidad 6 gramos por cada litro de agua de cristales de tirosina, agitar y servir en cajas Petri estériles para evitar la precipitación de la tirosina. **(Negroni, 2008)**

#### **4.6 Medio Lactrimel (HALEMi) Modificado:**

Disolver 40 mililitros de miel de abeja, 10 gramos de harina de arroz y 200 mililitros de leche por cada litro de agua destilada calentando hasta ebullición. Distribuir en tubos de ensayo y esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Dejar enfriar **(Bonifaz, 2015)**

#### **4.7 Medio Biggy (BD Bioxon):**

Suspender 45 gramos del medio en un litro de agua destilada. Mezclar bien y calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante 1 minuto. No esterilizar en autoclave. Dejar enfriar a una temperatura de entre 45-50°C y vaciar en placas Petri estériles. **(Arenas, 2014)**

#### **4.8 Medio Corn Meal (Harina de Maíz):**

Calentar 40 gramos de harina de maíz con agua destilada durante 1 hora. Filtrar y completar a un litro con agua destilada. Agregar 20 gramos de agar a la solución, mezclar perfectamente y hervir durante 1 minuto. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos y vaciar en placas Petri estériles. **(Uberos, 1981)**

#### **4.9 Medio Niger**

Para obtener el extracto de semilla de Niger se procede a lo siguiente:

- Pulverizar las semillas.
- 75 gramos del pulverizado se adicionan a 350 ml de H<sub>2</sub>O destilada.
- Esterilizar en autoclave a 110°C, 10 lb por 10 minutos.
- Filtrar a través de una gasa estéril.

Se procede a completar 1 litro de agua después de haber obtenido el extracto y agregar 1 gramo de glucosa y 20 gramos de agar. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121°C y vaciar en placas Petri estériles. **(Arenas, 2014)**

#### **4.10 Medio Dextrosa Urea (BD Bioxon):**

Disolver 1 gramo de peptona bacteriológica, 0.8 gramos de fosfato de potasio dihidrógeno, 0.012 gramos de rojo de fenol, 1 gramo de dextrosa, 1.2 gramos de fosfato disodio de hidrógeno, 5 gramos de cloruro de sodio y 14 gramos de agar por cada litro de agua. Esterilizar a 110°C durante 10 minutos. Agregar 40 gramos por litro de urea por filtración. Mezclar bien y servir en tubos de ensaye estériles colocándolos en posición inclinada.

NOTA: NO RECALENTAR DESPUÉS DE AGREGAR LA UREA. **(López, 2009)**

#### **4.11 Medio Czapek-Dox (BD Bioxon):**

Disolver 46 g del polvo en un litro de agua destilada. Calentar y agitar hasta su completa disolución. Esterilizar a 115 °C durante 20 minutos. Mezclar bien antes de verter en las placas Petri estériles. **(Bonifaz, 2015)**

#### **4.12 Medio Extracto de Malta (DIBICO):**

Disolver 48 g de polvo en un litro de agua destilada. Calentar agitando hasta ebullición. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Servir en cajas Petri estériles. **(Uberos, 1981)**

#### **4.13 Medio de Arroz**

Servir una cucharada de arroz crudo en un frasco pequeño y cubrirlo con agua destilada. Esterilizar a 110°C durante 15 minutos. Cerrar bien el frasco y verificar que se haya cocido bien el arroz. **(Negroni, 2008)**

**ANEXO 5: COLORACIÓN DE DIFERENTES ESPECIES DE CANDIDA EN AGAR BIGGY (BD Bioxon)**

<b>Especie de <i>Candida</i></b>	<b>Coloración</b>
<i>C. albicans</i>	Colonias color café oscuro o negro
<i>C. parapsilosis</i>	Colonias café-rojizas con crecimiento amarillo
<i>C. krusei</i>	Colonias color negro con brillo metálico, borde café y halo amarillo
<i>C. tropicalis</i>	Colonias ligeramente oscuras con centro negro y brillante

**(Prats, 2005)**

## Referencias:

- Arenas Guzmán, R. (2014). *Micología médica ilustrada*. México, D.F.: McGraw-Hill Education.
- Becton Dickinson. (2007). *Procedimientos de Control de Calidad*. Octubre 18, 2017, de BD Sitio web: [http://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/L007521%2808%29%280907%29\\_ES.pdf](http://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/L007521%2808%29%280907%29_ES.pdf)
- Becton Dickinson. (2013). *Instrucciones de Uso-Medios en placa listos para usar*. Septiembre 30, 2017, de BD Sitio web: <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8800>
- Bonifaz Trujillo, J. A. (2015). *Micología médica básica*. México, D.F.: McGraw-Hill.
- Britania Lab. (2013). *Ziehl Neelsen Equipo*. Septiembre 29, 2017, de Britania Lab Sitio web: [http://www.britanialab.com/productos/183\\_inserto\\_es.pdf](http://www.britanialab.com/productos/183_inserto_es.pdf)
- Britania Lab. (2015). *Sangre Agar Base*. Octubre 05, 2017, de Britania Lab Sitio web: <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/sangreagarbase.htm>
- Canelo, C., Casquero J., (2000). *Fenoloxidasa modificada: Clave para identificar cepas de Cryptococcus neoformans*. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública, 17, 32 págs., 2018, julio 28, De SISBIB Base de datos.

- Carrasco E., (2004). *Aspergilosis broncopulmonar alérgica. Complicaciones poco usuales de la afección*. Agosto 10, 2017 de SciELO Sitio web: <http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S071773482004000100005&script=sciarttext&tlng=en>
- Castañón, L. (2015). *Criptococosis*. Octubre 17, 2017, de UNAM Sitio web: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/criptococosis.html>
- Castañón, L. (2016). *Candidiasis o Candidiosis*. Octubre 10, 2017, de UNAM Sitio web: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/candidosis.html>
- Cuenca-Estrella M (2002). *Infecciones profundas por otros hongos patógenos humanos*, 8ª ed, vol. 68. Ediciones Doyma S.L., Barcelona.
- Esaú, L., Hernández, M., Colín, A., & Cerón, G., (2014) *Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología*. Octubre 07, 2017, de Investigación en Discapacidad Sitio web: <http://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2014/ir141b.pdf>
- Guevara M., Navarro A., Aranzamendi E., Quispe N., & Chávez V., (2003). *Micetoma por Nocardia brasiliensis: reporte de caso*. Agosto 10, 2017 de SciELO Sitio web: <http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sciarttext&pid=S172646342003000300009>

- Hardy Diagnostics. (2017). *Czapek-Dox Agar*. Octubre 26, 2017, de Hardy Diagnostics Sitio web: [https://catalog.hardydiagnostics.com/cp\\_prod/Content/hugo/Czapek-DoxAgar.html](https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/Content/hugo/Czapek-DoxAgar.html)
- Hardy Diagnostics (2016). *Instructions for use Casein Agar*. Octubre 06, 2017, de Hardy Diagnostics Sitio web: [https://catalog.hardydiagnostics.com/cp\\_prod/Content/hugo/CaseinAgar.html](https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/Content/hugo/CaseinAgar.html)
- Koneman E. W., Allen S. (2008). *Diagnóstico Microbiológico: Texto y Atlas en Color*. Argentina: Médica Panamericana.
- Larone, DH (2002). *Hongos médicamente importantes, una guía para la identificación*. 4 th ed. ASM Press, Washington, DC
- Lazarde, L. & Pacheco, A. (2000). *Identificación de especies de Candida en un grupo de pacientes con Candidiasis Atrófica Crónica*. Octubre 11, 2017, de Acta Odontológica Venelozana Sitio web: [https://www.actaodontologica.com/ediciones/2001/1/identificacion\\_especies\\_candida.asp](https://www.actaodontologica.com/ediciones/2001/1/identificacion_especies_candida.asp)
- Lee, X., Cajas, N., Gómez, L.& Astorga, E. (2015). *Ocurrencia de levaduras del género Candida y estomatitis protésica antes y después del tratamiento rehabilitador basado en prótesis removible*. Octubre 17, 2017, de SciELO Sitio web: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0719-01072015000100005](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0719-01072015000100005)
- Linares, M. & Solís, F. (2005). *Identificación de levaduras*. Octubre 10, 2017, de Pfizer Sitio web: <http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo11.pdf>

- López C., Giro L., Ramos L., Ramadán S. & Bulacio L. (2005). *Comparación de diferentes métodos para la identificación de especies del género Cándida*. Agosto 10, 2017 de SciELO Sitio web: [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S03255412005000100003&script=sci\\_arttext&tlng=pt](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S03255412005000100003&script=sci_arttext&tlng=pt)
- López, R., Javier, L., Hernández, F., & Rosio, L. (2012). *Micología Médica*. México: Trillas.
- Martínez R., Méndez L. J., Manzano P., & Hernández F. (2009). *Micología Médica*. México, D.F.: Mendez Editores.
- MCD LAB. (2007). *Ficha Técnica del Agar Biggy*. Octubre 10, 2017, de MCD LAB Sitio web: <http://www.mcclab.net/Fichas%20Tecnicas/Agar%20%20Biggy.pdf>
- Merck. (2017). *Agar urea base christensen*. Octubre 19, 2017, de Merck Millipore Sitio web: [http://www.merckmillipore.com/MX/es/product/Urea-agar-base-acc.-to-CHRISTENSEN,MDA\\_CHEM108492?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com.mx%2F](http://www.merckmillipore.com/MX/es/product/Urea-agar-base-acc.-to-CHRISTENSEN,MDA_CHEM108492?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com.mx%2F)
- Negroni, R., & Guelfand, L. Perrone, M., (2008). *Manual de Medios y Reactivos*. Buenos Aires: PAMR.
- Prats, G. (2005). *Microbiología Clínica*. Madrid, España: Médica Panamericana.
- Probiotek. (2017). *Extracto de Malta*. Octubre 26, 2017, de Probiotek Sitio web: <http://www.probiotek.com/productos/reactivos/medios-de-cultivo-reactivos/extracto-de-malta/>

- Rambach, A. (2014). *BBL CHROMagar Candida Medium*. Octubre 10, 2017, de Becton Dickinson Sitio web: <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8810>
- Rodríguez, E., Gamboa, M., & Hernández, F., (2005). *Bacteriología General: Principios y Prácticas de Laboratorio*. Costa Rica: Universidad de Costa Rica. [https://books.google.com.mx/books?id=vwB0fgirgN0C&pg=PA63&lpg=PA63&dq=tincion+de+gram&source=bl&ots=xZohC5shrf&sig=QLR\\_f90XUg2gkRV1vWOAt6wTUBA&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjv4qazsrDWAhWI14MKHX5hDQUQ6AEIqQEwDw#v=onepage&q=tincion%20de%20gram&f=false](https://books.google.com.mx/books?id=vwB0fgirgN0C&pg=PA63&lpg=PA63&dq=tincion+de+gram&source=bl&ots=xZohC5shrf&sig=QLR_f90XUg2gkRV1vWOAt6wTUBA&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjv4qazsrDWAhWI14MKHX5hDQUQ6AEIqQEwDw#v=onepage&q=tincion%20de%20gram&f=false)
- Rodríguez, F. (2017). *Tinción negativa de cápsulas*. Octubre 17, 2017, de Laboratorio de Diagnóstico Franrzm Siteo web: <https://www.franrzm.com/tincion-negativa-de-capsulas/>
- Salas E., Nuñez A., Flores A., & Amaya G. (2011). *Manual de Laboratorio de Micología Médica*. UNAM, 61 págs.
- Stainer, R. (1996). *Microbiología*. Barcelona: Reverté
- Tangarife, V. (2011). *Criptococosis*. Octubre 18, 2017, de Universidad de Antioquía Sitio web: <http://aprendeenlinea.udea.edu.co/lms/moodle/mod/page/view.php?id=100866>
- Trombetta L., Javier A., (2005). *Laboratorio clínico y micológico en pacientes con histoplasmosis y síndrome de inmunodeficiencia adquirida*. Agosto 10, 2017 de SciELO Sitio web: [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S032529572005000400010&script=sci\\_arttext&tlng=pt](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S032529572005000400010&script=sci_arttext&tlng=pt)

- Uberos, J., (1981). *Medios de Cultivo para Microbiología*. Barcelona: ADSA.
- Valdés I., Martínez G., Fernández G., & Illnait M. (2003). *Pigmentación de cepas de Cryptococcus neoformans sobre agar semilla de girasol*. Agosto 10, 2017 de SciELO Sitio web: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S03750760200300020011](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S03750760200300020011)